



ISSN 1300-6320  
EISSN 2146-3077

# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## Özgün Araştırmalar / Original Investigations

*In vitro* Effects of Antibiotics

*In vitro* Antibiyotik Etkisi

Mehmet Emin Limoncu et al.; Manisa, İzmir, Turkey

Gıda Çalışanlarında *Giardia*, *Cryptosporidium*  
*Giarda* and *Cryptosporidium* in Food Workers

Özlem Bayramoğlu ve ark.; Adana, Türkiye

Kütahya'da *Cryptosporidiosis*

*Cryptosporidiosis* in Kütahya (Turkey)

Cihangir Akdemir; Kütahya, Türkiye

*Blastocystis* sp. SSUrDNA Klonlanması  
Cloning of SSUrDNA of *Blastocystis* sp.

Çağrı Şakalar ve ark.; Kayseri, Türkiye

Concomitant Immunity to *Schistosoma mansoni* in Mice

Farelerde *Schistosoma mansoni*'ye karşı konkomitant bağışıklık

Abdel-Moneim Salim et al.; Turaba, Saudi Arabia

micro-ELISA Test for *Fasciola hepatica*

*Fasciola hepatica* için micro-ELISA

Muhsin Kaya et al.; Diyarbakır, Turkey

Kistik Ekinokokkozis Şüphelilerde Seroloji

Serology of Suspected Cystic Echinococcosis

Adil Karadağ ve ark.; Samsun, İstanbul, Türkiye

Head Lice in Sivas

Sivas'ta Baş Biti

Serpil Değerli et al.; Sivas, Turkey, Jerusalem, Israel

Kum Sineğinde Entomopatojen Nematod Tespiti

Entomopathogen Nematode in Sand Fly

Mehmet Karakuş ve ark.; İzmir, Türkiye

*Myxobolus leafa* sp. nov. from India

Hindistan'dan Yeni Bir Tür *Myxobolus leafa* sp. nov.

Hemananda Thounaojam et al.; Canchipur, West Bengal, India, Kastamonu, Turkey

## Derlemeler / Reviews

*Toxoplasma gondii* Kriyoprezervasyonu

*Toxoplasma gondii* Cryopreservation

Mert Döşkaya ve ark.; İzmir, Türkiye

Dünyada Kistik Ekinokokkoz

Cystic Echinococcosis in the World

Özlem Tünger; Manisa, Türkiye

Citation Abbreviation: Türkiye Parazitol Derg

Cilt / Volume: 37 Sayı / Issue: 1 Mart / March 2013

Türkiye Parazitoloji Derneği'nin yayın organıdır / Official Journal of The Turkish Society for Parasitology





# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

Türkiye Parazitoloji Derneği adına sahibi / Owner on behalf of Turkish Society for Parasitology  
M. Ali Özcel, İzmir, Türkiye

**Baş Editör / Editor-in-Chief**  
Yusuf Özbel, İzmir, Türkiye

**Editörler / Editors**  
Ahmet Doğanay, Ankara, Türkiye  
İ. Cüneyt Balcıoğlu, Manisa, Türkiye  
Bayram Göçmen, İzmir, Türkiye

**Yayın Kurulu / Editorial Board**  
M. Ziya Alkan, İzmir, Türkiye  
Seray Özensoy Töz, İzmir, Türkiye  
Nevin Turgay, İzmir, Türkiye  
Nermin Şakru, Edirne, Türkiye

**İstatistik Danışmanı / Statistical Consultant**  
Aliye Mandıracıoğlu, İzmir, Türkiye



Genel Yayın Yönetmeni / Executive Editor  
İbrahim KARA

Dil Editörü / Language Editor  
Selma YÖRÜKAN

Yayın Koordinatörleri / Publication Coordinators  
Sevilay ARDIÇ NAYIR  
Gökhan ÇİMEN  
Ali ŞAHİN

Proje Asistanları / Project Assistants  
Sinan Gökbörü BÜNCÜ  
Ulaş ÖZGÜR

Grafik Servisi / Graphic Department  
Ünal ÖZER  
Neslihan YAMAN  
Merve KURT

Adres / Address: Kızılelma Cd. No: 5/3 34096  
Fındıklı / İstanbul  
Telefon / Phone: +90 212 589 00 53  
Faks / Fax: +90 212 589 00 94  
E-posta / E-mail: info@avesyayincilik.com

ISSN 1300-6320 • EISSN 2146-3077

Baskı / Printing  
ADA Ofset Matbaacılık Tic. Ltd. Şti.  
Litros Yolu 2. Matbaacılar S. E Blok No: (ZE2)  
1. Kat Topkapı, İstanbul  
Telefon / Phone: +90 212 567 12 42

Basım Tarihi / Printing Date  
Mart 2013 / March 2013

Yayın Türü / Publication Type  
Yerel Süreli / Local Periodical



# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## Uluslararası Danışma Kurulu / International Advisory Board

Mustafa Açıcı, Samsun, Türkiye  
Ramazan Adanır, Hatay, Türkiye  
Mucide Ak, İzmir, Türkiye  
Ulus Salih Akarca, İzmir, Türkiye  
Atila Akça, Kars, Türkiye  
Çiler Akisü, İzmir, Türkiye  
Hayrettin Akkaya, İstanbul, Türkiye  
Münir Aktaş, Elazığ, Türkiye  
Volkan Akyol, Bursa, Türkiye  
Funda Al, Ankara, Türkiye  
Osman Selçuk Aldemir, Aydın, Türkiye  
M. Ziya Alkan, İzmir, Türkiye  
Adil Allahverdiyev, İstanbul, Türkiye  
Nurşen Alpagut-Keskin, İzmir, Türkiye  
Davut Alptekin, Adana, Türkiye  
Mehtap Gül Altaş, Şanlıurfa, Türkiye  
S. Bülent Alten, Ankara, Türkiye  
Nazmiye Altıntaş, İzmir, Türkiye  
Engin Araz, Ankara, Türkiye  
Hüseyin Arıkan, İzmir, Türkiye  
M. Özkan Arslan, Kars, Türkiye  
Metin Atambay, Malatya, Türkiye  
Hamza Avcıoğlu, Erzurum, Türkiye  
Erol Ayaz, Bursa, Türkiye  
Meral Aydenizöz, Kırıkkale, Türkiye  
Levent Aydın, Bursa, Türkiye  
Ali Aydoğdu, Bursa, Türkiye  
Süleyman Aypak, Aydın, Türkiye  
Nuran Aysul, Aydın, Türkiye  
İ.Hakkı Bahar, İzmir, Türkiye  
Serkan Bakırcı, Aydın, Türkiye  
Probir K. Bandyopadhyay, Hindistan  
Kamile Biçek, Van, Türkiye  
Cenk S. Bölükbaş, Samsun, Türkiye  
Çağrı Büke, İzmir, Türkiye  
Gürol Cantürk, Ankara, Türkiye  
Stefano Cecchini, Potenza, İtalya  
Kwang-Poo Chang, Chicago, ABD  
Şevki Ziya Coşkun, Bursa, Türkiye  
Selim S. Çağlar, Ankara, Türkiye  
Ayşe Çakmak, Ankara, Türkiye  
Çiğdem Banu Çetin, Manisa, Türkiye  
Handan Çetinkaya, İstanbul, Türkiye  
Veli Yılgör Çıracak, Bursa, Türkiye  
Hatice Çiçek, Afyon, Türkiye  
Ümit Çimli Aksoy, İzmir, Türkiye  
Gülnaz Çulha, Hatay, Türkiye  
Hande Dağcı, İzmir, Türkiye  
Nilgün Daldal, Malatya, Türkiye  
Serdar Değer, Van, Türkiye  
Serpil Değerli, Sivas, Türkiye  
Burk A. Dehority, Ohio, ABD

Songül Delibaş, İzmir, Türkiye  
Mustafa Demirci, İzmir, Türkiye  
Jerome Depaquit, Reims, Fransa  
Tuğrul Dereli, İzmir, Türkiye  
Bilal Dik, Konya, Türkiye  
Gönül Dinç, Manisa, Türkiye  
Nihal Doğan, Eskişehir, Türkiye  
Nazir Dumanlı, Elazığ, Türkiye  
Serdar Düşen, Denizli, Türkiye  
Önder Düzül, Kayseri, Türkiye  
Nazif Elaldi, Sivas, Türkiye  
Hasan Eren, Aydın, Türkiye  
Sibel Ergüven, Ankara, Türkiye  
Hatice Ertabaklar, Aydın, Türkiye  
Sema Ertuğ, Aydın, Türkiye  
Suna Gedikoğlu, Bursa, Türkiye  
Nogay Girginkardeşler, Manisa, Türkiye  
Ahmet Gökçen, Hatay, Türkiye  
Bahadır Gönenç, Ankara, Türkiye  
Fezullah Güçlü, Konya, Türkiye  
Aynur Gülanber, İstanbul, Türkiye  
A. Tümay Gürlü, Samsun, Türkiye  
Yüksel Gürüz, İzmir, Türkiye  
Esin Güven, Ankara, Türkiye  
Murat Hökelek, İstanbul, Türkiye  
Abdullah İnci, Kayseri, Türkiye  
Ramazan İnci, İzmir, Türkiye  
Murat Kara, Kars, Türkiye  
Zafer Karaer, Ankara, Türkiye  
Süphan Karaytuğ, Mersin, Türkiye  
Halil Kasap, Adana, Türkiye  
Bekir Keskin, İzmir, Türkiye  
Yunus Gıcık, Kars, Türkiye  
Feride Kırçalı, Afyon, Türkiye  
Bijen Kıvçak, İzmir, Türkiye  
Ali Ahmet Kilimcioğlu, Manisa, Türkiye  
Daniela Pilarska Kirilova, Sofia, Bulgaristan  
İ. Soner Koltaş, Adana, Türkiye  
Metin Korkmaz, İzmir, Türkiye  
Esmâ Kozan, Afyon, Türkiye  
Ergün Köroğlu, Elazığ, Türkiye  
Mustafa Köse, Afyon, Türkiye  
Salih Kuk, Kayseri, Türkiye  
Özgür Kurt, Manisa, Türkiye  
Emin Limoncu, Manisa, Türkiye  
Özlem Miman, İzmir, Türkiye  
Kosta Y. Mumcuoğlu, Kudüs, İsrail  
Mustafa Necati Muz, Hatay, Türkiye  
Serpil Nalbantoğlu, Ankara, Türkiye  
M. Cemal Oğuz, Erzurum, Türkiye  
Ülgen Z. Ok, Manisa, Türkiye  
Hatice Öge, Ankara, Türkiye

Semih Öge, Ankara, Türkiye  
Hamdi Ögüt, Trabzon, Türkiye  
Kırami Ölgen, İzmir, Türkiye  
Aytül Önal, İzmir, Türkiye  
Yaşar Ali Öner, İstanbul, Türkiye  
Ahmet Özbilgin, Manisa, Türkiye  
Semra Özçelik, Sivas, Türkiye  
Nalan Özdal, Van, Türkiye  
İsmet Özel, İzmir, Türkiye  
Aykut Özkul, Ankara, Türkiye  
Serdar Paşa, Aydın, Türkiye  
Renate Radek, Berlin, Almanya  
Barış Sarı, Kars, Türkiye  
Oğuz Sarımehmetoğlu, Ankara, Türkiye  
Murat Sevgili, Şanlıurfa, Türkiye  
Ferda Sevinç, Konya, Türkiye  
İzzet Şahin, Kayseri, Türkiye  
Cem Ecmel Şaki, Elazığ, Türkiye  
Naciye Güllük Şenler, Van, Türkiye  
Bayram Şenlik, Bursa, Türkiye  
M. Fatih Şimşek, Aydın, Türkiye  
Sami Şimşek, Elazığ, Türkiye  
Mehmet Tanyüksel, Ankara, Türkiye  
Zeynep Taş, Van, Türkiye  
Ayşegül Taylan Özkan, Ankara, Türkiye  
Erol Tokşen, İzmir, Türkiye  
Seray Töz, İzmir, Türkiye  
Hamdi Murat Tuğrul, Edirne, Türkiye  
Nevin Turgay, İzmir, Türkiye  
Özlem Tünger, Manisa, Türkiye  
Şinasi Umur, Samsun, Türkiye  
Uğur Uslu, Konya, Türkiye  
Sabri Ünal, Kastamonu, Türkiye  
Ahmet Üner, İzmir, Türkiye  
Ayşegül Ünver, İzmir, Türkiye  
Zati Vatanserver, Kars, Türkiye  
Petr Volf, Prag, Çek Cumhuriyeti  
Gülây Vural, İstanbul, Türkiye  
Cem Vuruşaner, İstanbul, Türkiye  
André-Denis G. Wright, Avustralya  
Şükran Yağcı Yücel, Ankara, Türkiye  
Mehmet Yaman, Hatay, Türkiye  
Mustafa Yaman, Trabzon, Türkiye  
İhsan Yaşa, İzmir, Türkiye  
Süleyman Yazar, Kayseri, Türkiye  
Kor Yereli, Manisa, Türkiye  
Alparslan Yıldırım, Kayseri, Türkiye  
Kader Yıldız, Kırıkkale, Türkiye  
Fadile Yıldız Zeyrek, Şanlıurfa, Türkiye  
Hasan Yılmaz, Van, Türkiye  
Mustafa Yılmaz, Elazığ, Türkiye  
Bayram Ali Yukarı, Burdur, Türkiye



# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## AMAÇ VE KAPSAM

Türkiye Parazitoloji Dergisi, 1976 yılından bu yana çıkan, Tıp, Veterinerlik ve Biyoloji alanlarında yapılan Parazitoloji konulu klinik ve deneysel çalışmaları, ilginç olgu bildirimlerini, davet edilmiş derlemeleri, Editöre mektupları yayınlayan; yayın dili Türkçe ve İngilizce olan, bağımsız ve önyargısız çift-kör hakemlik ilkelerine dayanan uluslararası bir dergidir.

Dergi, Türkiye Parazitoloji Derneği'nin bilimsel içerikli resmi yayın organı olup, Mart, Haziran, Eylül ve Aralık aylarında olmak üzere yılda 4 sayı yayınlanmakta ve Türkiye Parazitoloji Derneği tarafından finanse edilmektedir.

Derginin hedefi, klinik ve bilimsel açıdan uluslararası düzeyde nitelikli ve üst düzeyde özgün araştırmaları yayınlamaktır. Dergide ayrıca, tıp eğitimi ile ilgili temel yenilikleri kapsayan derlemeler, Editöryel yazılar, olgu sunumları ve özgün görüntüler de yayınlanmaktadır.

Derginin hedef kitlesi, tıbbi ve veteriner parazitoloji alanlarında ve biyoloji bilim dalının ilgili birimlerinde çalışan tüm bilim insanları ve bu alanlardaki yüksek lisans öğrencileridir. Bu kapsamda dergi, Türkiye Parazitoloji Derneği üyelerine ve yurt çapında parazitoloji'yle ilgili kişi ve kuruluşlara düzenli olarak ulaştırılmaktadır. Derginin tüm sayılarının içerikleri tam metin olarak [www.tparazitolderg.org](http://www.tparazitolderg.org) adresinde ücretsiz erişime açıktır.

Derginin Editöryel süreçleri ve yayın işleyişi ICMJE, WAME ve COPE standartları çerçevesinde yürütülmektedir.

Türkiye Parazitoloji Dergisi; Index Medicus/Medline/PubMed, BIOSIS-Zoological Record, BIOSIS Previews Biological Abstracts, CABI Abstracts and Bibliographic

Databases, Index Copernicus, Tübitak/Ulakbim Türk Tıp Dizini ve Türkiye Atıf Dizini tarafından indekslenmektedir.

**Abone İşlemleri/Baskı İzinleri ve Tekrar Baskılar/Reklam**  
Dergide basılan yazıların tam metinlerine ücretsiz olarak [www.tparazitolderg.org](http://www.tparazitolderg.org) adresinden ulaşılabilir. Basılı dergi aboneliği, baskı izinleri, tekrar baskılar ve reklam için Editör ofisine başvurulmalıdır.

### Editör Ofisi

Editör: Prof. Dr. Yusuf Özbel  
Adres: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, 35100 Bornova-İzmir  
Tel.: +90 232 390 47 24  
Faks: +90 232 388 13 47  
E-posta: [yusuf.ozbel@ege.edu.tr](mailto:yusuf.ozbel@ege.edu.tr)

### Yayıncı

AVES-İbrahim Kara  
Adres: Kızılelma Cad. 5/3 34096 Fındıkzade-İstanbul  
Tel.: +90 212 589 00 53  
Faks: +90 212 589 00 94  
E-posta: [info@avesyayincilik.com](mailto:info@avesyayincilik.com)

### Yazarlara Bilgi

Yazarlara Bilgi sayfası derginin basılı versiyonunda ve [www.tparazitolderg.org](http://www.tparazitolderg.org) web sayfasında yayınlanmaktadır.

### Materyal Sorumluluk Reddi

Türkiye Parazitoloji Dergisi'nde yayınlanan tüm yazılardaki görüş ve raporlar yazarların görüşüdür. Editörler ve Yayıncı bu yazılar için herhangi bir sorumluluk kabul etmemektedir.

Dergimiz asitsiz kağıda basılmaktadır.



# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## AIMS AND SCOPE

The Turkish Journal of Parasitology has been published since 1976. The journal publishes clinical and experimental studies, interesting case reports, invited reviews and letters to the editor on biological, medical and veterinary parasitology. The Turkish Journal of Parasitology is an international journal which is based on independent and unbiased double-blinded peer-review principles. The publishing language of the journal is Turkish and English.

The Turkish Journal of Parasitology is the scientific and the official publication of the Turkish Society for Parasitology and is published four times per year; in March, June, September and December, and is financed by the Turkish Society for Parasitology.

The aim of the journal is to publish original articles with highest clinical and scientific quality at the international level. The Turkish Journal of Parasitology also publishes reviews covering fundamental innovations in medical education, editorial articles, case reports and original images.

The target audience of the journal is scientists working on medical and veterinary parasitology, and relevant disciplines of biology, as well as PhD and MSc students studying on these topics. In this context, the journal is sent regularly to the members of the Turkish Society for Parasitology as well as to the organizations and individuals who are interested in parasitology countrywide. The contents of all issues in full text can be accessed free of charge through the web site [www.tparazitolderg.org](http://www.tparazitolderg.org).

The editorial and publication processes of the journal are conducted in accordance with the ICMJE, WAME and COPE standards.

The Turkish Journal of Parasitology is indexed in Index Medicus/Medline/PubMed, BIOSIS-Zoological Record,

BIOSIS Previews Biological Abstracts, CABI Abstracts and Bibliographic Databases, Index Copernicus, Tübitak/Ulak-bim Turkish Medical Database and Türkiye Citation Index.

### **Subscriptions/Permissions and Reprints/Advertisements**

The full texts of the published articles can be accessed free of charge through the web site [www.tparazitolderg.org](http://www.tparazitolderg.org). Applications for subscriptions, permissions, reprints and advertisements should be made to the editorial office.

### **Editorial Office**

Editor: Yusuf Özbel, MD, Prof.  
Address: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, 35100 Bornova-İzmir  
Phone: +90 232 390 47 24  
Fax: +90 232 388 13 47  
E-mail: [yusuf.ozbel@ege.edu.tr](mailto:yusuf.ozbel@ege.edu.tr)

### **Publisher**

AVES-İbrahim Kara  
Address: Kızılelma Cad. 5/3 34096 Fındıkzade-İstanbul  
Phone: +90 212 589 00 53  
Fax: +90 212 589 00 94  
E-mail: [info@avesyayincilik.com](mailto:info@avesyayincilik.com)

### **Information for Authors**

Information for authors is published in the journal and is available on the web site [www.tparazitolderg.org](http://www.tparazitolderg.org).

### **Material Disclaimer**

All opinions and reports in the articles published in the Turkish Journal of Parasitology are those of the authors. The editors and the publisher do not accept any responsibility for these articles.

The journal is printed on acid-free paper.



# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## YAZARLARA BİLGİ

### Genel Kurallar

Türkiye Parazitoloji Dergisi, tıbbi ve veteriner parazitoloji alanlarında deneysel, gözlemsel araştırma, klinik denemeler, olgu sunumu ve derleme niteliğindeki, biyoloji bilim alanından ise parazitoloji konularını kapsayan makaleleri yayımlar.

Yazılar sadece [www.tparazitolog.org](http://www.tparazitolog.org) adresinden elektronik olarak gönderilmelidir.

Tüm yazarlar bilimsel katkılarını, sorumluluklarını ve çıkar çatışması olmadığını bildiren toplu imza ile yayına katılmalıdır.

Araştırmalara yapılan kısmi de olsa nakdi ya da aynı yardımların hangi kurum, kuruluş, ilaç-gereç firmalarınca yapıldığı dip not olarak bildirilmelidir.

Makalelerin formatı "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication (<http://www.icmje.org/>)" kurallarına göre düzenlenmelidir.

Deneysel, klinik ve ilaç araştırmaları için insan ve hayvan hakları ile ilgili uluslararası anlaşmalara uygun etik kurul raporu (Helsinki Declaration of 1975, revised 2002-<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm> ve "Guide for the care and use of laboratory animals - [www.nap.edu/catalog/5140.html](http://www.nap.edu/catalog/5140.html)) ve hastaların çalışma hakkında bilgilendirildiklerine ve olurlarının alındığına dair onay formu gereklidir.

Makale gönderim aşamasında, makalenin dergimizde yayınlanmasıyla ilgili bütün yazarların onayını belirten bir mektubun eklenmesi gereklidir. Ayrıca makalenin yayına kabul edilmesi halinde bütün yazarların Yayın Hakkı Devir Formu'nu imzalayıp postayla dergi adresine göndermeleri gereklidir.

Etik kurul kararı gereken çalışmalarda onay belgesinin eklenmesi gerekmektedir.

### Yazıların hazırlanması

Yazılar A4 boyutunda, iki satır aralıklı olarak ve tüm sayfalarda sayfa numarası bulunacak şekilde gönderilmelidir. Toplam sayfa sayısı resim ile şekiller dahil araştırma yazılarında 15'i, olgu sunumlarında ise 6'yı geçmemelidir.

Başlık sayfasında sadece makalenin Türkçe ve İngilizce tam ve kısa başlıkları ve varsa makalenin daha önce tebliğ edildiği toplantı ve kongreler yazılmalıdır. Yazar adları ve çalıştıkları kuruma ait bilgiler sadece makale derginin on-line sisteminde yüklenirken girilmeli, makale ana metninde yazara ait bilgiler olmamalıdır.

İkinci sayfada yalnızca Türkçe ve İngilizce özetler ile anahtar sözcükler yer almaktadır. 200 kelimeyi geçmeyen özet kısmı, Amaç, Yöntemler, Bulgular, Sonuç şeklinde bölümlü olmalıdır. Anahtar sözcükler ise 5 kelimeyi geçmeyecek şekilde Türkçe özetin altına Türkçe, İngilizce özetin altına İngilizce olarak eklenmelidir.

Araştırma yazılarının tam metin bölümü Giriş, Yöntemler, Bulgular, Tartışma, Sonuç, Çıkar Çatışması Beyanı, Kaynaklar, Tablo, Şekil ve Resimleri (açıklama yazılarıyla birlikte) içerecek şekilde düzenlenmelidir. Olgu sunumlarında ise Giriş, Olgu(lar), Tartışma, Sonuç, Kaynaklar, Tablo, Şekil ve Resimler (açıklama yazılarıyla birlikte) şeklinde olmalıdır.

Tablo, şekil ve resimler ayrı bir sayfada olmalı ve yazının içinde geçmesi gereken yer cümlelerin sonuna parantez içinde yazılmalıdır.

Siyah-beyaz veya renkli fotoğrafların yüksek çözünürlüklü jpg formatında gönderilmesi gerekmektedir.

Makale içinde ve kaynaklarda geçen parazitlerin cins ve tür isimleri italik ve sadece cins isminin ilk harfi büyük olarak yazılmalıdır.

Kısaltmalar ilk kez kullanıldığında açık olarak yazılmalı daha sonra makale içinde hep aynı kısaltma kullanılmalıdır.

Yazı içinde belirtilen tüm kaynaklar makale içindeki geçiş sırasına göre liste halinde numaralandırılarak verilmelidir. Kaynaklar yazılırken noktalama işaretlerine aşağıdaki örneklerde gösterildiği şekilde dikkat edilmeli ve yazı içinde her kaynağa ait numara ilgili cümlelerin sonunda parantez içinde mutlaka belirtilmelidir. Dergi kısaltmaları Index Medicus tarafından gösterildiği şekilde yapılmalıdır. Altı ve daha az yazarlı olan kaynaklarda tüm isimler yazılmalı, yedi ve daha fazla yazarlı kaynakların ise ilk altı yazar ismi yazılıp Türkçe makalelerde "ve ark.", İngilizce makalelerde "et al" ilave edilmelidir.

### Kaynak yazımı için örnekler

#### Sürekli Yayınlar

Githeko AK, Service MW, Mbogo CM, Audi FK, Juma PO, Mousier WJ, et al. Plasmodium falciparum sporozoite and entomological inoculation rates at the Ahero rice irrigation scheme and the Miwani sugar belt in Western Kenya. *Ann Trop Med Parasitol* 2002; 52: 561-79.

#### Editörlü Kitapta Bölüm

Hornbeck P. Assay for antibody production. Colign JE, Kruisbeek AM, Margules DH, editors. *Current Protocols in Immunology*. New York: Greene Publishing Associates; 1991. p. 105-32.

#### Tek Yazarlı Kitap

Fleiss JL. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. Second Edition. New York: John Wiley and Sons; 1981.

#### Yazar olarak Editörler

Balows A, Mousier WJ, Herramafifi KL, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth Edition. Washington DC: IRL Press.; 1990.

#### Kongre Bildirileri

Entrala E, Mascaro C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII); October, 10-14; Izmir-Turkey; 1994. p. 1250-75

#### Tezler

Erakıncı G. Donörlerde parazitlere karşı oluşan antikorların aranması. İzmir: Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 1997.

#### Elektronik Formatta Makale

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* (serial online) 1995 Jan-Mar (cited 1996 June 5): 1(1): (24 screens). Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/cid.htm>.

Yayın Kurulu, gönderilen yazılarda bu kurallara uymayan yerlerin bulunması durumunda bilimsel içeriğe dokunmadan teknik açıdan gerekli değişiklikleri yapmaya yetkilidir.

Derleme yazılar, sadece yayın kurulu tarafından davet edilen yazarlar tarafından hazırlanır ve yayınlanır. Davetsiz olarak dergiye gönderilen derleme yazıları dikkate alınmayacaktır.

Editör: Prof. Dr. Yusuf ÖZBEL

Adres: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, 35100 Bornova-İzmir, Türkiye

Tel.: +90 232 390 47 24

Faks: +90 232 388 13 47

E-posta: [yusuf.ozbel@ege.edu.tr](mailto:yusuf.ozbel@ege.edu.tr)





# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

### General Rules

The Turkish Journal of Parasitology publishes experimental and observational research articles, clinical reviews, case reports and review articles on medical and veterinary parasitology, and publishes articles on parasitology in the biology field.

Manuscripts must be submitted online at [www.tparazitolog.org](http://www.tparazitolog.org).

All submissions must be accompanied by a signed statement of scientific contributions and responsibilities of all authors and a statement declaring the absence of conflict of interests.

Any institution, organization, pharmaceutical or medical company providing any financial or material support, in whole or in part, must be disclosed in a footnote.

Manuscripts must be prepared in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication (available at <http://www.icmje.org/>).

An approval of research protocols by an ethical committee in accordance with international agreements (Helsinki Declaration of 1975, revised 2002 - available at <http://www.vma.net/e/policy/b3.htm> <<http://www.vma.net/e/policy/b3.htm>>, "Guide for the care and use of laboratory animals - [www.nap.edu/catalog/5140.html](http://www.nap.edu/catalog/5140.html)) is required for experimental, clinical and drug studies. A form stating that the patients have been informed about the study and consents have been obtained from the patients is also required for experimental, clinical and drug studies.

All submissions must be accompanied by a letter that states that all authors have approved the publication of the paper in the Turkish Journal of Parasitology. Upon acceptance, all authors must sign the Copyright Transfer Form, and send this form to the editorial office through mail.

Submission of the studies requiring ethical committee decision must be accompanied by a copy of the submission to the ethical committee.

### Preparation of the Manuscript

Manuscripts should be typed double-spaced on A4 size paper and pages should be numbered consecutively. The total number of pages should not exceed 15 for research articles and 6 for case reports; including figures and illustrations.

The title page should include full and short title in Turkish and English, and meeting and congress presentations of the manuscript must be stated, if any. Authors' names and their institutional affiliations must only be provided at the submission stage, author information must not be included in the main text.

The second page should include abstracts written both in Turkish and English, and key words. Structured abstracts, not to exceed 200 words, should consist of four sections, labeled as Objective, Methods, Results and Conclusion. No more than five key words in Turkish language should follow the Turkish abstract, as well as keywords in English should follow the English abstract.

For research articles main text should include Introduction, Methods, Results, Discussion, Conclusion, Conflict of Interest Disclosure, References, Tables, Figures and Illustrations (with legends) sections. Case reports should be divided into the following sections: Introduction, Case(s), Discussion, Conclusion, References, Tables, Figures and Illustrations (with legends).

Tables, figures and illustrations must be provided on a separate page and must be cited at an appropriate point in the text at the end of the sentence in parenthesis.

Both black and white and color figures must be uploaded in high resolution jpg format.

When mentioning parasites in the main text and references, the genus and species names must be italicized and the genus name must be written with an initial capital letter.

Abbreviations should be expanded at first mention and used consistently thereafter.

All references cited in the text should be listed in numerical order in which they appear in the text. Attention should be paid to punctuation as shown in examples below. In text, each reference should be given in parenthesis at the end of the relevant sentence. Abbreviation of journal names must conform to Index Medicus style. All author names should be listed if there are six or fewer. In case of more than six authors, only the first six should be listed, followed by "ve ark." in articles in Turkish and followed by "et al." in articles in English.

### Examples

#### Periodicals

Githoko AK, Service MW, Mbogo CM, Audi FK, Juma PO, Mousier WJ, et al. Plasmodium falciparum sporozoite and entomological inoculation rates at the Ahero rice irrigation scheme and the Miwani sugar belt in Western Kenya. *Ann Trop Med Parasitol* 2002; 52: 561-79.

#### Chapter in Edited Book

Hornbeck P. Assay for antibody production. Colign JE, Kruisbeek AM, Marguiles DH, editors. *Current Protocols in Immunology*. New York: Greene Publishing Associates; 1991. p. 105-32.

#### Book with a Single Author

Fleiss JL. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. Second Edition. New York: John Wiley and Sons; 1981.

#### Editor(s) as Author

Balows A, Mousier WJ, Herramaffi KL, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth Edition. Washington DC: IRL Press.; 1990.

#### Conference Paper

Entrala E, Mascaro C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII); October, 10-14; Izmir-Turkey: 1994. p. 1250-75

#### Thesis

Erakinci G. Donörlerde parazitlere karşı oluşan antikorların aranması. İzmir: Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 1997.

#### Article in Electronic Format

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* (serial online) 1995 Jan-Mar (cited 1996 June 5): 1(1): (24 screens). Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/cid.htm>.

The editorial board has the authority to make necessary revisions in the format of the manuscript (without making any revision in the context) that does not comply with the above-mentioned requirements.

Review articles are only prepared and published by authors invited by the editorial board. Review articles that are submitted to the journal without an invitation of the editorial board will not be taken to consideration for publication.

Editor: Yusuf ÖZBEL, PhD, Prof.

Address: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, 35100 Bornova-Izmir, Turkey

Phone: +90 232 390 47 24

Fax: +90 232 388 13 47

E-mail: [yusuf.ozbel@ege.edu.tr](mailto:yusuf.ozbel@ege.edu.tr)



# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## EDİTÖRDEN

2013 yılının ilk sayısında 10 orijinal araştırma, 2 derleme yazısı ve 5 olgu sunumu yer almaktadır. Ülkemizde özellikle büyük şehirlerde bağırsak parazitlerinin profilinin gittikçe değiştiği gözlenmektedir. Bağırsak parazitleri ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalar ve retrospektif araştırmalar bu durumu ortaya koymaktadır. Bu sayımızda da Cryptosporidium, Blastocystis gibi gittikçe daha yaygın olarak saptanmaya başlanan parazitlerle ilgili makalelere yer verilmiştir. Toxoplasmosis ile ilgili derlemede bu parazitin dondurularak saklanması konusu, Echinococcosis ile ilgili derlemede ise hastalığın Dünya'daki yaygınlığı ele alınmıştır. Olgu sunumlarında ise çeşitlilik göz önüne alınmış, leishmaniasis, strongyloidosis, visseral larva migrans ve echinococcosis ile ilgili vak'aların ayrıntıları sunulmuştur.

Bekleme süremiz dolduğu için bu yıl içinde yeniden SCI için başvuruda bulunacağımızı belirtir, bu sayımızın da bilimsel çalışmalarınıza ve birikimlerinize yararlı olması umuduyla saygılar sunarım.

**Prof. Dr. Yusuf ÖZBEL**  
Baş Editör

## EDITORIAL

Ten original articles, 2 review articles and 5 case reports are included in this first issue of the year 2013. A profile shift is observed in the intestinal parasites in our country, especially in metropolitan areas. Studies on intestinal parasites and retrospective studies indicate this situation. With this issue, we have tried to include manuscripts on parasites like Cryptosporidium and Blastocystis which are detected more commonly day by day. The review article on Toxoplasmosis focuses on freezing the parasite to preserve it while the review article on Echinococcosis focuses on the extensity of the disease over the World. To maintain the diversity of the case reports, details of cases of leishmaniasis, strongyloidosis, visceral larva migrans and echinococcosis were presented.

I would like to state that our waiting period is over and that we can now apply for inclusion in SCI and I would like to present our respects with hopes that this issue will be useful for both your studies and archives.

**Prof. Dr. Yusuf ÖZBEL**  
Editor-in-Chief





# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## İÇİNDEKİLER / CONTENTS

### ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / ORIGINAL INVESTIGATIONS

- 1 **Investigation of *in vitro* Antileishmanial Activity of Moxifloxacin, Linezolid and Caspofungin on *Leishmania tropica* Promastigotes**  
*Leishmania tropica* Promastigotları Üzerine Moksifloksasin, Linezolid ve Kaspofunginin *in vitro* Antileishmanial Etkisinin Araştırılması  
M. E. Limoncu, B. Eraç, T. Gürpınar, A. Özbilgin, İ. C. Balcıoğlu, M. Hoşgör-Limoncu
- 4 **Adana İli Gıda Çalışanlarında *Giardia* ve *Cryptosporidium* Prevalanslarının Farklı Yöntemler ile Araştırılması**  
Investigation of *Giardia* and *Cryptosporidium* Prevalence with Different Methods in Adana Food Workers  
Ö. Bayramoğlu, D. Pekmezci, F. Başarı
- 9 ***Cryptosporidiosis*'in Serolojik ve Mikroskopik Tespiti ve İçme Sularının Ookist Yönünden İncelenmesi**  
Investigation of *Cryptosporidiosis* by Serologic and Microscopic Method and Examination of Tap Water Samples for Oocysts  
C. Akdemir
- 13 ***Blastocystis* sp. Subtip 3 Small-subunit Ribozomal Geninin Klonlanması**  
Cloning of *Blastocystis* sp Subtype 3 Small-subunit Ribosomal DNA  
Ç. Şakalar, Y. Uyar, M. A. Yürürdurmaz, S. Tokar, H. Yeşilkaya, E. Gürbüz, S. Kuk, S. Yazar
- 19 **Concomitant Immunity to *Schistosoma mansoni* in Mice**  
Farelerde *Schistosoma mansoni*'ye karşı konkomitant bağışıklık  
A.M. Salim, A.R. Al-Humiany
- 23 **The Value of micro-ELISA Test in the Diagnosis of *Fasciola hepatica* Infection**  
*Fasciola hepatica* Enfeksiyonunun Tanısında micro-ELISA Testinin Değeri  
M. Kaya, R. Beştaş, M. Çiçek, A. Önder, M. A. Kaplan
- 28 **Kistik Ekinokokkozis Şüphesi ile 2005-2011 Yılları Arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına Gönderilen Örneklerin Değerlendirilmesi**  
Evaluation of Materials Sent due to Suspected Cystic Echinococcosis to the Parasitology Laboratory of Ondokuz Mayıs University Medical School between the Years 2005-2011  
A. Karadağ, K. Yanık, N. Ünal, H. Odabaşı, M. Hökelek
- 32 **Head Lice Prevalence and Associated Factors in Two Boarding Schools in Sivas**  
Sivas'ta İki Yatılı Okulda Baş Biti Yaygınlığı ve Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesi  
S. Değerli, E. Malatyalı, K. Y. Mumcuoğlu
- 36 **Kuşadası, Aydın'da Doğadan Yakalanan Kum Sineklerinde (*Phlebotomus tobbi*) Saptanan Entomopatojen Nematod [EPN] ve Biyolojik Kontrol Ajanı Olarak Kullanımının Değerlendirilmesi**  
Detection of Entomopathogen Nematode [EPN - Sand Flies (*Phlebotomus tobbi*)] Caught in the Wild in Aydın, Kusadası Town and its Assessment as a Biological Control Agent  
M. Karakuş, S. K. Arserim, S. Özensoy Töz, Y. Özbel



# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## İÇİNDEKİLER / CONTENTS

- 40 ***Myxobolus leafa* sp. nov. (Myxozoa: Bivalbulida) from the gill filament of *Labeo bata* (Hamilton) from Manipur, India**  
Hindistan (Manipur)'daki *Labeo bata* Balığının Solungaç Filamentinden Yeni Bir Tür *Myxobolus leafa* sp. nov. (Myxozoa: Bivalbulida)  
H. Thounaojam, N. Mohilal, P. K. Bandyopadhyay, A. K. Mitra, G. Gürelli

### DERLEMELER / REVIEWS

- 44 ***Toxoplasma gondii* Takizoit ve Doku Kistlerinin Kriyoprezervasyonu**  
Cryopreservation of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites and Tissue Cysts  
M. Döşkaya, A. Caner, H. Can, S. G. İz, A. Değirmenci, A. Y. Gürüz

- 47 **Dünyada Kistik Ekinokokkoz Epidemiyolojisi**  
Epidemiology of Cystic Echinococcosis in the World  
Ö. Tünger

### OLGU SUNUMLARI / CASE REPORTS

- 53 **A Case of Giant Hyperkeratotic Cutaneous Leishmaniasis in the Penis**  
Peniste Dev Hiperkeratotik Kutanöz Layşmanyazis Olgusu  
M. Gülüm, Y. Yeşilova, M. Savaş, H. Çiftçi, E. Yeni, F. Yıldız Zeyrek

- 55 **Kronik Steroid Kullanan İmmüsuprese Hastada Strongyloidoza Bağlı Loeffler Sendromu**  
Strongyloidosis Caused Loeffler's Syndrome in an Immunosuppressed Patient Who Uses Chronic Steroid  
Ö. Ö. Ekmekci, M. Tahmaz, S. Altıparmak, G. Gülaçtı, A. K. Ergen, A. B. Kumbasar, S. Sepetcioğlu, Y. A. Öner

- 58 **Visceral Larva Migrans Presenting with Hypereosinophilia**  
Hipereosinofili ile Başvuran Bir Pediatrik Olgu: Viseral Larva Migrans  
Ç. Ecevit, Ö. Bağ, C. Vergin, A. Öztürk

- 61 **Dev Böbrek Kistik Ekinokok Hastalığı: Olgu Sunumu**  
Giant Renal Cystic Echinococcosis: Case Report  
C. Ceylan, Ö. Odabaş, T. A. Serel, Ö. Baytok, T. Temuçin

- 64 **Hidatik Hastalıkta Atipik Presentasyon: Hemoptizi**  
Atypical Presentation in Hydatid Disease: Hemoptysis  
Y. Özsürekcı, A. Ö. Parlakay, A. B. Cengiz, M. Çelik, E. K. Öncel, A. Kara, N. Kiper, G. Cinel, B. Oğuz



# Investigation of *in vitro* Antileishmanial Activity of Moxifloxacin, Linezolid and Caspofungin on *Leishmania tropica* Promastigotes

*Leishmania tropica* Promastigotları Üzerine Moksifloksasin, Linezolid ve Kaspofunginin *in vitro* Antileishmanial Etkisinin Araştırılması

Mehmet Emin Limoncu<sup>1</sup>, Bayrı Eraç<sup>2</sup>, Tuğba Gürpınar<sup>3</sup>, Ahmet Özbilgin<sup>4</sup>, İ. Cüneyt Balcıoğlu<sup>4</sup>, Mine Hoşgör-Limoncu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Vocational School of Health Services, Celal Bayar University, Manisa, Turkey

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Microbiology, Faculty of Pharmacy, Ege University, İzmir, Turkey

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Celal Bayar University, Manisa, Turkey

<sup>4</sup>Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Celal Bayar University, Manisa, Turkey

## ABSTRACT

**Objective:** This study aimed to evaluate the potential *in vitro* anti-leishmanial activities of moxifloxacin, linezolid and caspofungin against *Leishmania tropica*.

**Methods:** *In vitro* effects of all agents were studied by using the microdilution method. For this purpose, serial dilutions of the aforementioned agents were prepared in concentrations between 4096 µg/mL-0.008 µg/mL. Afterwards, promastigotes incubated in suitable medium were counted with the hemocytometer and adjusted as having a last concentration of 2.5x10<sup>6</sup> cells/mL in wells containing medium+antibiotic or antifungal. After incubation live promastigotes were counted with the hemocytometer and inhibitor concentrations (IC<sub>50</sub>) were determined by comparing with the control that contained no antibiotics or antifungal.

**Results:** IC<sub>50</sub> values of moxifloxacin, linezolid and caspofungin were found as 194.7 µg/mL, 896 µg/mL and 235.7 µg/mL, respectively.

**Conclusion:** As a result, moxifloxacin was found to be effective in lower concentrations than the other studied agents against *L. tropica* promastigotes. (*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 1-3)

**Key Words:** *Leishmania tropica*, antileishmanial activity, moxifloxacin, linezolid, caspofungin

**Received:** 05.06.2012

**Accepted:** 16.01.2013

## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada, *Leishmania tropica* üzerine moksifloksasin ve linezolid ile kaspofunginin, potansiyel anti-leishmanial etkilerinin *in vitro* olarak araştırılması amaçlandı.

**Yöntemler:** Tüm ajanların *in vitro* etkisi mikrodilüsyon yöntemiyle araştırıldı. Bu amaçla moksifloksasin, linezolid ve kaspofunginin 4096 µg/mL-0.008 µg/mL arasındaki konsantrasyonlarda seri dilüsyonları yapıldı. Ardından uygun besiyerinde inkübe edilen promastigotlar hemositometre ile sayıldı ve besiyeri+antibiyotik veya antifungal içeren kuyucuklardaki son konsantrasyonları 2.5x10<sup>6</sup> hücre/mL olacak şekilde ayarlandı. İnkübasyondan sonra canlı promastigotlar hemositometre ile sayıldı ve ajanların %50 inhibitör konsantrasyonları (IK<sub>50</sub>) kontrollerle karşılaştırılarak belirlendi.

**Bulgular:** Moksifloksasin, linezolid ve kaspofunginin *in vitro* IK<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 194.7 µg/mL, 896 µg/mL ve 235.7 µg/mL olarak bulundu.

**Sonuç:** Moksifloksasinin, *L. tropica* promastigotlarına karşı çalışılan diğer ajanlara göre daha düşük konsantrasyonlarda etkili olduğu sonucuna varıldı. (*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 1-3)

**Anahtar Sözcükler:** *Leishmania tropica*, antileishmanial aktivite, moxifloxacin, linezolid, caspofungin

**Geliş Tarihi:** 05.06.2012

**Kabul Tarihi:** 16.01.2013

**This study was presented in Gülhane Microbiology Days, Antimicrobial Chemotherapy Laboratory Practices and New Approaches, 2010, İstanbul, as a poster.**

**Address for Correspondence / Yazışma Adresi:** Dr. Bayrı Eraç, Department of Pharmaceutical Microbiology, Faculty of Pharmacy, Ege University, İzmir, Turkey Phone: +90 232 311 40 83 E-mail: bayri.erac@ege.edu.tr, eracb@yahoo.com

doi:10.5152/tpd.2013.01

## INTRODUCTION

*Leishmaniasis* is an important tropical disease which influences 20 million people in 80 countries worldwide and 350 million people are at risk. *Cutaneous leishmaniasis* (CL) is being reported in many areas of our country, especially from Southeast Anatolia, Mediterranean and Aegean Regions of Turkey (1). Currently, the first choice of treatment for the disease is still pentavalent antimony compounds. Recently, increase in the number of resistant cases for these compounds and inefficacy of the treatment in immunosuppressive individuals have been observed. It is determined that pump mediated multiple drug resistance has a part in resistance development (2). Alternative treatment options have been investigated, because current drugs have only limited effect on leishmaniasis and are toxic and expensive (3, 4).

Nowadays, effects of intracellularly active antibiotics and antifungal agents have been researched on *Leishmania* amastigotes and promastigotes (5, 6). Quinolones are synthetic antibacterial drugs and nalidixic acid is a prototype antibiotic of this class. It acts by inhibiting DNA topoisomerase type II (girase) or topoisomerase type IV, that are responsible for DNA replication, recombination and repair in bacteria. Moxifloxacin is a broad spectrum fluoroquinolone and is active against Gram-positive, Gram-negative and atypical pathogens. In addition, it can be taken once daily.

Linezolid is the first oxazolidinone derivation that is used clinically. It deteriorates the tRNA binding site by bonding the 50S ribosomal subunit and therefore formation of 70S initiation complex is prevented (7). Echinocandins are semisynthetic lipopeptide compounds which inhibit 1,3- $\beta$ -glucan synthesis, an important component of the fungus cell wall. They show selective toxicity because mammalian cells do not include 1,3- $\beta$ -glucan. The most known member of this group is caspofungin and others are also available (8).

In this study, we aimed to evaluate the potential in-vitro anti-leishmanial activities of moxifloxacin, linezolid and caspofungin against *Leishmania tropica* (MHOM/TR/10/CBU52).

## METHODS

### Parasite

In our study, *L. tropica* promastigotes (MHOM/TR/10/CBU52), isolated in Manisa were used.

### Agents and Methods

In this study, *in vitro* effects of moxifloxacin (Bayer, Turkey), linezolid (Pfizer, Turkey) and caspofungin (Merck Sharp & Dohme, Turkey) were studied by using the microdilution method according to Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations (9). For this purpose, serial dilutions of mentioned agents were prepared in concentration between 4096  $\mu$ g/mL-0.008  $\mu$ g/mL. Afterwards, promastigotes that had been incubated in RPMI-1640 medium (Sigma), including 5% fetal-calf serum (FCS), were counted with the hemocytometer and adjusted as having a final concentration of  $2.5 \times 10^6$  cells/mL in wells containing 200  $\mu$ L RPMI+5% FCS +antibiotic or antifungal. Microplates were incubated for 48 hours in 27°C. Live promastigotes were counted with the hemocytometer after 48 hours and

inhibitor concentrations ( $IC_{50}$ ) were determined by comparing with the control which does not contain antibiotics or antifungal. Amphotericin B (Sigma) (100  $\mu$ g/mL- 0.0002  $\mu$ g/mL), that is used for CL treatment, was used as control. The procedure was performed in triplicate and mean values of the results were calculated.

## RESULTS

$IC_{50}$  values of moxifloxacin, linezolid and caspofungin were found as 194.7  $\mu$ g/mL, 896  $\mu$ g/mL and 235.7  $\mu$ g/mL, respectively.  $IC_{50}$  value of amphotericin B was detected as 0.026  $\mu$ g/mL.  $IC_{50}$  values of studied agents and the number of live promastigotes are shown in Table 1.

## DISCUSSION

Cutaneous leishmaniasis is common in many regions of the world, including our country. Today, the increasing number of patients with immune deficiency increases the incidence of opportunistic *Leishmania* infections. Use of pentavalent antimony compounds, that is the first choice of leishmaniasis treatment, was restricted due to several side effects and resistance development (10). Thus, new treatment options are being considered.

One of the groups among the alternative treatment choices is antifungal agents. Amphotericin B is the most commonly used one in this group and it was approved by Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of visceral leishmaniasis. Efficacy of azoles such as ketoconazole, itraconazole and flucon-

**Table 1.** The *in vitro* effects of various agents on *L. tropica*

Agents	$IC_{50}$ ( $\mu$ g/mL)	Concentrations ( $\mu$ g/mL)	Number of Promastigots ( $\times 10^4$ )
Moxifloxacin	194.7	4096	0
		2048	0
		512	1
		256	12
		128	25
		16	35
Linezolid	896	4096	6
		2048	14
		512	25
		256	30
		128	35
		16	35
Caspofungin	235.7	4096	0
		2048	0
		512	6
		256	16
		128	20
		16	30
Amphotericin B	0.26		
Growth control: $35 \times 10^4$ cell/mL			

azole that inhibit ergosterol synthesis in fungus was tested on leishmania species (11). Caspofungin is a new antifungal agent and prevents fungus cell wall synthesis. A limited number of studies were made researching the efficacy of caspofungin against some species of protozoa. For example, it is found that caspofungin is effective in 250 mg/L concentration against *Acanthamoeba* species (12). In the present study, efficacy of caspofungin was investigated in concentrations between 4096-0.008 µg/mL on *L. tropica*, and the IC<sub>50</sub> value was found as 235 µg/mL. Studies on *in vivo* efficacy of caspofungin in different *Leishmania* species will establish a better evaluation of possibility for using this agent in leishmaniasis treatment.

There are a limited number of studies evaluating the efficacy of linezolid on protozoa. In a study regarding to efficiency of linezolid on *Plasmodium falciparum*, protein synthesis inhibitor drugs such as doxycycline and azithromycin were used as controls and antimalarial effects of these antibiotics was attributed to being active against prokaryote organelles such as mitochondria and apicoplast. However, it was found that linezolid is not as efficient as others (13). In an immunodeficient patient with acute granulomatous *Acanthamoeba* encephalitis, combination therapy with linezolid, meropenem, moxifloxacin and fluconazole were found effective in survival (14). In the present study, the IC<sub>50</sub> value of linezolid, studied in concentrations between 4096-0.008 µg/mL, was found as a very high value of 896 µg/mL. The low efficacy of linezolid against *Leishmania* was attributed to the different ribosome structure between parasites and bacteria.

Studies investigating the efficacy of fluoroquinolon antibiotics in treatment of clinical leishmaniasis, are available (5, 15). It was stated that DNA topoisomerase enzymes of trypanosomatide parasites (*Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp.) are potential targets in terms of selective inhibition. These enzymes have significant structural and biochemical differences compared to their homologues present in humans (5, 10). It was also found that topoisomerase II inhibitors are effective against *Trypanosoma cruzi* and *L. donovani* amastigotes (16). In our study, IC<sub>50</sub> value of moxifloxacin was found 194.7 µg/mL and this is the lowest value among the studied agents. It was reported that some newly synthesized fluoroquinolone derivations are effective against *Toxoplasma gondii* and blood phases of *P. falciparum* (17). Also, it was detected that fluoroquinolones are efficient against *Leishmania* species in animal models and human macrophages cell lines (10, 15, 16). Van Der Vliet et al. (15) reported a suppurative *Pseudomonas aeruginosa* otochondritis along with CL ulceration and it is determined that ciprofloxacin is effective for treatment of this infection. Hence, fluoroquinolones can be used both for *Leishmania* infections and for secondary bacterial infections that may occur.

## CONCLUSION

Moxifloxacin was found to be effective in lower concentrations than the other studied agents against *L. tropica* promastigotes and it was considered that it can be used as an alternative treat-

ment agent. Evaluation of the in-vivo effects of linezolid, caspofungin and especially moxifloxacin is required for providing more detailed information.

## Conflict of Interest

No conflict of interest was declared by the authors.

## REFERENCES

1. Ok ÜZ, Balcıoğlu İC, Taylan OA, Özensoy S, Özbel Y. Leishmaniasis in Turkey. *Acta Trop* 2002; 84: 43-8. [CrossRef]
2. Mandal G, Sarkar A, Saha P, Singh N, Sundar S, Chatterjee M. Functionality of drug efflux pumps in antimonial resistant *Leishmania donovani* field isolates. *Indian J Biochem Biophys* 2009; 46: 86-92.
3. Chan-Bacab MJ, Pena-Rodriguez LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat Prod Rep* 2001; 18: 674-88. [CrossRef]
4. Sharief AH, Gasim Khalil EA, Theander TG, Kharazmi A, Omer SA, Ibrahim ME. *Leishmania donovani*: an in-vitro study of antimony-resistant amphotericin B-sensitive isolates. *Exp Parasitol* Dec 2006; 114: 247-52. [CrossRef]
5. Romero IC, Saravia NG, Walker J. Selective action of fluoroquinolones against intracellular amastigotes of *Leishmania (Viannia) panamensis* in-vitro. *J Parasitol* 2005; 91: 1474-9. [CrossRef]
6. Yardley V, Croft SL. Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 752-6.
7. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 120-6. [CrossRef]
8. Perlin DS. Current perspectives on echinocandin class drugs. *Future Microbiol* 2011; 6: 441-57. [CrossRef]
9. Clinical and Laboratory Standards Institute Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard, 7th ed. CLSI document M7-A7, Wayne, PA, USA. 2006b.
10. Cortazar TM, Coombs GH, Walker J. *Leishmania panamensis*: comparative inhibition of nuclear DNA topoisomerase II enzymes from promastigotes and human macrophages reveals anti-parasite selectivity of fluoroquinolones, flavonoids and pentamidine. *Exp Parasitol* 2007; 116: 475-82. [CrossRef]
11. Alrajhi AA. Cutaneous leishmaniasis of the old world. *Skin Ther Lett* 2003; 8: 1-4.
12. Bouyer S, Imbert C, Daniault G, Cateau E, Rodier MH. Effect of caspofungin on trophozoites and cysts of three species of *Acanthamoeba*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 122-4. [CrossRef]
13. Barthel D, Schlitzer M, Pradel G. Telithromycin and quinupristin-dalfopristin induce delayed death in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 774-7. [CrossRef]
14. Lackner P, Beer R, Broessner G, Helbok R, Pfausler B, Brenneis C, et al. Acute granulomatous acanthamoeba encephalitis in an immunocompetent patient. *Neurocrit Care* 2010; 12: 91-4. [CrossRef]
15. Van Der Vliet D, Le Guern AS, Freitag S, Gounod N, Therby A, Darie H, et al. *Pseudomonas aeruginosa* otochondritis complicating localized cutaneous leishmaniasis: prevention of mutilation by early antibiotic therapy. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75: 270-2.
16. Vouldoukis I, Rougier S, Dugas B, Pino P, Mazier D, Woehrlé F. Canine visceral leishmaniasis: comparison of in-vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Vet Parasitol* 2006; 135: 137-46. [CrossRef]
17. Anquetin G, Rouquayrol M, Mahmoudi N, Santillana-Hayat M, Gozalbes R, Greiner J, et al. Synthesis of new fluoroquinolones and evaluation of their in-vitro activity on *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp. *Bioorg Med Chem Lett* 2004; 7: 2773-6. [CrossRef]



# Adana İli Gıda Çalışanlarında *Giardia* ve *Cryptosporidium* Prevalanslarının Farklı Yöntemler ile Araştırılması

Investigation of *Giardia* and *Cryptosporidium* Prevalence with Different Methods in Adana Food Workers

Özlem Bayramoğlu, Deniz Pekmezci, Fesem Başarı

Adana Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürlüğü, Adana, Türkiye

## ÖZET

**Amaç:** *Giardia* ve *Cryptosporidium* spp.'nin gıda kaynaklı salgınlarda başlıca etken olmalarından dolayı gıda çalışanlarda taşıyıcılığın tespiti halk sağlığını korumak açısından oldukça önemlidir. Ancak taşıyıcılarda nativ-lugol, asit-fast boyama gibi rutin yöntemler ile yalnızca negatif sonuçlar rapor edilebilmektedir. Çalışmamızda gıda çalışanlarında *Giardia* ve *Cryptosporidium* tanısında kullanılan farklı analizlerin karşılaştırmasını yaparak portör taramasına uygun olan yöntemi tespit etmek amaçlanmıştır.

**Yöntemler:** Laboratuvarımıza portör taraması için başvuran 500 gıda çalışanının dışkı örneklerinden nativ-lugol ve Kinyoun asit fast boyama yöntemleri ile mikroskopik inceleme, Direkt flouresan antikor testi (DFA) ve immunokromatografik test ile *Giardia* ve *Cryptosporidium* antijen araması yapılmıştır.

**Bulgular:** Çalışma sonucunda *Giardia* spp. nativ-lugol inceleme yöntemi immunokromatografik test ve DFA testi ile sırasıyla örneklerin 13'ünde (%2.6), 8'inde (%1.6), 24'ünde (%4.8) saptanırken, *Cryptosporidium* spp. tespit edilmemiştir. DFA testi referans yöntem olarak alındığında *Giardia* spp. tespitinde, nativ-lugol yöntemi ile immunokromatografik yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %54.1, %100 ile %33.3, %100 olarak bulunmuştur.

**Sonuç:** Çalışmamızda immunokromatografik yöntemin duyarlılığını düşük bulmamız gıda çalışanlarında taşıyıcılığın tespiti için uygun bir test olmadığı düşündürmüştür. Nativ-lugol yönteminin diğer parazitleri de tespit edebilmesi sebebiyle portör taramasında mutlaka uygulanması gerektiği ve bu yöntem ile *Giardia* ve *Cryptosporidium* için negatif bulunan hastaların, duyarlılığı daha yüksek olan bir immunodiagnostik test ile doğrulanması gerektiği sonucuna varılmıştır. (*Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2013; 37: 4-8)

**Anahtar Sözcükler:** Gıda çalışanı, *Giardia*, *Cryptosporidium*

**Geliş Tarihi:** 05.03.2012

**Kabul Tarihi:** 30.11.2012

## ABSTRACT

**Objective:** Carriage detection in food workers is very important in protecting public health from *Giardia* and *Cryptosporidium* infections which are two of the major causes of food borne outbreaks. However, false negative results can be reported with routine methods such as native-lugol and acid-fast staining in the carriers. In this study, we aimed to determine the appropriate method for carrier screening by comparison of the different analyses used in the diagnosis of *Giardia* and *Cryptosporidium* in food workers.

**Methods:** Stool specimens of 500 food worker who applied to our laboratory for carrier screening were investigated by routine microscopic examination with native-lugol and Kinyoun acid-fast stain method and searched for *Giardia* and *Cryptosporidium* antigens with Direct Fluorescent Antibody (DFA) and immunochromatographic assay.

**Results:** As a result of the study, *Giardia* spp. was detected with native-lugol staining method, immunochromatographic assay and DFA assay as 13 (2.6%), 8 (1.6%), 24 (4.8%) respectively of specimens whereas *Cryptosporidium* spp. was not determined. When DFA assay was considered the reference method, sensitivity and specificity of the native lugol method and immunochromatographic assay were found to be 54.1%, 100% and 33.3%, 100% respectively.

**Conclusion:** In our study, we were found low sensitivity of immunochromatographic method and it is inappropriate as a test for detecting carriers in food workers. We concluded that, to be able to detect other parasites, the native-lugol method must be performed for screening

**Yazışma Adresi / Address for Correspondence:** Dr. Özlem Bayramoğlu, Adana Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürlüğü, Adana, Türkiye

Tel: +90 322 459 17 02 E-posta: ozlebay@yahoo.com

doi:10.5152/tpd.2013.02

carriers, and patients who were found *Giardia* and *Cryptosporidium* negative by this assay should be confirmed with more sensitive immunodiagnostic method. (*Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2013; 37: 4-8)

**Key Words:** Food worker, *Giardia*, *Cryptosporidium*

**Received:** 05.03.2012

**Accepted:** 30.11.2012

## GİRİŞ

*Giardia* ve *Cryptosporidium* tüm dünyada diyarenin başlıca etkeni olmalarının yanısıra su ve gıda kaynaklı enfeksiyona en çok neden olan protozoonlardır (1). Enfeksiyonları az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere önemini halen korumaktadır. Toplumda sporadik vaka olarak sıklıkla görülmekle birlikte, çok önemli salgınlara da yol açabilmektedirler (2).

Başlıca fekal-oral yol ile bulaşan *Giardia* ve *Cryptosporidium* akut dönemde karın ağrısı, diyare, bulantı kusma gibi semptomlar ile görülmektedirler. *Giardia* spp.'nin kronik enfeksiyonunda gelişen malabsorbsiyon özellikle çocuklarda büyüme ve gelişme geriliğine sebep olmaktadır. *Cryptosporidium* spp. ise sağlıklı kişilerde asemptomatik veya hafif enfeksiyonlara sebep olurken immünsüpresyonlu veya yaşlı kişilerde ağır seyirli diyare, pankreas, safra, solunum yolu enfeksiyonlarına neden olarak ölümlerle de sonuçlanabilmektedir (3, 4).

Ülkemizde parazit prevalansında yıllara göre düşüş görülmekle birlikte önemli bir halk sağlığı sorunu olarak varlığını devam ettirmektedir (5). *Giardia* ve *Cryptosporidium* spp. ile enfekte olan kişilerde asemptomatik taşıyıcılık gelişebilmektedir ve bu kişiler sürekli kist yayarak enfeksiyonun insanlara ve çevreye bulaşmasında önemli rol oynamaktadırlar (4, 6, 7). Parazitlerin bulaşması ve yayılması açısından gıdaların üretim, taşıma, satış işlerinde çalışan kişilerdeki taşıyıcılık, bu kişilerde semptom olmadığından dolayı gizli kalmakta ve toplum sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmaktadır (8). Bu parazitlerin enfeksiyona yol açan kist veya ookist sayılarının düşük olması ve dış ortamda aylarca canlı kalabilmeleri nedeniyle taşıyıcıların gıda kaynaklı bulaşma ve salgınları önlemek için mutlaka tespit edilerek tedavilerinin yapılması gereklidir (9, 10). Ülkemizde gıda sektöründe çalışanların 6 ay ara ile barsak parazitleri açısından düzenli olarak kontrollerinin yapılması yasal bir zorunluluktur (11).

*Giardia* ve *Cryptosporidium* halk sağlığı açısından önemli protozoonlar olmakla birlikte asemptomatik taşıyıcı olan kişilerde tespiti için kullanılan rutin tanı metodları yetersiz kalmaktadır (12). *Giardia* kist formunun aralıklı olarak ve farklı sayılarda dışkıya salınması nedeniyle nativ-lugol incelemesi ile %10-50 oranında yanlış negatif sonuç verilebilmektedir. *Cryptosporidium* ookistlerinin sayısının asemptomatik bireylerde oldukça az olması, değişken boyanmaları ve küçük boyutlu olmalarından dolayı Kinyoun asit fast boyama ile saptanması oldukça farklılık göstermektedir (3, 13). Son yıllarda yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmaları nedeni ile antijen tarama testleri olan Direct Fluoresan Antibody (DFA) testi, Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ve immunokromatografik testler gibi immunodiagnostik testler en çok tercih edilenler arasında yer almıştır (3, 7, 14). Ancak ülkemizde bu yöntemler semptomatik olan hastalarda tanı amaçlı kullanılmakta, portör analizi amacıyla dışkıda parazit incelemesi sadece nativ lugol yöntemi ile yapılmaktadır (15-17).

Biz bu çalışmada portör taraması için başvuran kişilerde *Giardia* ve *Cryptosporidium* spp. tanısında kullanılan nativ-lugol boyama,

Kinyoun asit fast boyama, DFA ve immünokromatografik yöntemlerin karşılaştırmasını yaparak rutin çalışmalara uygun olan yöntemi tespit etmeyi amaçladık.

## YÖNTEMLER

Çalışmaya 01.04.2011 ve 30.06.2011 tarihleri arasında laboratuvarımıza portör taraması için başvuran Adana ilinin farklı bölgelerinden gelen ve hiçbir semptomu olmayan 500 gıda sektörü çalışanının dışkı örnekleri alınmıştır. Çalışma hakkında kişilere sözlü bilgi verilip gönüllü katılımları sağlanmıştır. Alınan dışkı örneklerinden nativ-lugol boyalı preparat ile rutin mikroskopik inceleme, Kinyoun asit fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* spp. araştırılması, DFA testi (Crypto/*Giardia* cel, Cellabs Pty Ltd, Australia) ve immünokromatografik test (Certest Crypto-*Giardia* Blister test, Certest Biotec, Spain) ile *Giardia* ve *Cryptosporidium* antijen araması yapılmıştır (18-21).

### Örneklerin Hazırlanması

Vida kapaklı dışkı kaplarına alınan örnek 30 dakika içinde işleme alınmıştır. Dışkı örneğinin bir kısmı formol içeren parazit yoğunlaştırma tüpüne (DiaSys Ltd,UK) aktarılmış ve üzerine 1/3 oranında eter eklenerek formol eter çöktürme yöntemi ile konsantre edilmiştir (22). Örneğin diğer bir kısmı immünokromatografik test için kit içerisinde bulunan örnek toplama tüpüne konulmuştur.

### Nativ-Lugol Boyalı Preparat

Formol eter çöktürme yöntemi ile konsantre edilen örnek ile hazırlanan preparat ışık mikroskopunda x10 ve x40 büyütme objektif ile incelenmiştir.

### Kinyoun Asit Fast Boyama

Konsantrasyon sonrası sedimentten hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda x100 objektif ile incelenerek 4-6 µm pembe-kırmızı boyanan *Cryptosporidium* ookistleri araştırılmıştır.

### İmmünokromatografik Test

Çalışmaya alınan dışkı örneklerinde kalitatif olarak *Giardia* ve/veya *Cryptosporidium* antijenlerini saptayabilen test ile analiz yapılmıştır. Kit içinde bulunan örnek toplama tüpüne alınan dışkı numunesi üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. Test sonuçları çalışma bittikten sonra 10 dakika içinde okunmuştur. Kontrol bölgesinde bulunan yeşil renkte bant oluşumu gözlemlendikten sonra mavi renkte *Giardia* sonuç çizgisi, kırmızı renkte *Cryptosporidium* sonuç çizgisinin oluşması gözlenmiştir (20).

### DFA Testi

Analiz *Giardia* kist ve *Cryptosporidium* ookistlerini birlikte saptayabilen DFA kiti ile yapılmıştır. Çalışma için 3 kuyucuklu teflonlu lamalar kullanılmıştır. 10 µL konsantre örnek ince bir tabaka halinde kuyucuğa yayılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda test uygulanmıştır. Tüm kuyucuklar kapatma solüsyonu ile kaplandıktan ve lamel ile kapatıldıktan sonra 2-8°C'de karanlıkta saklanarak 1 saat içinde incelemeye alınmıştır. Her bir kuyucuk fluoresan mikroskopta (490 nm eksitasyon, 530 nm emisyon filtreleri ile) x10 ve x100 objektifte taranmıştır. Siyah zeminde parlak yeşil fluoresan veren 2-6 µm boyutunda oval veya yuvarlak şekil-



**Tablo 1.** DFA yöntemine göre dışkı örneğinde *Giardia* spp. saptamasında tanı testlerinin performans değerlendirme sonuçları

Testler	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Pozitif prediktif değer (%)	Negatif prediktif değer (%)
Nativ-lugol	54.1	100	100	97.7
İmmunokromatografik test	33.3	100	100	96.7

de olan kistler *Cryptosporidium* ookisti, 8-12 µm boyutlarında ve elips şeklinde olan kistler *Giardia* kisti olarak değerlendirilmiştir. Kit içerisinde bulunan pozitif kontrol slaydı ile açılan her yeni kütudan çalışma uygulanarak kitin kalite kontrolü yapılmıştır (21).

Direct Flouresan Antibody analizi sırasında 10 µL örneğin konulduğu kuyucuğun tüm alanında görülen toplam *Giardia* kistleri sayılmış ve her hasta için kaydedilmiştir. Hastalar, tespit edilen kist sayısına göre 1-10 arasında ise 1 pozitif, 11-20 ise 2 pozitif, 21-30 arasında ise 3 pozitif, >30 ise 4 pozitif olarak sınıflandırılmıştır (23). Aynı hastaların diğer yöntemler ile elde edilen sonuçları kaydedilmiştir. Duyarlılık ve özgüllük hesaplamalarında DFA testi referans yöntem olarak alınmıştır (3, 13, 24).

## BULGULAR

Çalışmaya alınan 500 gıda çalışanının 151'i (%30.2) bayan, 349'u (%69.8) erkek ve yaş ortalamaları 32 (18-55) olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda *Giardia* spp. direkt mikroskopik inceleme ile 13'ünde (%2.6), immunokromatografik test ile 8'inde (%1.6), DFA testi ile 24'ünde (%4.8) saptanırken, *Cryptosporidium* spp. örneklerin hiçbirinde tespit edilmemiştir.

Direct Flouresan Antibody test referans yöntem olarak alındığında dışkı örneğinde *Giardia* spp. tespitinde nativ-lugol yönteminin duyarlılığı %54.1, özgüllüğü %100, immunokromatografik yöntemin sırasıyla %33.3 ve %100 olarak bulunmuştur. Testlerin pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Direct Flouresan Antibody testi ile 10 µL örneğin bulunduğu kuyucukta tespit edilen *Giardia* kist sayısına göre sınıflandırma yapıldığında; 1-10 kistin görüldüğü ve 1 pozitif olarak değerlendirilen 7 hasta diğer iki yöntem ile negatif olarak bulunmuştur. İmmunokromatografik test ile sadece 4 pozitif olan 10 hasta saptanabilmiştir. Yapılan sınıflandırmada diğer yöntemler ile tespit edilen hasta sayısı Tablo 2'de verilmiştir.

## TARTIŞMA

Yapılan çalışmalarda DFA testi giardiazisde referans yöntem olarak tanımlanmıştır ve diğer parazitler ile çapraz reaksiyon tespit edilmemiştir. Aynı zamanda DFA testi ile *Giardia* ve *Cryptosporidium* birlikte araştırılabildiği için kısa sürede iki parazite ilişkin sonuç verilebilmesinin avantaj olduğu belirtilmiştir (3, 13, 25).

Çalışmamızda 500 gıda çalışanının dışkı örneğinde nativ lugol preparat incelemesi ile 13'ünde (%2.6), immunokromatografik test ile 8'inde (%1.6), DFA testi ile 24'ünde (%4.8) *Giardia* spp. saptanmıştır. *Cryptosporidium* spp. örneklerin hiçbirinde tespit edilmemiştir. Araştırmamızda DFA testi referans yöntem olarak kabul edildiğinde *Giardia* spp. tanısında direkt mikroskopik inceleme yönteminin duyarlılığı %54.1 özgüllüğü %100 olarak belirlenmiştir. Kuştımur ve ark. (26) duyarlılığı %30,8 özgüllüğü %99,8, Alles ve ark. (27) sırasıyla %66,4, %100 olarak tespit etmişlerdir.

**Tablo 2.** DFA testi ile *Giardia* kisti yoğunluğuna göre ayrılan gruplarda diğer yöntemler ile pozitif bulunan hasta sayısı

Hasta*	DFA	Nativ- lugol	İmmunokromatografik test
1 pozitif	7	-	-
2 pozitif	3	1	-
3 pozitif	4	2	-
4 pozitif	10	10	8
Toplam	24	13	8

\*DFA testi ile örneğe ait kuyucuktaki tüm alanda;  
1 pozitif-1-10 kist  
2 pozitif-11-20 kist  
3 pozitif-21-30 kist  
4 pozitif->30 kist

Özkan ve ark. (25) DFA testi ile pozitif olarak saptadıkları 29 dışkı örneğinin sadece 17'sinde nativ-lugol yöntemi ile pozitiflik bulunmuşlardır. Benzer olarak araştırmamızda DFA testi ile 24 dışkı örneğini pozitif olarak bulurken bu hastaların 13'ünde nativ-lugol yöntemi ile *Giardia* spp. tespit edilmiştir. Giardiazisli hastalarda nativ lugol gibi rutin tanı metodları bu organizmayı tespit etmekte yetersiz kalmaktadır.

Portör taraması için kurumumuza başvuran ve şikayeti olmayan kişilerde *Giardia* spp. tespiti için uyguladığımız immunokromatografik testin duyarlılığının %33,3, özgüllüğünün %100 olduğu çalışmamızda belirlenmiştir. Gastrointestinal sistem şikayeti olan hastalarda yapılan çalışmalarda Oster ve ark. (28) %58 ve %99, Johnston ve ark. (13) %81.3 ve %99.5, Weitzel ve ark. (29) %44.4 ve %100 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda immunokromatografik test ile duyarlılığın düşük olma sebebinin çalışma grubunun asemptomatik kişilerden oluşmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Kist sayısının az olması testin duyarlılığını azaltmakta ve yalancı negatifliklere sebep olmaktadır.

Bağırsak parazitlerinin bulaşması açısından gıdaların üretim, işleme, saklama ve sunma zincirinde en önemli halkayı gıda çalışanları oluşturmaktadır. Ülkemizde gıda çalışanlarında *Giardia* spp. prevalansı bölgelere göre oldukça değişkenlik göstermektedir. Direkt mikroskopik inceleme yöntemi ile Malatya'da %2, Aydın'da %1.7, Mersin'de %3.2, Ordu'da %3.4, Tokat'da %2.8, Manisa'da %24.6, Van'da %2.84, Şanlıurfa'da %26.8 olarak görülmüştür (8, 15-17, 30-33). Bölgeler arasındaki farklılığın sosyoekonomik düzey, kültür, altyapı gelişmişliği ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Ancak bu çalışmalar duyarlılığı düşük olan direkt mikroskopik incelemeye dayalı olduğu için prevalans sonuçları olduğundan daha düşük görünmektedir. Çalışmamızda nativ-lugol yöntemi ile saptadığımız %2.6 *Giardia* spp. pozitiflik sonucunun bölgemiz ve çevresi ile uyumlu olduğu görülmüştür. DFA testi ile aynı çalışma grubunda saptadığımız %4,8 oranı rutin dışkı bakı yöntemi sırasında hastaların bir kısmına yalancı negatif sonuç verilmesinden

dolayı tedavi olmadıklarının ve bu kişilerin toplumu riske etmeye devam ettiklerini düşündürmüştür.

Araştırmamızda dışkı örneklerinden *Cryptosporidium* tanısı için yapılan Kinyoun asit fast boyama, DFA ve immünokromatografik yöntemler ile pozitiflik saptanmamıştır. Garcia ve ark. (12) *Cryptosporidium* spp. ile enfekte semptomatik bireylerin dışkı kısmında çok sayıda ookist bulunduğunu ve akut enfeksiyonun iyileşme döneminde veya hastalar asemptomatik olduklarında bu sayının dramatik bir şekilde azaldığını belirtmişlerdir. İşhal şikayeti olan hastalar ile yapılan araştırmalarda modifiye asit fast boyama ile %1.95-%11.8, semptomatik olmayan kişilerde ise %1.14-%3.1 arasında prevalans bildirilmiştir (6, 34-36). Tamer ve ark. (37) lösemi ve lenfomalı çocuklarda cryptosporidiasis prevalansı araştırmasında ishali olan grupta Kinyoun asit fast boyama ile %7.86 ELISA ile %12.35 saptarken, ishali olmayan kontrol grubunda tespit etmemişlerdir. Farklı bir çalışmalarında ishali olan erişkin grupta Kinyoun asit fast boyama ile %3.8 ELISA ile %6.25 bulunmuş, kontrol grubunda görülmemiştir (38). Çalışmamızda *Cryptosporidium* pozitifliği saptamama nedeni olarak araştırma grubumuzun hiçbir semptomu olmayan kişilerden oluşmasından kaynaklandığı sonucuna vardık. Ayrıca, mikroskopik yöntemle *Cryptosporidium* spp. tanısı koymak özellikle dışkıda az sayıda ookist olduğunda zordur. Özkan ve ark. (25) 272 dışkı örneğinde DFA testi uyguladıklarında 4'ünde (%1.5) *Cryptosporidium* ookistleri saptarken, mikroskopik inceleme yönteminde tespit etmemişlerdir.

Yapılan araştırmalarda *Cryptosporidium* spp. tanısı için modifiye asit fast boyama yönteminin duyarlılığı %54.8-%88.3 arasında, özgülüğü %98.7-%100 olarak bulunmuştur (12, 13, 27). İmmunokromatografik tanı testlerinin ise sırasıyla %67.6-%75 ve %98.5-%98.7 arasında olduğu bildirilmiştir (13, 29).

Çalışmamız sırasında DFA analizinde 10 µL dışkı örneğinde görülen toplam *Giardia* kist sayısına göre gruplandırma yapıldığında bu gruba giren hastaların mikroskopik inceleme ve immünokromatografik test ile saptanma oranında farklılıklar olduğu gözlenmiştir. DFA testi ile 1 pozitif (1-10 kist) olan 7 örnekte *Giardia* kisti diğer iki yöntem ile tespit edilmemiştir. İmmunokromatografik test yalnızca 4 pozitif olan gruptaki hastalarda pozitif sonuç verebilmiştir. DFA testi ile pozitif bulunan hastaların dışkı örneğinde *Giardia* kist sayısı azaldıkça diğer testler ile saptanma oranının düştüğü görülmüştür. Bu düşüş dışkıda kist sayısının az olduğu durumlarda mikroskopik inceleme ve immünokromatografik test duyarlılığının neden az olduğunu da açıklamaktadır. Benzer çalışma olarak Johnston ve ark. (13), Garcia ve ark. (14) *Giardia* ve *Cryptosporidium* spp. tanısında örnekteki organizma sayısının mikroskopik inceleme ve immünokromatografik testin duyarlılığı için çok önemli olduğuna dikkat çekmişlerdir.

## SONUÇ

Portör taraması için başvuran gıda çalışanlarında immünokromatografik yöntemin uygun bir test olmadığı düşünölmüştür. Nativlugol yönteminin diğer parazitleri tespit edebilmesi sebebiyle portör taramasında mutlaka uygulanması gerektiği ve bu yöntem ile *Giardia* ve *Cryptosporidium* için negatif sonuç bulunan hastaların duyarlılığı daha yüksek olan immünoagnostik test ile doğrulanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

## Teşekkür

Bu çalışma RSHMB Bilim Kurulu tarafından desteklenmiştir (06.08.2009/2150). Çalışmaya katkılarında dolayı Prof Dr. Mustafa Ertek ve Doç. Dr. Ayşegöl Taylan Özkan'a teşekkür ederiz.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Smith HV, Caccio SM, Cook N, Nicholas RAB, Tait A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet Parasitol* 2007; 149: 29-40. [CrossRef]
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC)- Foodborne outbreak online database: <http://www.cdc.gov/tr/foodborneoutbreaks/Default.aspx>.
3. Uyar Y, Taylan Ozkan A. [Antigen detection methods in diagnosis of amebiasis, giardiasis and cryptosporidiosis]. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2009; 33: 140-50.
4. Ok ÜZ, Balcıoğlu İC. Cryptosporidiosis. Özcel MA editör. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. İzmir, Türkiye Parazitoloji Derneği; 2007; 363-82.
5. Çulha G, Gülkan B. 2006-2010 yıllarında Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımları. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2011; 68: 165-74.
6. Direkel ř, Özerol İH, Durmaz R. İşhali hastalarda *Cryptosporidium parvum*'un ELISA ve modifiye Erlich-Ziehl-Neelsen boyama yöntemleriyle araştırılması. *Mersin Univ Sağlık Bilim Derg* 2008; 1: 20-5.
7. Ak M, Türk M, Güneş K. Giardiasis. Özcel MA editör. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. İzmir, Türkiye Parazitoloji Derneği; 2007. s.323-44.
8. Kurtoğlu MG, Körkoca H, Çiçek M, Cengiz ZT. [Prevalence of intestinal parasites among workers in food sector in Van region]. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2007; 31: 309-12.
9. Putignani I, Menichella D. Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2010;2010. doi:pii: 753512.
10. Almeida A, Pozio E, Caccio M. Genotyping of *Giardia duodenalis* cysts by new real-time PCR assays for detection of mixed infections in human samples. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 1895-901. [CrossRef]
11. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Portör muayenelerine esas laboratuvar tetkikleri. 27.01.2005; sayı B100TSH0150005/1059.
12. Garcia LS, Shimizu RY, Bernard CN. Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the triage parasite panel enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3337-40.
13. Johnston SP, Ballard MM, Beach MJ, Causser L, Wilkins PP. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 623-6. [CrossRef]
14. Garcia LS, Shimizu RY, Novak S, Carroll M, Chan F. Commercial assays for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens by rapid solid phase qualitative immunochromatography. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 209-12. [CrossRef]
15. Ataş AD, Kuşcuoğlu S. [Distribution of intestinal parasites detected in the Tokat public health laboratory during the period from January 2007 - December 2009]. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2010; 34: 161-5.
16. Delialioğlu N, Aslan G, Öztürk C, Kaya A, Ersöz G. Gıda çalışanlarında gıda kaynaklı hastalık etkenlerinin ve taşıyıcılık durumunun değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2003; 60: 19-22.
17. Aycan ÖM, Atambay M, Karaman Ü, Miman Ö, Daldal N. Malatya'da gıda ile uğraşan bir şirketin personeline bağırsak parazitlerinin araştırılması. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2008; 15: 99-101.
18. Kilimciöğlu AA, Ok ÜZ. Makroskopik inceleme ve taze dışkı incelemeleri. Korkmaz M, Ok ÜZ editörler. Parazitolojide laboratuvar. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği, 2011: 17-22.
19. Turgat N. Özel boyama yöntemleri. Korkmaz M, Ok ÜZ editörler. Parazitolojide laboratuvar. İzmir: Meta basım; 2011. s.37-40.

20. Certest Biotec. Certest Crypto-Giardia blister test. <http://www.certest.es/instrucciones/Crypto-Giardia/N%20Instrucciones/IU-%20rev.03.pdf>.
21. Cellabs. Crypto/Giardia Cel. <http://cellabs.com.au/products/LR2v12.pdf>.
22. Kilimcioğlu AA, Ok ÜZ. Yoğunlaştırma yöntemleri. Korkmaz M, Ok ÜZ editörler. Parazitolojide laboratuvar. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği, 2011: 23-8.
23. Garcia LS, Shum AC, Bruckner DA. Evaluation of a new monoclonal antibody combination reagent for direct fluorescence detection of *Giardia* cysts and *cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens. J Clin Microbiol 1992; 30: 3255-7.
24. Centers for Disease Control and Prevention (CDC)- Diagnostic procedures for stool specimens: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/DiagnosticProcedures.htm>.
25. Özkan AT, Mungan M, Kılıç S, Babür C, Demireken F, Esen B. *Giardiasis* tanısında *Giardia/Cryptosporidium* DFA yönteminin kullanımı. IV. Ulusal Sindirim yolu ile Bulaşan İnfeksiyonlar Simpozyumu; Mayıs, 16-20; Mersin-Türkiye: 2005. 344.
26. Kuştımur S, Al FD, Tuncer C, amurdan AD, Dalgıç B, Alagözlü H, ve ark. Gastrointestinal yakınmaları olan hastalarda bazı protozoonların farklı tanı yöntemleriyle araştırılması. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2009; 29: 1260-6.
27. Alles AJ, Waldron MA, Sierra LS, Mattia AR. Prospective comparison of direct immunofluorescence and conventional staining methods for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in human fecal specimens. J Clin Microbiol 1995; 33: 1632-4.
28. Oster N, Gehrige-Feistel H, Jung H, Kammer J, McLean JE, Lanzer M. Evaluation of the immunochromatographic CORIS Giardia-Strip test for rapid diagnosis of *Giardia lamblia*. Eur J Clin Microbiol 2006; 25: 112-5. [CrossRef]
29. Weitzel T, Dittrich S, Möhl I, Adusu E, Jelinek T. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 656-9. [CrossRef]
30. Yazici V, Siriken F, Ertabaklar H, Ertuğ S. [Investigation of intestinal parasites in food workers in hospitals in Aydın, Turkey]. Türkiye Parazitoloj Derg 2007; 31: 136-8.
31. Karaman U, Turan A, Depecik F, Geit I, Ozer A, Karcı E, et al. [Frequency of intestinal parasites among administrators and workers in sanitary and non-sanitary institutions]. Türkiye Parazitoloj Derg 2011; 35: 30-3. [CrossRef]
32. Gündüz T, Limoncu ME, Cümen S, Ari A, Serdağ E, Tay Z. The prevalence of intestinal parasites and nasal *S. aureus* carriage among food handlers. J Environ Health 2008; 70: 64-7.
33. şimşek Z, Koruk I, opur A, Gürses G. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and intestinal parasites among food handlers in şanlıurfa, Southeastern anatolia. J Public Health Mang Pract 2009; 15: 518-23.
34. iek M, Yılmaz H. İşhalli ocuklarda *Cryptosporidium* spp. ve diğer barsak parazitlerinin yaygınlığı. Dicle Tıp Derg 2011; 38: 70-5.
35. Böreki G, Otağ F, Emekdaş G. Mersin'de bir gecekondulu mahallesinde yaşayan ailelerde *Cryptosporidium* prevalansı. İnfeksiyon Dergisi 2005; 19: 39-46.
36. Yılmaz H, Cengiz ZT, iek M. Investigation of Cryptosporidiosis by enzyme linked immunosorbent assay and microscopy in children with diarrhea. Saudi Med J 2008; 29: 526-9.
37. Tamer GS, Balıķi E, Erbay A. [The prevalence of cryptosporidiosis in children who were diagnosed with leukemia and lymphoma]. Türkiye Parazitoloj Derg 2008; 32: 192-7.
38. Tamer GS, Gülen S. [The investigation of the presence of antibodies for *Cryptosporidium* spp. in fecal samples using ELISA]. Türkiye Parazitoloj Derg 2008; 32: 198-201.



# *Cryptosporidiosis*'in Serolojik ve Mikroskopik Tespiti ve İçme Sularının Ookist Yönünden İncelenmesi

Investigation of *Cryptosporidiosis* by Serologic and Microscopic Method and Examination of Tap Water Samples for Oocysts

Cihangir Akdemir

Dumlupınar Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, Kütahya, Türkiye

## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne karın ağrısı, mide bulantısı, kusma ve ishal gibi çeşitli gastrointestinal sistem şikâyetlerle müracaat eden hastalarda *cryptosporidiosis* araştırılmıştır. Araştırma süresince evlerden ve şehirdeki muhtelif çeşmelerden alınan su örnekleri *Cryptosporidium* spp. ookistleri yönünden incelenmiştir.

**Yöntemler:** Dışkılar Kinyoun karbol fuksin boyasıyla boyanmış ve ookist yönünden incelenmiştir. Mikroskopisi yapılan dışkılarından birer numune porsiyonlanarak usulüne uygun muhafaza edilmiştir. Dışkıda antijenik teşhis için dondurulmuş örnekler, muhafaza edildiği ependorf tüplerden çıkarılarak bir defada çözümleri sağlanmış ve Elisa testi ile (Ridascreen® *Cryptosporidium* R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany) *Cryptosporidium* spp. antijenleri yönünden araştırılmıştır. Çalışmada 30 adet 10 lt'lik su örneği vakum pompası ile (0.45 mµ) süzülmuş ve filtratlar Kinyoun karbol fuksin boyası ile boyandıktan sonra mikroskopta incelenmiştir.

**Bulgular:** Toplam 146 hastaya ait dışkıların Kinyoun karbol fuksin ile boyanarak incelenmesiyle 4'ünde (%2.7) ookist gözlenmiştir. Aynı örneklerin ELISA ile araştırılmasında ise 5'i (%3.4) pozitif değerlendirilmiştir. Mikroskopik inceleme ile ookist bulunan 4 örnek ELISA yöntemiyle de pozitif belirlenmiştir. İçme sularının incelenmesinde sadece bir örnekte (%3.3) ookist tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Kütahya'da *cryptosporidiosis*'in yayılımı %3.4 olarak belirlenmiş, kullanılan teşhis yöntemleri, cinsiyet ve yaş faktörü ( $p>0.05$ ) anlamlı bulunmamıştır. Su örneklerinin %3.3'ünde (1/30) ookist tespit edilmiş olması hastalığın epidemiyolojisine başka faktörlerin de etkili olabileceğini düşündürmüştür. (*Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2013; 37: 9-12)

**Anahtar Sözcükler:** *Cryptosporidiosis*, epidemiyoloji, su

**Geliş Tarihi:** 29.02.2012

**Kabul Tarihi:** 28.11.2012

## ABSTRACT

**Objective:** This study surveyed the prevalence of *cryptosporidiosis* in patients who were treated in Dumlupınar University Medical Faculty Hospital for various gastrointestinal complaints such as abdominal pain, nausea, vomiting and diarrhea. Water samples were taken from various homes and fountains.

**Methods:** Stool samples were investigated for the presence of oocysts with Kinyoun's carbol fuchsin staining method. After microscopic analysis, samples were preserved. These frozen samples were thawed promptly for antigenic diagnosis (Ridascreen®, R-Biopharm AG, Darmstadt Germany). Thirty units of ten-liter water samples were filtered by a vacuum pump (45 µm). Filtered materials were stained through Kinyoun's carbol fuchsin staining method and examined.

**Results:** Stool samples taken from a total of 146 patients were examined for oocyst presence and 4 individuals (2.7 percent) were found to be positive. Elisa tests of the same samples proved 5 individuals (3.4 percent) as positive for specific antigens. Only one water sample was diagnosed as positive for oocysts.

**Conclusion:** *Cryptosporidiosis* was found to be present in 3.4 percent of this group of people, and the distribution of infection among subjects was understood to be not statistically meaningful by gender, age and identification methods ( $p>0.05$ ). Finding of oocysts in only one sample out of 30 (3.3%) led to a need for reconsideration of other causal factors in the epidemiology. (*Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2013; 37: 9-12)

**Key Words:** *Cryptosporidiosis*, epidemiology, water

**Received:** 29.02.2012

**Accepted:** 28.11.2012

**Yazışma Adresi / Address for Correspondence:** Dr. Cihangir Akdemir, Dumlupınar Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, Kütahya, Türkiye

Tel: +90 274 265 20 31 E-posta: cakdemir@dumlupinar.edu.tr

doi:10.5152/tpd.2013.03

## GİRİŞ

*Cryptosporidium* türleri insanların da içinde bulunduğu evcil-yabani birçok canlının öncelikle sindirim sistemi epitel hücre mikrovilluslarına invaze olan, ookistleri yuvarlağımsı, yaklaşık 4-7 µm çapında, içinde 4 sporozoit bulunduran, monoxen, apikompleksan protozoonlardır. İmmün sistemi baskılanmış kişilerde akciğer, özefagus, mide, karaciğer, pankreas, safra kesesi, duodenum, kolon, rektum, ortakulak ve konjunktivaya da yerleşebilmektedir (1).

Parazitin zoonoz özelliği ve fekal-oral yol kullandığı bilinmekle beraber insandan insana içme suyu ve gıda maddeleriyle bulaşabileceği ve salam, sucuk, sakatat ve çiğ süt gibi tüketim maddelerinin de rolü olduğu bildirilmiştir (2). Olguların yaklaşık %10'unun gıdalardan kaynaklandığı ve nazokomiyal enfeksiyon etkeni olduğu da ifade edilmiştir (3, 4).

Günümüze kadar bildirilen *Cryptosporidium* türlerinden en az 8'inin (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis*, *C. muris* ve *C. andersoni*) ve 40'dan fazla genotipten 7'sinin insanları direkt, bir kısmının ise rastlantısal olarak enfekte ettiği bildirilmiştir (5). *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis* ve *C. rabbit* genotipleri insanlarda patojen olarak değerlendirilmiş, coğrafik şartlara göre değişmekle birlikte enfeksiyonların ana unsuru olarak *C. parvum* ve *C. hominis*'e dikkat çekilmiştir. *C. hominis* insandan insana, *C. parvum*'un ise hem insandan insana hem de hayvandan insana bulaştıran sorumlu tutulmaktadır (6, 7).

Enfeksiyonun 10 ookist alımıyla başlayabileceği, ileum ve jejunum tutulumu ile birlikte şiddetli diyare görülebileceği, hafif ateş, halsizlik, baş ve kas ağrıları, kuvvet ve iştah kayıplarının da hastalığın semptomları arasında olduğu ifade edilmiştir (8, 9). *Cryptosporidiosis*'den kaynaklı diyarenin bol, sulu mukuslu olduğu, lökosit ve eritrosit içermediği ve tedavi olmaksızın da hastalığın klinik belirtilerinin birkaç gün ve birkaç hafta arasında kendiliğinden geçebileceği bildirilmiş olmasına karşın, immün yetmezliklerde kolesistit, hepatit, pankreatit ve solunum sistemi enfeksiyonlarına da neden olabilmektedir (1, 8).

Çalışma Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine bulantı, kusma ve ishal gibi çeşitli gastrointestinal şikâyetlerle müracaat eden hastalarda *Cryptosporidium* spp.'nin araştırılması ve il merkezinden temin edilen içme sularının ookist yönünden incelenmesiyle gerçekleştirilmiştir.

## YÖNTEMLER

### Dışkı İncelemeleri

Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne bulantı, kusma, karın ağrısı ve ishal gibi çeşitli gastrointestinal sistem şikâyetleriyle 2009 Mayıs-2010 Eylül ayları arasında müracaat eden ve yaşları 1-79 arasında değişen toplam 146 (89♂,57♀) hastaya ait dışkıları *Cryptosporidium* spp. ookistleri yönünden incelendi.

Dışkı örneklerinin laboratuara kapaklı sızdırmaz steril kaplar içerisinde gelmesi sağlandı. İshalli olanlar ince bir fırça yardımıyla lama yayıldı ve havada kurumaya bırakıldı. Kıvamlı olanlarda ise formol etil asetat yöntemiyle çoklaştırma işlemi uygulandı ve elde edilen sedimentten yayma yapıldı. Kuruyan preparatlar boyama sehpasında üzerleri tamamen absolüt metanol ile kapatılarak bir dakika

beklendi ve tespitinin ardından alkolün süzülmesi sağlandı. Kinyoun karbol fuksin boyasıyla (bazik fuksin 4gr+etil alkol (%95) 20 mL+fenol 8 ml+distile su 100 mL) 5 dakika süreyle boyandı. Lam üzerinde kalan boyanın süzülmesi sağlandıktan sonra %50'lik etil alkolle boyanın fazlası giderilerek hafif akan musluk suyu ile yıkandı. Asit-alkolde (%1) 1-2 dakika bekletildi ve musluk suyu ile yıkanarak metilen mavisi bulunan şalede bir dakika süreyle boyandı ve tekrar musluk suyu ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Hazırlanan preparatlarda mikroskopun (Nikon 80i) 100x objektifinde mavimsi zeminde yaklaşık 4-7µm boyutlarında pembe-kırmızısı renkte, yuvarlak ve ovale değişen boyutlarda etkenler araştırıldı.

*Cryptosporidium* spp. ookistlerinin dışkıda antijenik teşhisi için porsiyonlanmış ve içine herhangi bir koruyucu madde konulmamış olan örnekler muhafaza edildiği ependorf tüpler içinde -80°C'lik dondurucudan (Revco®) çıkarıldı ve bir defada çözülmesi sağlandı. Test üreticisinin (Ridascreen® *Cryptosporidium* R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany) belirttiği şekilde dışkı örnekleri sulandırıldı. Çalkalayıcıda tamamen çözünmesi sağlandı ve 100 µL hacmindeki örnekler kuyucuklara ilave edildi. Pozitif ve negatif kontrollerin ilavesi ve gerekli inkübasyon aşama ve sürelerinin (konjugat ve substrat) tamamlanmasının ardından stop solüsyonu ilave edilerek 450 nm'de ELISA okuyucusunda okunarak sonuçlar değerlendirildi.

### İçme Suyu İncelemeleri

Hastalığın önemli bulaş yollarından biri olduğu kabul edilen içme sularının incelenmesi için Kütahya ilini örnekleyecek şekilde 30 ayrı noktadan numuneler temin edilmiştir. On litrelik temiz bidonlara alınan örnekler aynı gün içinde incelenmiştir. Numunelerin 20'si şebeke suyunu örneklemek için evlerden, 10'u ise farklı mahallelerde bulunan, Kütahya Belediyesine ait su tankerleri ile depolarına dolumu yapılarak halkın kullanımına sunulan ve yöresel adı 'İncik' olan çeşme sularının incelenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Türkmen Dağı'nın (1826 m) batı eteklerinden çıkan kaynak suyunun ilimizdeki muhtelif çeşmelerden su bidonlarına alınarak tüketilmesi nedeniyle incelemeye dâhil edilmiştir.

Su örnekleri 0.45 µm gözenekli selüloz asetat membran filtresi (Sartorius) monte edilmiş vakum pompasından geçirilerek süzülümüştür. Filtre üzerinde kalan partiküller aynı örneğinin 20 mL'si içerisinde yıkanmış ve bu yıkama suyu 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Dipteki çöküntü lam üzerine alınarak her bir örnek için 3 adet kalın yayma hazırlanmış ve Kinyoun karbol fuksin boyası ile boyanarak mikroskop altında (100X) incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar SPSS.13 programı ile değerlendirilmiştir.

## BULGULAR

Laboratuara getirilen dışkı örneklerinin boyanarak mikroskop altında incelenmesiyle 4'ünde (%2.7) ookist gözlenmiş, aynı örneklerin ELISA ile test edilmesinde ise 5'i (%3.4) pozitif olarak değerlendirilmiştir. Mikroskopik incelemede 13-25 ve 26 ve üzeri yaş gruplarında ikişer, spesifik antijen araştırılmasıyla ise 0-12 yaş grubunda bir, 13-25 ve 26 ve üzeri yaş gruplarında ikişer olguda ookist tespit edilmiştir.

Mikroskopik inceleme ile ookist bulunan 4 örnek ELISA yöntemiyle de pozitif değerlendirilmiş, 0-12 yaş grubunda ise bir örnek ELISA ile pozitif tespit edilmiş olmasına karşın mikroskopik yöntemle ookist tespit edilememiştir (Tablo 1).

**Tablo 1.** *Cryptosporidium* spp. ookisti saptanan hastalara ait yaş, cinsiyet ve test sonuçları

Yaş	Test Yöntemi		Cinsiyet		Toplam Olgu n=5
	Kinyoun Karbol F. Boyama Pozitif n=4 (%)	ELISA Testi Pozitif n=5 (%)	Kadın n=2	Erkek n=3	
0-12	– (00.00)	1 (20.00) ♀	1	–	1
13-25	2 (50.00) ♂♀	2 (40.00) ♂♀	1	1	2
26 ve üstü	2 (50.00) ♂♂	2 (40.00) ♂♂	–	2	2
Toplam	4	5	2	3	5

**Tablo 2.** İçme sularında *Cryptosporidium* spp. ookisti aranması

Örnek	Örnek Sayısı	Pozitif (n)	Negatif (n)
Şebeke Suyu	20	—	20 (%100)
İncik Suyu	10	1 (%10.0)	9 (%90.0)
Toplam	30	1 (%3.30)	29 (%96.7)

Şehir şebeke sularından alınan örneklerin incelenmesinde ookist bulunmamış, çeşmelerden (İncik Suyu) alınan örneklerin ise bir tanesinde (%10) olmak üzere genel olarak toplamda da bir numunede (%3.3) ookist tespit edilmiştir (Tablo 2).

## TARTIŞMA

*Cryptosporidiosis*'in yayılımı Ankara'da %1.6-5.6, Eskişehir'de ise %3.6-4.5, oranlarında bildirilmiştir (10-14). Kocaeli'nde lösemi ve lenfoma tanılı çocuklarda mikroskopi ile %7.86 serolojik yöntemle ise %6.25-12.35 oranında saptanmıştır (15, 16). Etken Bursa'da %0.6, İzmir'de ise %0.42 oranında bildirmiştir (17-19). Mersin'de ilköğrencilerinde %5.5 oranında bulunmuş, aynı ilde farklı bir çalışmada ise prevalansı %2.8 belirlenmiştir (20, 21). Adana'na mikroskobik yöntemle %5.2, ELISA ile ise %24.03 oranında saptanmış, enfeksiyonların %67.6'sının 0-12, %10.8'inin 13-30, %21.6'sının ise 30 ve üzeri yaş grubunda görüldüğünü bildirmiştir (22). Çalışmamızda olguların %20'si 0-12 yaş grubunda, %40'ar ise 13-25 ve 26 ve üzeri yaş gruplarında gözlenmiştir. Malatya'da ishallerde %1.6 oranında belirlenmiştir (23). Van'da, mikroskobik yöntemle %1.95, ELISA ile %4.9 oranında saptanmış aynı ilde mezba-ha çalışanlarında ise %1.14 oranında belirlenmiştir (24, 25).

İspanya'da seroprevalans %6.25, Filistin'de (Gazze) mikroskobik %14.9, ELISA ile ise %16.3 belirlenmiş ve kız çocuklarında enfeksiyon anlamlı şekilde yüksek bildirilmiştir (26, 27). Araştırmada parazitin varlığı ile cinsiyet faktörü arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Mısır'da mikroskopi ile %5.11, immünokromatografik olarak ise %5.88 oranında tespit edilmiştir (6). Venezuela'da prevalans %89, Peru'da ise enfeksiyon %1-2 oranında bildirilmiştir (28-30). Peru'da *C. hominis*'den kaynaklı antroponotik cryptosporidiosisin predominant olduğu ifade edilmiştir (30). Araştırmamızda etkenler *Cryptosporidium* spp. olarak belirlenmiş tür tayini yapılmamıştır.

Mersin'de içme sularının %11.36'sı, atık suların %21'i ve deniz suyu örneklerinin ise %2.85'inde ookist tespit edilmiştir (31). Van'da yüzeysel kaynak sularının %1.57'si, şebeke içme sularının

%0.82'si, kırsal bölge sularının %1.55'i ve şehir ve ilçe merkezlerindeki içme sularının ise %0.80'inde ookist olduğu bildirilmiştir (32). İlimizde şehir şebeke su örneklerinde ookist gözlenmemiş ancak depolarına dolmuş yapılmak suretiyle halkın kullanımına sunulan çeşmelerden alınan bir örnekte tespit (%10) edilmiştir.

## SONUÇ

Kütahya'da *Cryptosporidiosis* mikroskobik yöntemle %2.7, spesifik antijen aranmasıyla %3.4 oranında saptanmıştır. Araştırmacıların bildirdiklerine paralel olarak ELISA testinin duyarlılığının yüksek olması bir olgunun (%0.68) fark edilmesini sağlamıştır.

İlimizde hüküm süren karasal iklim özelliklerinin, etkenin canlılığını sürdürebilecek şartları kısıtladığını ve yayılımı azaltan bir bariyer oluşturduğunu düşündürmektedir. Şehir şebekesinden alınan örneklerde ookist tespit edilmemiş ancak halkın kullanımına açık çeşmelerden temin edilen örneklerin bir tanesinde (%10) ookist saptanmış olmasının alt yapı imkânlarının nispeten iyi olduğunu, hastalığın epidemiyolojisinde şehir merkezindeki muhtelif yerlerde bulunan halk çeşmelerinin rolü olabileceği ve içme suyu dışında başka faktörlerin de olabileceğini düşündürmektedir.

Araştırmada sadece içme sularının incelenmesi ve örneklerin il merkezi ile sınırlı olması oranların düşük çıkmasını destekler nitelikte olmakla birlikte konvansiyonel yöntem kullanılmış olmasının da bir dezavantaj olabileceğini akla getirmektedir.

Çalışmadan elde edilen bulgular araştırmacıların bildirdiklerine paralel değerlendirilmiş, olgulardaki yaş ve cinsiyet farklılıkları anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Mikroskobik incelemede etkenlerin gözden kaçabilme ihtimaline karşın, laboratuvar imkânlarının elverdiği ölçüde cryptosporidiosis'i düşündürülen vakalarda dışkıının serolojik yöntemle incelenmesinin uygun olacağı ve il genelinde bütün su kaynak/atıklarında, tüketilen yaş sebze/meyvelerin yıkama sularında moleküler tabanlı tanı yöntemleriyle ookist saptayacak çalışmaların planlanması gerektiği düşünülmektedir.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

- Ok UZ, Balcıoğlu İC. *Cryptosporidiosis*. Ed. Özcel MA, Özbel Y, Ak M. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. Meta Basım Matbaacılık; 2007.p.388-91.

2. Dixon BR. The role of livestock in the foodborne transmission of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. to humans. Fayer R, Caccio S, Ortega-Pierres G, Editors. *Giardia and Cryptosporidium: From molecules to disease*. GBR, Wallingford, Oxon, CABI Publishing; 2009.p.107-22.
3. Mead PS, Slutsker L, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the united states reply to dr. hedberg. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 841-2. [CrossRef]
4. Aygün G, Yılmaz M, Yaşar H, Aslan M, Polat E, Midilli K, et al. Parasites in nosocomial diarrhoea: are they underestimated? *J Hosp Infect* 2005; 60: 283-5. [CrossRef]
5. Robinson G, Elwin K, Chalmers RM. Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhoea. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1800-2. [CrossRef]
6. Abd El Kader NM, Blanco MA, Ali-Tammam M, Abd El Ghaffar Ael R, Osman A, El Sheikh N, et al. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* in human patients in Cairo, Egypt. *Parasitol Res* 2012; 110: 161-6. [CrossRef]
7. Xiao L, Feng Y. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 52: 309-23. [CrossRef]
8. Dorny P, Praet N, Deckers N, Gabriel S. Emerging food-borne parasites. *Vet Parasitol* 2009; 163: 196-206. [CrossRef]
9. Cheng HW, Lucy FE, Graczyk TK, Broaders MA, Tamang L, Connolly M. Fate of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts and *Giardia duodenalis* cysts during secondary wastewater treatments. *Parasitol Res* 2009; 105: 689-96. [CrossRef]
10. Akyön Y, Ergüven S, Arıkan S, Yurdakök K, Günalp A. *Cryptosporidium parvum* prevalence in a group of Turkish children. *Turk J Pediatr* 1999; 41: 189-96.
11. Sungur T, Kar S, Güven E, Aktaş M, Karaer Z, Vatanserver Z. *Cryptosporidium* spp.'nin dışkıdan Nested PCR ve Carbol Fuchsin Boyama Yöntemi ile Teşhis Edilmesi. *Türkiye Parazit Derg* 2008; 32: 305-8.
12. Kuştimur S, Doğruman Al F, Tuncer C, Duyan Çamurdan A, Dalgıç B, Alagözlü H, ve ark. Gastrointestinal Yakınmaları Olan Hastalarda Bazı Protozoonların Farklı Tanı Yöntemleriyle Araştırılması. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2009; 29: 1260-6.
13. Doğan N, Demirüstü C, Aybey A. Eskişehir Osmangazi Üniversitesinin beş yıllık bağırsak paraziti prevalansının türlere ve cinsiyete göre dağılımı. *Türkiye Parazit Derg* 2008; 32: 120-5.
14. Doğan N, Akgün Y. İshalli olgularda *Cryptosporidium* oookislerinin araştırılması. *Türkiye Parazit Derg* 1998; 22: 243-6.
15. Tamer GS, Balıkcı E, Erbar A. Lösemi ve lenfoma tanısı alan çocuklarda cryptosporidiosis prevalansı. *Türkiye Parazit Derg* 2008; 32: 192-7.
16. Tamer GS, Gülenç S. Dışkıda *Cryptosporidium* spp. antijenlerinin ELISA ile araştırılması. *Türkiye Parazit Derg* 2008; 32: 198-201.
17. Alver O, Töre O. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesindeki Bağırsak Parazit Olgularının Prevalansı ve Dağılımı. *Türkiye Parazit Derg* 2006; 30: 296-301.
18. Türk M, Şener AG, Orhon M, Candüz K. Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında Ocak 2002- Haziran 2003 Yılları Arasında Saptanan Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. *Türkiye Parazit Derg* 2004; 28: 100-2.
19. Koturoğlu G, Bayram S, Kurugöl Z, Turgay N, Mutlubaş F. Akut İshalli Çocuklarda *Cryptosporidium* Sıklığı ve Risk Faktörleri. *Türkiye Clin J Pediatr* 2004; 13: 16-9.
20. Otağ F, Aslan G, Emekdaş G, Aydın E, Taylan Özkan A, Çeber K. Mersin ilinde ilkököl öğrencilerinde *Cryptosporidium* spp. oookistelerinin araştırılması. *Türkiye Parazit Derg* 2007; 31: 17-9.
21. Börekçi G, Üzel A. Mersin ili Sosyal Hizmetler Çocuk Yuvası ve Yetiştirme Yurdundaki çocuklarda bağırsak parazitleri, fiziksel büyüme ve hijyen alışkanlıklarının belirlenmesi. *Türkiye Parazit Derg* 2009; 33: 63-72.
22. Gullu E, Koltas IS. Investigation of *Cryptosporidium* spp. antigen by ELISA method in stool specimens obtained from patients with diarrhea. *Parasitol Res* 2011; 108: 395-7. [CrossRef]
23. Atambay M, Daldal N, Çelik T. Malatya'da ishalleri dışkılarda *Cryptosporidium* spp. Araştırılması. *T Parazit Derg* 2003; 27: 12-4.
24. Çiçek M, Körkoca H, Gül A. Van Belediye Mezbahasında çalışan işçilerde ve kesimi yapılan hayvanlarda *Cryptosporidium* spp.'nin araştırılması. *Türkiye Parazit Derg* 2008; 32: 8-11.
25. Yılmaz H, Tas Z, Cicek MS. Investigation of *Cryptosporidiosis* by enzyme-linked immunosorbent assay and microscopy in children with diarrhea. *Saudi Med J* 2008; 29: 526-9.
26. Garcia-Rodriguez JA, Martin Sanchez AM, Canut A, Garcia Luis E. The seroepidemiology of *Cryptosporidium* species in different groups in Spain. *Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease* 1989; 3: 367-73. [CrossRef]
27. Al-Hindi AI, Elmanama AA, Elnabris KJA. *Cryptosporidiosis* among children attending Al-Nasser Pediatric Hospital, Gaza, Palestine. *Turk J Med Sci* 2007; 37: 367-72.
28. Miller SA, Rosario CL, Rojas E, Scorza JV. Intestinal parasitic infection and associated symptoms in children attending day care centres in Trujillo, Venezuela. *Trop Med Int Health* 2003; 8: 342-7. [CrossRef]
29. Pérez Córdón G, Cordova Paz Soldan O, Vargas Vásquez F, Velasco Soto JR, Sempere Bordes L, Sánchez Moreno M, et al. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. *Parasitol Res* 2008; 103: 459-65. [CrossRef]
30. Cordova Paz Soldan O, Vargas Vásquez F, Gonzalez Varas A, Peréz Córdón G, Velasco Soto JR, Sánchez-Moreno M, et al. Intestinal parasitism in Peruvian children and molecular characterization of *Cryptosporidium* species. *Parasitol Res* 2006; 98: 576-81. [CrossRef]
31. Çeber K, Aslan G, Otağ F, Delialioğlu N, Öztürk C, Babür C, ve ark. Mersin ilinde İçme, Kullanma, Atık ve Deniz Sularında *Cryptosporidium* spp. Oookistelerinin Saptanması. *Türkiye Parazit Derg* 2005; 29: 224-8.
32. Çiçek M, Körkoca H, Aktaş Ö. Van ili içme sularının *Cryptosporidium* spp. oookisteleri yönünden incelenmesi. *Turk Hij Den Biyol Derg* 2011; 68: 122-6.





## *Blastocystis* sp. Subtip 3 Small-subunit Ribozomal Geninin Klonlanması

### Cloning of *Blastocystis* sp Subtype 3 Small-subunit Ribosomal DNA

Çağrı Şakalar<sup>1</sup>, Yunus Uyar<sup>2</sup>, Mehmet Ali Yürürdurmaz<sup>3</sup>, Sadık Tokar<sup>3</sup>, Huzeyfe Yeşilkaya<sup>3</sup>, Esra Gürbüz<sup>2</sup>, Salih Kuk<sup>2</sup>, Süleyman Yazar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

<sup>2</sup>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

<sup>3</sup>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, 3. Dönem Öğrencisi, Kayseri, Türkiye

#### ÖZET

**Amaç:** *Blastocystis*'in farklı alttipleri veya genetik varyasyonlarının farklı klinik semptomlara sebep olduğu veya asemptomatik seyrettiği düşünülmektedir. Bu çalışmada *Blastocystis*'in SSUrDNA gen kısmının klonlanması amaçlanmıştır.

**Yöntemler:** Çalışmada *Blastocystis* sp. ile enfekte bir hastanın dışkılarından DNA izole edilmiştir. SSUrDNA genomik kısmının çoğaltılması için *Blastocystis* spesifik primerler kullanılmıştır. Çoğaltılan DNA parçası plazmid spesifik primerler kullanılarak bir plazmid içine klonlanarak sekanslanmıştır. Elde edilen DNA dizisi BLAST ile analiz edildi ve MEGA yazılımı kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

**Bulgular:** Çalışmamızda elde edilen *Blastocystis* izolatının subtip 3 olduğu tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Klonlanan ve sekanslanan hedef genomik bölgesinin filogenetik analiz çalışmalarında kullanılabileceği düşünülmektedir. (*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 13-8)

**Anahtar Sözcükler:** *Blastocystis* sp. SSUrDNA, klonlama, subtip

**Geliş Tarihi:** 15.08.2012      **Kabul Tarihi:** 08.12.2012

#### ABSTRACT

**Objective:** Different sub-types or genetic variations of *Blastocystis* sp. are thought to play a role in the differential symptoms caused by the parasite or asymptomatic cases. In this study, it was aimed to clone a fragment of SSUrDNA gene of *Blastocystis* from a patient in order to define its phylogenetic subtype.

**Methods:** In this study, DNA isolation from the stool of a *Blastocystis* infected patient was performed. *Blastocystis* specific primers were used to amplify a SSUrDNA genomic fragment. The amplified DNA fragment was cloned into a plasmid and sequenced using plasmid specific primers. The obtained DNA sequence was analyzed using BLAST and a phylogenetic tree was constructed using the software MEGA.

**Results:** It was found that the *Blastocystis* isolate in our study is subtype 3.

**Conclusion:** Cloning and sequencing of the target genomic region is suggested for phylogenetic analysis studies.

(*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 13-8)

**Key Words:** *Blastocystis* sp. SSUrDNA, cloning, subtype

**Received:** 15.08.2012      **Accepted:** 08.12.2012

## GİRİŞ

*Blastocystis*, insan ve diğer birçok vertebralı canlının alt gastrointestinal sisteminde yerleşebilen anaerobik, tek hücreli, ökaryotik bir parazittir. İnsan dışkı örneklerinde mantar dışında en sık rastlanan ökaryotik organizmadır (1-4). Tüm dünyada yaygın olarak bulunan bu parazitin insan dışkı örneklerindeki prevalansı, gelişmiş ülkelerde %7-20, gelişmekte olan ülkelerdeki ise %30-60 oranında değişmektedir (5-9).

Hayat döngüsünde bazı tartışmaların bulunduğu *Blastocystis*'in kesin olmamakla birlikte genel olarak fekal-oral yol ve kontamine suların içilmesiyle bulaştığı kabul edilmektedir. Patogen olup olmadığı tartışması devam eden *Blastocystis*'in sebep olduğu hastalık blastocystosis olarak isimlendirilmektedir (10). Blastocystosis, ishal, karın ağrısı, bulantı, kusma, şişkinlik, kabızlık ve ciltte kızarıklık gibi semptomlar göstermesinin yanı sıra tamamen asemptomatik de olabilmektedir.

Ayrıca 1996 yılında yapılan gen sekanslarının analizi sonucu Stramenofiles grubuna ait olduğu bildirilmiştir (11, 12). Parazitin farklı semptomlara sebep olmasının temelinde, genetik varyasyonların ve farklı alt tiplerin rol oynadığı düşünülmektedir. Bu nedenle semptom ve parazit alt tipleri arasındaki ilişki bir çok çalışmada ayrıntılı olarak incelenmiştir (13-19). Günümüze kadar insan ve hayvanlardan izole edilen parazitin small-subunit ribozomal DNA (SSU rDNA)'sına göre 14 farklı alt tipe ayrıldığı gösterilmiştir (20-22). Bu alt tiplerden en yaygını alt tip 3'tür (3).

Günümüzde gen klonlaması çalışmaları; gen izolasyonu, gen bankalarının oluşturulması, genlerin güvenlik altına alınarak onların yapı ve fonksiyonları üzerinde araştırmalar yapılması, klonlanan genlerin üzerinde mutasyonlar yapılarak fonksiyonel bölgelerin belirlenmesi, DNA dizi analizlerinin kolaylaştırılması, DNA aşlarının geliştirilmesi ve rekombinant proteinlerin ekspresyonu gibi amaçlarla yapılmaktadır (23).

Bu çalışmada, Kayseri'de bir hastadan elde edilen *Blastocystis* sp.'nin SSUrDNA geninin klonlanması ve klonlanan genom bölgesinin sekanslanarak filogenetik analizi amaçlanmıştır.

## YÖNTEMLER

### Parazit

Çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gevher Nesibe Hastanesi Gastroenteroloji bölümüne ishal şikâyetiyle başvuran 70 yaşında bir kadın hastadan alınan dışkı örneği ile yapılmıştır. Nativ, lügol yöntemi ve formol-eter-konsantrasyon tekniği (FEKT) kullanılarak incelenen örnekte *Blastocystis* sp. tespit edilmiştir (24). Dışkı örneği, DNA izolasyonu yapılabildiği kadar -20°C'de saklanmıştır.

### DNA İzolasyonu

-20°C'de saklanan dışkı örneği çözünmesi beklenmeden bistüri ile kesilerek 200mg olacak şekilde tartıldıktan sonra DNA izolasyonu, QIAamp stool kit (QIAGEN, ABD) prosedürüne göre yapılmıştır. Elde edilen DNA örnekleri PZR için -20°C'de saklanmıştır.

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nda (PZR), 1800 baz çiftlik SSU-rDNA geninin 602 baz çiftlik bölümünü çoğaltan RD5 (5'-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') ve BhrDr (5'-GAGCTTTT-AACTGCAACAACG-3') primerleri kullanılmıştır (14).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu için 5X Master mix (SolisBioDyne FIREPol, Estonia), son konsantrasyonu 10 µg/ml Genomik DNA ve 0.5 µM RD5 ve BhrDr primerlerinden oluşan toplam 25 µL'lik karışım hazırlanmış ve 94°C de 5 dk'lık ön ısıtma ile başlayan sırasıyla 94°C denatürasyon, 59°C bağlanma, 72°C uzamadan oluşan 35 döngü sonrası 72°C'de 10 dak'lık son uzama ile biten PZR programı kullanılmıştır. PZR sonrası ürün, %1.5'luk agaroz jelde yürütüldü ve Gel Logic 212 Pro Jel görüntüleme cihazıyla (Carestream, ABD) görüntülenmiştir.

### Klonlama

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ürününün klonlanmasında CloneJET PZR Cloning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Klonlama reaksiyonu için; 2X reaksiyon buffer, 1 µL DNA blunting enzim ve PZR ürününden son konsantrasyonu 0.15 pmol olacak şekilde 18 µL'lik karışım hazırlanmıştır. Karışım vortekslenip santrifüj edildikten sonra 70°C'de 5 dk inkübe edilerek buzlu suya konulmuştur. Üzerine son konsantrasyonda 150 ng pJET1.2/blunt Cloning Vector ve 5'i T4 DNA Ligaz eklenip 20 µL'ye tamamlanmıştır. Karışım 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 5 µL'si transformasyon için kullanılmıştır.

5 µL'lik ligasyon ürünü buzlu suda bekletilen 100 µL JM109 *E. coli* kompetan hücrelerine (Promega, ABD) eklendi ve 30 dk inkübe edilmiştir. Karışım sırasıyla 42°C'de 1 dk ve buzlu suda 1 dk bekletildikten sonra üzerine 250 µL ampisilinli LB besi yeri eklenmiştir. 37°C'de sallayıcı üzerinde 1.5 saat inkübe edilen transformasyon karışımı LB katı besiyerine ekilerek bir gece inkübe edilmiştir.

### Klonlamanın PZR Tarama ile Doğrulanması

Lurie-Bertani (LB) katı besiyerinde oluşan kolonilerin rekombinant plazmiti içerip içermediğini tespit etmek için PZR tarama yapılmıştır. PZR için her biri 5 µL Master mix (SolisBioDyne FIREPol, Estonia), birer µL RD5 ve BhrDr (20 pmol) primerleri ve katı besiyerinde üreyen kolonilerden steril kürdanla alınan örnekler karışıma bulaştırılarak toplam 25 µL'lik karışımlar hazırlanmıştır. Yukarıda belirtilen PZR programı kullanıldıktan sonra PZR ürünü %1.5'luk agaroz jelde yürütülüp görüntülenmiştir.

### Klonlamanın Miniprep ile Doğrulanması

Rekombinant plazmitin üretilen kompetan hücrelerde varlığını doğrulamak için Miniprep yapılmıştır. Miniprep işleminde High Pure Plazmid Isolation Kit (Roche Applied Science, Almanya) kullanılmıştır. Miniprep yapılmak üzere LB katı besiyerinden, Ampisilin'li LB sıvı besiyerlerine ekim yapılarak 37°C'de sallayıcı üzerinde bir gece inkübe edilmiştir. Üreme gözlenen sıvı besiyerinden alınan 5 mL'lik örnek 6000g'de 1 dk santrifüj edildikten sonra üst sıvısı dökülüp plazmit izolasyonu için kit prosedürü takip edilmiştir. Elde edilen rekombinant plazmit pJET-BISSUrDNA olarak isimlendirilmiş ve 5 µL'si alınarak agaroz jelde yürütülmüştür.

### Klonlamanın Restriksiyon Enzim Kesimi ile Doğrulanması

Saflaştırılan rekombinant plazmitler, restriksiyon enzimleri ile kesilerek klonlanan genin varlığı araştırılmıştır. Enzim kesimi için *BglII* ve *DraI* enzimleri kullanılmıştır.

*BglII* (Promega, ABD) ürünü pJET1.2/blunt Klonlama Vektörü'nü 2 yerden kesmektedir. Ürün bilgilerine uygun olarak 20 µL'lik karışım hazırlanarak 37°C'de bir saat inkübe edilmiştir.

*DraI* (Fermantas, ABD) ürünü pJET1.2/blunt Klonlama Vektörü'nü 7 yerden kesmektedir. Ürün bilgilerine uygun olarak 20 µL'lik karışım hazırlanarak 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübe edilen ürünler agaroz jelde yürütülerek klonlanan genin varlığı incelenmiştir.

#### Klonlamanın DNA Dizi Analizi ile Doğrulanması

DNA dizi analizi için pJET1.2 Forward Sequencing Primer, (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'), pJET1.2 Reverse Sequencing Primer, (5'-AAGAACATCGATTTCCATGGCAG-3') primerleri ve Bigdye Cycle Sequencing kit v 3.1 (Applied Biosystems, ABD) kullanılmıştır. Sonuçlar otomatik DNA dizi analiz cihazı (ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer, ABD)'nda analiz edilmiştir. Elde edilen DNA dizisi ve GenBANK'daki *Blastocystis* sp. DNA dizilerinin Biyoteknoloji Bilgi Ulusal Merkezi (NCBI)'nde BLAST analizi yapılmıştır. Elde edilen DNA dizisi GENBANK'a JX448397 numara ile kayıt edilmiştir.

#### Filogenetik Analiz

Filogenetik analiz için MEGA 5.0 programı kullanılmıştır (25). Bunun için elde edilen DNA dizisi ve GENBANK'ta depolanmış subtipler

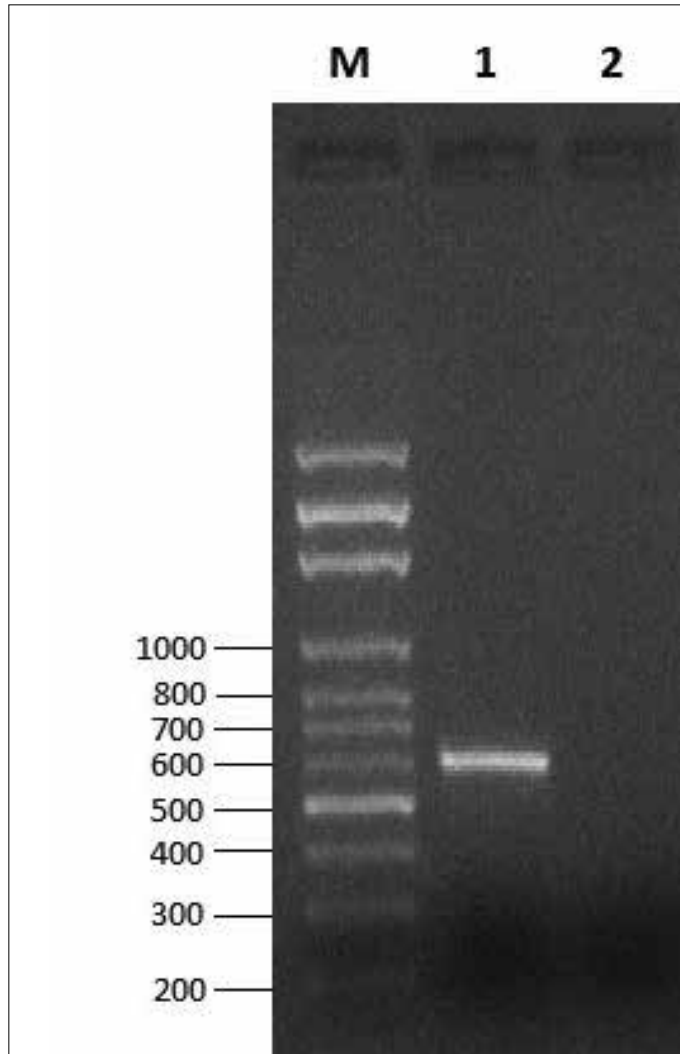
MEGA 5.0 programına girilmiş ve bu programla neighbor-joining (NJ) metodu kullanılarak Filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Filogenetik analizde *Blastocystis* sp. dışında standart olarak; bir kamçılı olan *Preteromonas lacertae* (GENBANK no. U37108) kullanılmıştır. Bootstrap değeri olarak ise 1000 replikasyon kabul edilmiştir.

#### BULGULAR

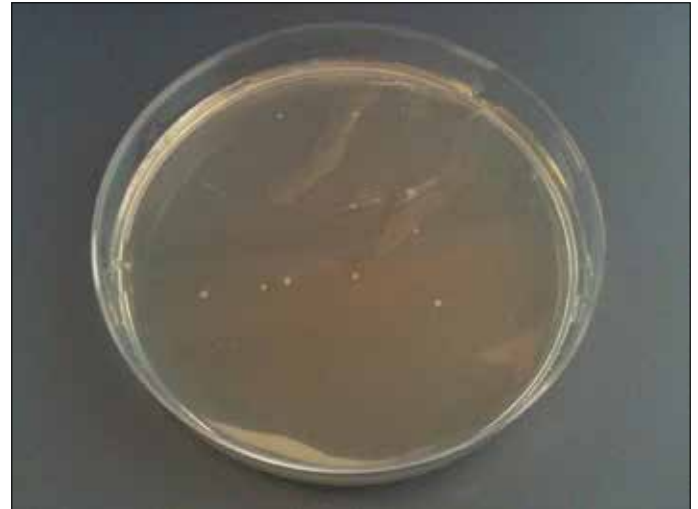
*Blastocystis* sp. tespit edilen 70 yaşındaki kadın hastanın dışkı örneğinden *Blastocystis* sp. DNAsı QIAamp stool kit (QIAGEN, ABD) prosedürüne uygun olarak izole edildi. 602 baz çiftlik PZR ürünü agaroz jelde yürütülerek görüntüldü (Şekil 1).

Elde edilen 602 bç'lik DNA örneği CloneJET PZR Cloning Kit (Thermo Scientific, USA) kullanılarak pJET1.2/blunt Klonlama Vektörüne yerleştirildi. Ligasyon ürünü JM109 kompetan hücrelere transforme edildi. Bir gece inkübasyon sonrası oluşan koloniler tespit edildi (Şekil 2).

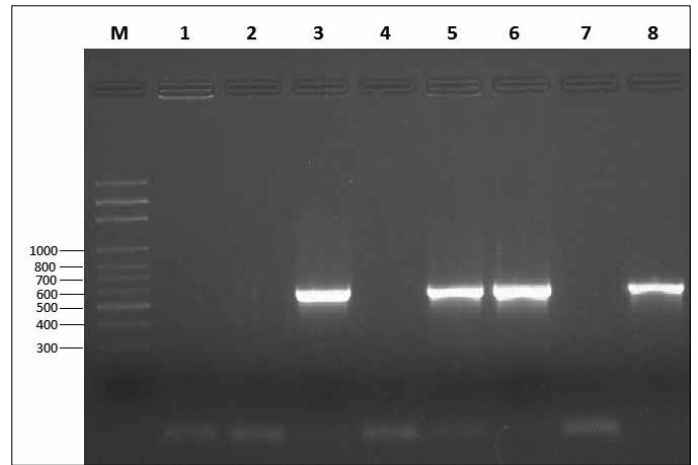
PZR-Tarama ile kolonilerin rekombinant plazmidi içerdiği gösterildi (Şekil 3). Rekombinant plazmit varlığı tespit edilen iki koloniden miniprep yapılarak rekombinant plazmit saflaştırıldı ve PZR



Şekil 1. SSUrDNA PZR ürününün jel elektroforezde görünümü. M-100 bp'lik marker (SolisBioDyne), 1- *Blastocystis* sp. 602 bç'lik SSUrDNA 2- Negatif kontrol



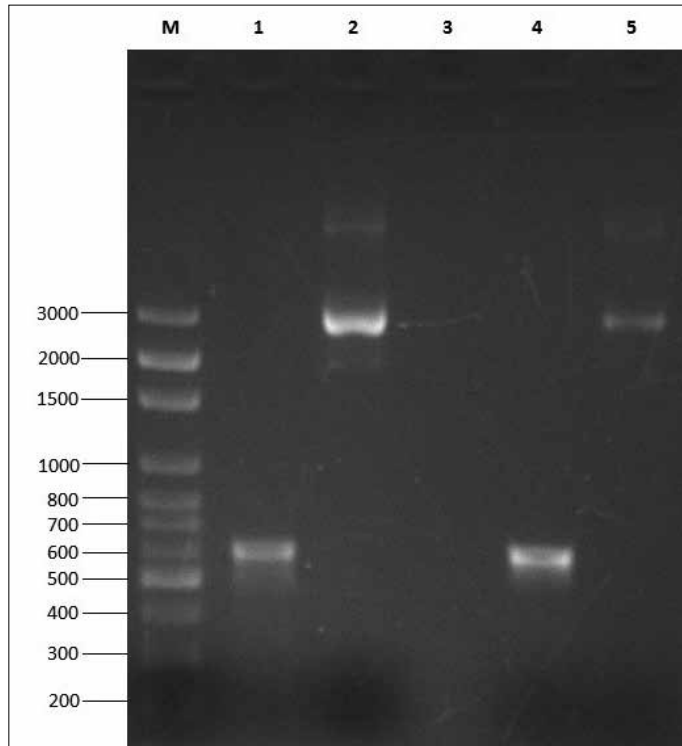
Şekil 2. Transformasyon sonrası oluşan koloniler



Şekil 3. Kolonilerin rekombinant plazmit varlığının PZR-Tarama ile doğrulanması. M-100 bp'lik marker (SolisBioDyne), 1, 2, 4 ve 7- PZR-Tarama sonucu negatif örnekler, 3, 5, 6 ve 8- PZR-Tarama ürünü 602 bç'lik SSUrDNA'lık pozitif örnekler

**Tablo 1.** pJET 1.2 vektörüne klonlanan *Blastocystis* spp. SSUrDNA'sının DNA dizisi

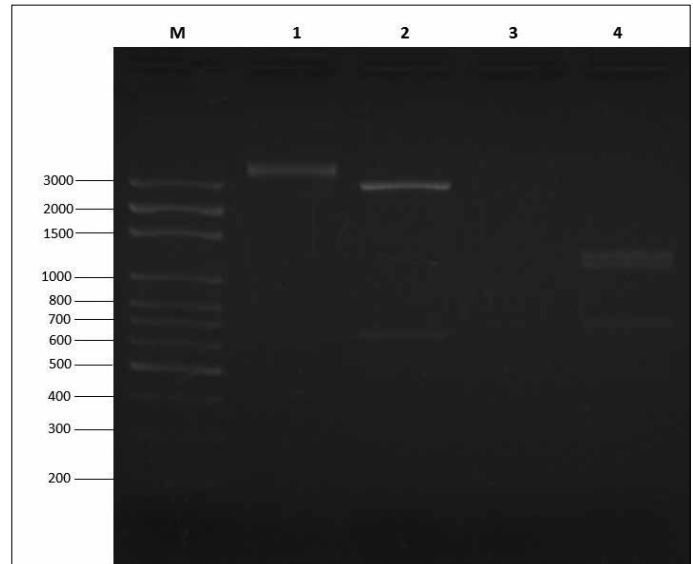
1	atctggtga	tcctgccagt	agtcatacgc	tcgtctcaaa	gattaagcca	tgcatgtgta
61	agtataaata	gttaactttg	aaactgcgaa	tggtcatta	tatcagttat	agtttatttg
121	atgaagaata	ctaattggat	aaccgtagta	attctagagc	taatacatgt	ataaagtctt
181	gtagactgca	tttattagaa	tgaaaaccat	aggtttcggc	ctattcgtga	gtaataataa
241	ctaactcatat	cgtatgctta	tgtaacgatg	tgctttcaa	gtttctgcc	tatcagcttt
301	cgatggtagt	gtattggact	accatggcag	taacgggtaa	cgaagaattt	gggttcgatt
361	tcggagaggg	agcctgagag	atggctacca	catccaagga	aggcagcagg	cgcgtaaatt
421	acccaatcct	gacacagggg	ggtagtgaca	ataaatcaca	atgcggaaca	atgttttgca
481	attggattga	gaacaacgta	caaaccttat	cgataaacia	ttggagggca	agtctggtgc
541	cagcagccgc	ggtaattcca	gctccaatag	cgatatataa	cgttgttcca	gttaaaaaagc
601	tc					

**Şekil 4.** Rekombinant plazmit DNA'sı ve PZR sonucu. M-100 bp'lik marker (*SolisBioDyne*), 2, 5- miniprep sonucu kolonilerden saflaştırılan rekombinant plazmit DNA'ları, 1, 4- saflaştırılan rekombinant plazmit kaynaklı 602 bç'lik PZR ürünü, 3- negatif kontrol

ile klonlanan geni içerdiği gösterildi (Şekil 4). Saflaştırılan rekombinant plazmitler, *Bgl*III ve *Dra*I restriksiyon enzimleri ile kesildi ve klonlanan genin varlığı doğrulandı (Şekil 5). Ayrıca rekombinant plazmit, DNA dizi analizi yapılarak, klonlanan genin DNA dizisi ortaya çıkarıldı (Tablo 1). DNA dizi analizi MEGA 5 programına girilerek filogenetik ağaç oluşturulan izolatın subtip 3 olduğu tespit edildi (Şekil 6).

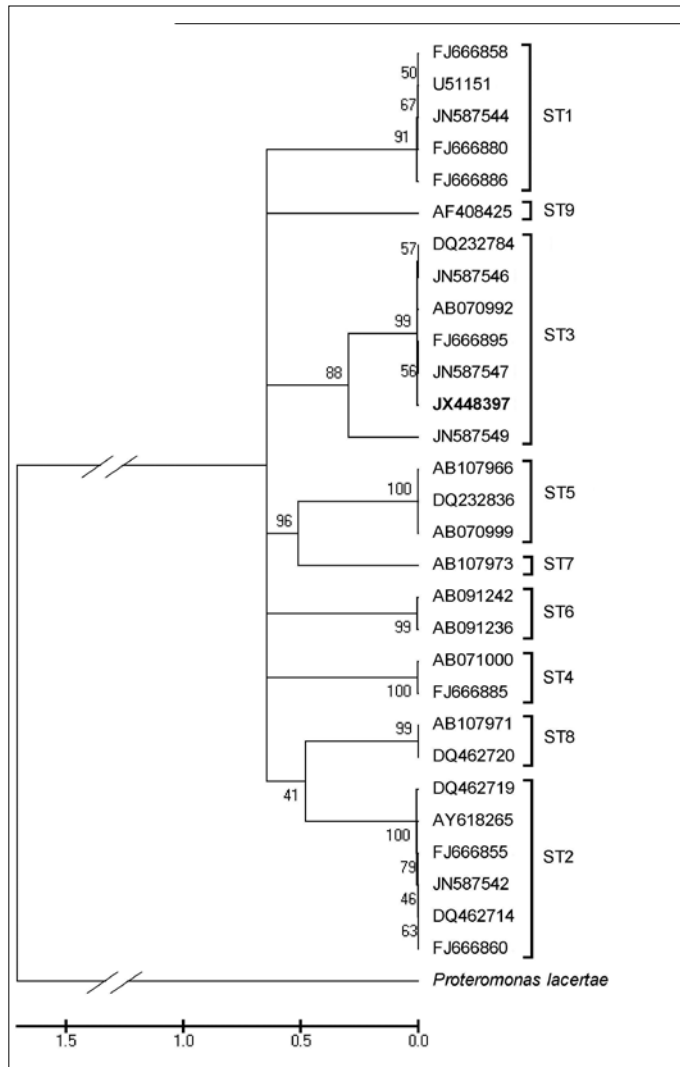
## TARTIŞMA

*Blastocystis* sp. ile enfeksiyon etkeni olarak sıkça karşılaşılmaktadır (26). *Blastocystis* sp. tipleri ile vakaların semptomatik ya da

**Şekil 5.** Saflaştırılan rekombinant plazmitlerin restriksiyon enzimleri ile kesimi. M-100 bp'lik marker (*SolisBioDyne*), 1- kesilmemiş rekombinant plazmit, 2- *Bgl*III restriksiyon enzimi ile kesim sonucu, 3- negatif kontrol, 4- *Dra*I restriksiyon enzimi ile kesim sonucu

asemptomatik oluşu arasında ve ayrıca semptomatik vakalardaki semptomlarla tipler arasındaki ilişkiler incelenmiştir (27). Ayrıca insan ve hayvanlardan elde edilen *Blastocystis* sp.'lerin incelenmesiyle de transmisyon aydınlatılmaya çalışılmıştır (28). Bütün bu çalışmalarda *Blastocystis* sp.'ler tiplendirilerek sorulara cevap aranmıştır. Bu nedenle çalışmada elde edilen izolat RD5 ve BhrDr primerlerinin çoğalttığı gen ile tiplendirilmiştir. Türkiye'de elde edilen *Blastocystis* sp. izolatları PZR ile moleküler olarak alt tiplendirilmiş, ayrıca patolojik ve epidemiyolojik bulgular ortaya konmuştur. Bu çalışmalara göre alt tip 3 en yaygın olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bir çalışmada asemptomatik hastalarla alt tip 2 arasında ilişki bulunmuş iken diğer bir çalışmada ise semptomatik hastaların tümünde alt tip 1 tespit edilmiştir (29-32).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ürünlerinin DNA dizi analiz çalışmalarında çoğu zaman primerlerin bağlanma bölgesi ve yakını istenen şekilde okunamamaktadır. Bunun için PZR ürünlerinin klon-



**Şekil 6.** Referans *Blastocystis* sp. tipleri ile karşılaştırılarak oluşturulan filogenetik ağaç. JX448397: Bu çalışmada insandan elde edilen izolat. *Blastocystis* sp. dışında standart: *Preteromonas lacertae* (GENBANK no. U37108), Bootstrap değeri: 1000 replikasyon

lanma sonrası DNA dizi analizleri plazmit spesifik primerlerle yapılmaktadır. Bu çalışmada *Blastocystis*'in SSUrDNA geni pJET 1.2 plazmidine klonlanmış ve vektör spesifik primerlerle DNA dizi analizi yapılmıştır.

Böylece gen klonlanmasıyla daha kesin bir DNA dizi analiz sonucu elde etmenin yanı sıra plazmit DNA kütüphanesi de oluşturulmuş olmaktadır. Ayrıca klonlanan ürün sonraki kantitatif çalışmalarda standart olarak kullanılabilmesi önemli bir avantaj sağlamaktadır. Yapılan bir çalışmada farklı türlerden izole edilen *Blastocystis* spp. genomik DNA'ları kullanılarak SSUrRNA geni PZR ile çoğaltılmış ve her bir PZR ürünü plazmite klonlanarak sekanslanmıştır. Elde edilen sekanslar ile filogenetik analiz gerçekleştirilmiştir (33). Bu çalışmada da aynı şekilde PZR ile çoğaltılan ürün, pJET 1.2 plazmidine klonlanma sekanslanmış ve filogenetik analiz yapılmıştır. Ayrıca klonlanan bu sekans, oluşturulacak DNA kütüphanesinde saklanarak ülkemizde ve dünyada ileride yapılacak çalışmalara kaynak teşkil edebilecektir.

## SONUÇ

Bir hastadan elde edilen *Blastocystis* sp. izolatından PZR ile SSUrDNA geni çoğaltılmış ve pJET 1.2 plazmidine Türkiye'de ilk kez bu çalışma ile klonlanmıştır. DNA dizi analiz sonucu filogenetik analizi yapılarak *Blastocystis* sp. subtip 3 olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma sonrasında tiplendirme çalışmaları için kullanılacak PZR ürünlerinin DNA dizi analizlerinde gen spesifik primerlerden ziyade genin klonlanarak plazmit spesifik primerlerle DNA dizi analizi yapılabileceği gösterilmiştir.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Forsell J, Granlund M, Stensvold CR, Clark GC, Evengard B. Subtype analysis of *Blastocystis* Isolates in Swedish Patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 1689-16. [CrossRef]
2. Stenzel DJ, Boreham PF *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 563-84.
3. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 639-65. [CrossRef]
4. Stensvold CR, Nielsen HV, Mølbak K, Smith HV. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* - diagnostic limitations. *Trends Parasitol* 2009; 25: 23-9. [CrossRef]
5. Rene BA, Stensvold CR, Badsberg JH, Nielsen HV. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from *Blastocystis* cyst excreting patients. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80: 588-92.
6. Li LH, Zhang XP, Lv S, Zhang L, Yoshikawa H, Wu Z, et al. Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. *Parasitol Res* 2007; 102: 83-90. [CrossRef]
7. González-Moreno O, Domingo L, Teixidor J, Gracenea M. Prevalence and associated factors of intestinal parasitisation: a cross-sectional study among outpatients with gastrointestinal symptoms in Catalonia, Spain. *Parasitol Research* 2011; 108: 87-93. [CrossRef]
8. Roberts T, Barratt J, Harkness J, Ellis J, Stark D. Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of *Blastocystis* sp in clinical stool samples. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84: 308-12. [CrossRef]
9. Amin OM. Seasonal prevalence of intestinal parasites in the United States during 2000. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66: 799-803.
10. Ok ÜZ. *Blastocystosis*. Özcel MA, editor. *Tıbbi Parazit Hastalıkları*. İzmir: Meta Basım Matbaacılık Hiz; 2007.p.383-6.
11. Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. Human parasite finds taxonomic home. *Nature* 1996; 380: 98. [CrossRef]
12. Stechmann A, Hamblin K, Pérez-Brocá V, Gaston D, Richmond GS, Van Der Giezen M, et al. Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Curr Biol* 2008; 18: 580-5.
13. Kaneda Y, Horiki N, Cheng XJ, Fujita Y, Maruyama M, Tachibana H. Ribodemes of *Blastocystis hominis* isolated in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 393-6.
14. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist* 2006; 157: 77-85. [CrossRef]
15. Souppart L, Moussa H, Cian A, Sancier G, Poirier P, El Alaoui H, et al. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitol Res* 2010; 106: 505-11. [CrossRef]
16. Dogruman-Al F, Dagci H, Yoshikawa H, Kurt Ö, Demirel M. A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 2008; 103: 685-9. [CrossRef]
17. Dogruman-Al F, Kustimur S, Yoshikawa H, Tuncer C, Simsek Z, Tanyuksel M, et al. *Blastocystis* subtypes in irritable bowel syndrome

- and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104: 724-7. [\[CrossRef\]](#)
18. Domínguez-Márquez MV, Guna R, Muñoz C, Gómez-Muñoz MT, Borrás R. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). Parasitol Res 2009; 105: 949-55. [\[CrossRef\]](#)
  19. Stensvold CR, Christiansen DB, Olsen KEP, Nielsen HV. *Blastocystis* sp. subtype 4 is common in Danish Blastocystispositive patients presenting with acute diarrhea. Am J Trop Med Hyg 2011; 84: 883-5. [\[CrossRef\]](#)
  20. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E, et al. Terminology for Blastocystis subtypes-a consensus. Trends Parasitol 2007; 23: 93-6. [\[CrossRef\]](#)
  21. Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, et al. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. Vet Parasitol 2010; 169: 8-17. [\[CrossRef\]](#)
  22. Fayer R, Santin M, Macarasin D. Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. Parasitol Res 2012; 111: 1349-55. [\[CrossRef\]](#)
  23. Kuk S, Erensoy A. Gen Klonlama, Plazmit Seçimi ve *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 Uygulamaları, Türkiye Parazit Derg 2008; 32: 16-22.
  24. Kilimcilioğlu AA, Ok ÜZ. Yoğunlaştırma yöntemleri. Korkmaz M, Ok ÜZ. editor. Parazitolojide Laboratuvar. İzmir: Meta Basım Matbaacılık Hiz; 2011.p.23-9.
  25. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 2011; 28: 2731-9. [\[CrossRef\]](#)
  26. Stensvold CR, Lewis HC, Hammerum AM, Porsbo LJ, Nielsen SS, Olsen EP, et al. Blastocystis: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite Epidemiology and Infection 2009; 137: 1655-63. [\[CrossRef\]](#)
  27. Udkow MP, Markell EK. *Blastocystis hominis*: prevalence in asymptomatic versus symptomatic hosts. J Infect Dis 1993; 168: 242-4. [\[CrossRef\]](#)
  28. Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, Iseki M, Ali I, Hossain MB, et al. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. Parasitol Res 2004; 92: 22-9. [\[CrossRef\]](#)
  29. Ozyurt M, Kurt O, Mølbak K, Nielsen HV, Haznedaroglu T, Stensvold CR. Molecular epidemiology of Blastocystis infections in Turkey. Parasitol Int 2008; 57: 300-6. [\[CrossRef\]](#)
  30. Eroglu F, Koltas IS. Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* by using PCR method. Parasitol Res 2010; 107: 841-5. [\[CrossRef\]](#)
  31. Dogruman-Al F, Dagci H, Yoshikawa H, Kurt O, Demirel M. A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. Parasitol Res 2008; 103: 685-9. [\[CrossRef\]](#)
  32. Eroglu F, Genc A, Elgun G, Koltas IS. Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. Parasitol Res 2009; 105: 1589-92. [\[CrossRef\]](#)
  33. Noël C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC, et al. Molecular phylogenies of Blastocystis isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. J Clin Microbiol 2005; 43: 348-55. [\[CrossRef\]](#)



## Concomitant Immunity to *Schistosoma mansoni* in Mice

Farelerde *Schistosoma mansoni*'ye karşı konkomitant bağışıklık

Abdel-Moneim Salim, Abdel-Rahman Al-Humiany

Department of Medical Microbiology, Taif University, Turaba, Saudi Arabia

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of the present study was to confirm observations on the concomitant immunity to *Schistosoma mansoni* in mice and assess its effects on the resistance of mice to a challenge infection.

**Methods:** Cercariae from infected *Biomphalaria glabrata* were used to infect mice. Twenty mice were infected with a single dose of *S. mansoni* cercariae. The animals were randomly divided into two groups: experimental group (Group A) and control group (Group B). Group A mice were challenged with the same number of cercariae six weeks after the primary infection. Perfusion of all mice was done 9 weeks after infection in order to obtain worm burdens in relation to their initial cercarial dose. The livers of all mice were obtained for parasitological and pathological assessments.

**Results:** Our results showed that all the exposed animals became infected with *S. mansoni*. After a challenge infection, Group A mice had a 54.66% worm reduction rate, 41.45% liver egg reduction rate, and 51.76% granuloma size reduction rate compared to their respective controls. This study shows that mice with persistent adult *S. mansoni* infection are able to mount a very strong regulatory response to a challenge infection. It is concluded that concomitant immunity does occur in mice.

**Conclusion:** These results describe novel imaging methods that permit visualization of live schistosomes within their living hosts and may help to elucidate mechanisms of infection and also be of value not only for epidemiological investigations, but also in designing government control programs for schistosomiasis. (*Turkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 19-22)

**Key Words:** *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*, concomitant immunity, mice

**Received:** 07.04.2012

**Accepted:** 29.11.2012

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı farelerde *Schistosoma mansoni*'ye karşı konkomitant bağışıklık üzerine gözlemleri doğrulamak ve meydan okuyan bir enfeksiyona karşı farelerin direnci üzerindeki etkilerini değerlendirmektir.

**Yöntemler:** Enfekte *Biomphalaria glabrata*'dan alınan serkaryalar fareleri enfekte etmek için kullanıldı. Yirmi fare tek doz *S. mansoni* serkaryası ile enfekte edildi. Hayvanlar rastgele iki gruba ayrıldı: deneysel grup (Grup A) ve kontrol grubu (Grup B). Grup A fareleri birincil enfeksiyondan altı hafta sonra aynı sayıda serkarya ile sınıandı. Başlangıç serkarya dozlarıyla ilişkili kurtçuk yükünü elde etmek için tüm farelere enfeksiyondan 9 hafta sonra perfüzyon yapıldı. Bütün farelerin karaciğerleri parazitolojik ve patolojik değerlendirmeler için alındı.

**Bulgular:** Sonuçlarımız maruz kalan tüm hayvanların *S. mansoni* ile enfekte olduğunu gösterdi. Karşılaşılan bir enfeksiyondan sonra ilgili kontrolleriyle kıyaslandığında, Grup A farelerde kurtçuk azalma oranı %54.66, karaciğerdeki yumurta azalma oranı %41.45, granülom boyutundaki azalma oranı %51.76 idi. Bu çalışma göstermektedir ki persistant yetişkin *S. mansoni* enfeksiyonu olan fareler, meydan okuyan bir enfeksiyona çok güçlü bir düzenleyici cevap oluşturabilmektedir. Farelerde konkomitant bağışık oluştuğuna karar verilmiştir.

**Sonuç:** Bu bulgular canlı şistozomların yaşayan konaklarında görüntülenmesini sağlayan yeni görüntüleme metodlarını tanımlamaktadır ve enfeksiyon mekanizmalarını açıklamaya yardımcı olabilir. Ayrıca bu bulgular, sadece epidemiyolojik araştırmalar için değil, şistozomiyaz için devlet kontrol programları tasarlamak için de önemlidir. (*Turkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 19-22)

**Anahtar Sözcükler:** *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*, konkomitant bağışıklık, fare

**Geliş Tarihi:** 07.04.2012

**Kabul Tarihi:** 29.11.2012

**Address for Correspondence / Yazışma Adresi:** Dr. Abdel-Rahman Al-Humiany, Department of Medical Microbiology, Taif University, Turaba, Saudi Arabia Phone: 00966542871245 E-mail: alhumiany-98@gmail.com

doi:10.5152/tpd.2013.05



## INTRODUCTION

Human schistosomiasis, caused by infection with trematodes belonging to the genus fluke *Schistosoma* (blood flukes), is one of the most common tropical diseases. Despite the fact that its global distribution has changed significantly, the disease is still a serious public health problem in many countries, affecting between 200-250 million people in developing countries (1, 2). In terms of control strategies for schistosomiasis, enormous efforts have been made to develop effective anti-schistosome vaccines, but none is available at the present time. This may be due to the complexity of the schistosome and its life cycle, in addition to the pathology and morbidity in this chronic disease, which result from the host immune inflammatory response to parasite eggs trapped in the liver and other organs (3, 4). A reduction in worm numbers is the "gold standard" for anti-schistosome vaccine development. Concomitant immunity (CI) has received attention in schistosomiasis and thus we shall motivate this paper with reference to this disease.

Concomitant immunity is characterized by the ability of a host to mount an effective defense against larval stages whilst being unable to clear a persistent burden of adult worms (5). From the parasite perspective, the generation of CI may be beneficial as it reduces intraspecific competition within the host. Even if it is beneficial to established parasites, CI may not be a parasite adaptation. It may, alternatively, be an incidental effect of an immunological reaction that is shaped by distinct host and parasite adaptations. Smithers et al. (5) transferred adult schistosomes (*Schistosoma mansoni*) from infected to uninfected monkeys in a series of surgical transplant experiments and later challenged the recipients with large numbers of cercariae. The recipient monkeys were almost totally resistant to the challenge infection, despite having no previous experience of larval schistosome stages, yet were unable to reject the implanted adults. Thus, a curious situation is exposed wherein adult worms are exempt from the immune response that they themselves provoke (6).

Schistosomal antigens are secreted and excreted into the blood from the established adult worms and from the migrating eggs, thereby providing a potent stimulus for the immune system. This response was found against challenge infection in rhesus monkeys, hamsters rabbits and mice (5, 7, 8). Larval exposure appears to be central to the CI found in lymphatic filariasis (9). Thus, there are two distinct sources of antigen that are acting to strengthen immunity against larval challenge and form the mechanistic basis of CI: larval-triggered and adult-triggered CI. From an evolutionary perspective, the latter is more unknowable. Adult-triggered CI may be interpreted as similar to vaccination; relatively long-living adult worms vaccinate their host against subsequent challenge infection. Autopsy data on *Schistosoma haematobium* infection in Egypt are suggestive of an even stronger impact of parasite density on individual fecundity. Here the mean egg output of a heavily infected host appeared to be lower than that of a host with fewer worms, and this was assumed to result from acquired immune responses to both past and current infection (10). These studies thereby provided a strong immunological basis for CI. However, a few authors have suggested that the

mechanism of resistance may be related to the hepatic pathology caused by the primary infection (11, 12). The vascular pathology might enable the challenge schistosome to escape from the hepatic portal system, thus preventing normal parasite sequestration and maturation in the liver.

### Objectives of the Present Study

The overall objective of this study was to test the effect of previous infection with *S. mansoni* on the resistance of mice to a challenge infection (CI) by comparing the following parameters with those obtained from age-matched control mice:

1. Parasitological parameters, such as the numbers of the recovered adult worms and the numbers of eggs retained in the liver in term of egg per gram (EPG) liver tissue.
2. Pathological parameters such as granuloma size.

The results of this study are expected to contribute towards the development of effective control programs.

## METHODS

### Animals

BALB/c male, naïve mice aged six to seven weeks were used in all experiments. The animals were divided randomly into 3 groups of 10 animals each, housed in polypropylene cages (445x280x125mm; Labotec, Johannesburg, South Africa) on wood shavings, 10 mice per cage. Each cage is approximately 15M<sup>2</sup> in area and is maintained under positive pressure, having an average temperature of 25±2°C with 12 h/12 h light/dark cycle, humidity of 50-600/0 and receiving 10-13 air changes per hour. Tap water and standard rodent food pellets (Epol, Pietermaritzburg, South Africa) were provided "ad libitum".

### Parasites and Snails Materials

The cercariae were obtained from laboratory raised and infected *Biomphalaria glabrata*. Cercaria shedding was induced by subjecting infected, water-immersed snails to light for 1.5 hours. The cercariae were concentrated by cooling and low speed centrifugation. After collecting from the infected snails, the cercariae were placed on coverslips and the number of cercariae used for each animal was accurately counted under a dissecting microscope.

### Infection of Mice

Each animal was exposed to percutaneous infection by approximately 100±2 *S. mansoni* cercariae using the paddling method (13). Briefly, animals were placed individually into 600 mL plastic beakers containing 80 mL of dechlorinated tap water and the appropriate number of cercariae. After 45 min, they were returned to their cages. All animals were infected on the same day within a period of 5 hours. The time between the primary and the challenge infection was six weeks, except where stated otherwise.

### Experimental Design

After cercarial exposure, the animals were randomly divided into two groups, each one with 10 mice, as follows:

- (a) Group A (Concomitant mice, previously-infected): was designed to evaluate the effect of the concomitant immunity to challenge infection. Mice in this group were challenged with the same number of cercariae six weeks after primary infection.

(b) Group B: Infected control-mice: these were mice with primary infection. They were infected and given distilled water, daily, from the 1<sup>st</sup> day of infection till the end of the 9<sup>th</sup> week post-infection.

#### Adult Worm Recovery

Nine weeks after cercarial exposure, all mice were sacrificed by cervical dislocation, and worms were recovered from the portal system and mesenteric veins by the vascular perfusion technique. The perfused saline plus blood drained through the portal vein was recovered in a beaker, and left to sediment. The supernatant was discharged and the sediment washed out twice with saline. After washings the recovered worms were counted under a magnifying lens.

The percentage of reduction for each group and each experiment was calculated according to the following formula:

$\% \text{ reduction} = (\text{mean of worms in control group} - \text{mean of worms in control treated}) \times 100 / (\text{mean of worms in control group})$

#### Liver Egg Counts (EPG)

At the time of perfusion, whole livers of experimental and control mice were weighed and a known portion (0.5 g) was removed to a screw cap glass tube and frozen until digestion. The frozen sample of the liver was minced. For digestion 5 mL of 5% KOH (Potassium hydroxide) was added to each tube and incubated at 37°C until the tissue was completely digested (10-12 hours). Egg counts of three 1 mL portions of the suspension were determined by microscopic examination at 40 X. Total egg counts were expressed for each group of mice as the mean number of eggs /gram of mouse liver (the EPG liver).

#### Liver Granuloma Measurement

Granuloma diameters were measured in histological sections. After portal perfusion, part of the liver tissue was immediately fixed in 10% buffered formalin solution and processed in paraffin blocks. Paraffin sections were routinely stained with hematoxylin-eosin (HE) for microscopic examination. In each histological section, 10 granulomas with visible central eggs were randomly selected; their diameters were measured at 10 X magnification using a calibrated ocular micrometer. Two perpendicular maximal diameters were measured, obtaining the mean diameter for each granuloma and then calculating the mean granuloma diameter for each mouse in a group and the sizes in a group were averaged for statistical comparison.

#### Statistical Analysis 2.8.

Data were presented as mean±SD. Group means and standard deviations for all groups were calculated and compared. Statistical significance was assessed by Student's t-test. Values of p<0.05 were taken to be significant.

### RESULTS

In order to measure the degree of protection conferred by concomitant immunity, Group A mice were challenged with *S. mansoni* normal cercariae. Worm burden, egg count in the liver, and hepatic granuloma size were determined for each group. The results are shown in Tables 1-3.

#### Worm Recovery

Infections were obtained in all mice. Immature worms were recovered from mice in both groups. These immature worms

**Table 1.** Comparison of worm numbers recovered from different groups

Group	Infection status	Worm burden	% Protection	p value
A	Challenge infection	27.50±5.00	54.66	<0.001
B	Primary infection	60.66±5.85	29.11	

The number of cercariae used for primary / challenge infections was 100

**Table 2.** Mean number of tissue egg counts and the percentage reduction in challenge egg deposition in the liver

Group	Infection status	Mean EPG	Reduction	p value
A	Challenge infection	468.75±42.69	41.45	<0.001
B	Primary infection	800.66±19.00		

**Table 3.** Granuloma sizes in different groups of mice 9 weeks after a single dose of 100 cercariae/mice

Group	Infection status	Granuloma size (µm)	Reduction	p value
A	Challenge infection	49.30±6.68	51.76	<0.01
B	Primary infection	102.2±17.14		

were included in figures for total worm burdens. Statistical analysis of the obtained data, presented in Table 1, showed that the application of concomitant immunity evoked a highly significant reduction (t=8.1012; p<0.001) in the mean worm count nine weeks after cercarial exposure as compared to the primary infected mice. This reduction was 54.66%.

#### Liver Egg Counts

The mean number of eggs deposited in the liver in the primary control mice was found to be 800.66±19.00 EPG. It was 468.75±42.69 in Group A, showing a highly significant decrease of 41.45% in the total liver eggs (t=12.34, p<0.001), Table 2.

#### Granuloma Size

In spite of the presence of lesions throughout the liver of all mice, however, significant differences in the tissue response to schistosome eggs were noted. The mean granuloma sizes after the challenge infection were 49.30±6.68 µm in group A, and 102.2±17.14 µm in the control group (group B). Thus, after a challenge infection, mice previously infected with *S. mansoni* developed lesions that were, on average, 51.76 % smaller than those formed in mice with primary infection (t=5.765, p<0.01), Table 3.

### DISCUSSION

Infection with *Schistosoma* spp. in the rat has been extensively studied, and offers several biological and immunological features which render this host an ideal model for the study of this parasite. This study confirms the possibility of the concomitant immunity (CI) as one of these features. Previous experimental studies on CI indicate that this feature is an immunological process and is called 'self-cure phenomenon' (14, 15). It was observed between the 4<sup>th</sup> and the 11<sup>th</sup> week, as measured by the liver perfusion technique, or by the lung recovery method (16-19). The exact mechanism of CI as a phase of acquired immunity is still unclear,

but many in vitro studies suggested the involvement of antibodies and non-sensitized cells in this process (20-22).

This study indicates that we have successfully established a new concomitant immunity model in mice with the following characteristics:

Resistance in previously infected mice to a challenge infection led to a 54.66% worm reduction rate, 41.45% liver egg reduction rate, and 51.76% granuloma size reduction rate, as compared to naive mice facing a similar challenge infection. Therefore, mice with previous *S. mansoni* infection are able to mount a very strong regulatory response to a challenge infection, which could be termed concomitant immunity.

The development of CI found in mice could be due to the following reasons:

First, the inhibition of egg production eliminates the excretion of soluble egg antigens (SEA) and, hence, the production of blocking antibodies as shown previously in NM mice, which may explain the enhancement of CI (23).

Second, comparing with the irradiated vaccine model, established by McLaren et al. (24), the protection against reinfection due to concomitant immunity is dependent on the living adult worms in NM mice. This is supported by Brown et al. (25), who concluded that adult worms might promote anti-larval immunity via the release of antigens, thus creating a barrier against continuous infection and limiting burden size within the host. This adult-triggered CI may be interpreted as similar to vaccination; relatively long-living adult worms "vaccinate" their host against subsequent challenge infection.

From the above discussion, it seems that our results strongly support the hypothesis first proposed by Smithers et al. (5) in 1969 that the resistance of the definitive host to schistosome reinfection is related to concomitant immunity induced by adult worms in vivo, which does not affect the established adult worms but does affect reinfection with the parasite in the larval stage.

## CONCLUSION

These results may have important implications not only for epidemiological investigations, but also in designing government control programs for schistosomiasis including anti-schistosome vaccine.

## Conflict of Interest

No conflict of interest was declared by the authors.

## REFERENCES

1. Copeland CS, Brindley PJ, Heyers O. Boudicca, a retrovirus-like long terminal repeat retrotransposon from the genome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *J Virol* 2003; 77: 6153-66. [CrossRef]
2. WHO. Prevention and control of schistosomiasis and Soil-transmitted helminthiasis. The Joint WHO Expert Committees. Geneva: 2002. Technical Report Series 912.
3. Bergquist NR. Schistosomiasis: from risk assessment to control. *Trends Parasitol* 2002; 18: 309-14. [CrossRef]
4. Capron A, Riveau GJ, Bartley, PB, McManus DP. Prospects for a schistosome vaccine. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2002; 2: 281-90. [CrossRef]
5. Smithers SR, Terry RJ. Immunity in schistosomiasis. *Ann N Y Acad Sci* 1969; 160: 826-40. [CrossRef]
6. Smithers SR, Terry RJ. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology* 1965; 55: 695-700.
7. Tendler M, Pinto RM, Oliveira Lima A, Gebara G, Katz N. *Schistosoma mansoni*: vaccination with adult worm antigens. *Int J Parasitol* 1986; 16: 347-52. [CrossRef]
8. Cutts L, Wilson RA. The protein antigens secreted in vivo by adult male *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 1997; 114: 245-55. [CrossRef]
9. Maizels RM, Lawrence RA. Immunological tolerance: The key feature in human filariasis? *Parasitol Today* 1991; 7: 271-6. [CrossRef]
10. Cheever AW, Kamel IA, Elwi AM, Mosimann JE, Danner R, Sippel JE. *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infections in Egypt. III. Extrahepatic pathology. *Am J Trop Med Hyg* 1978; 27: 55-75.
11. Wilson RA, Coulson PS, McHugh SM. A significant part of the 'concomitant immunity' of mice to *Schistosoma mansoni* is the consequence of a leaky hepatic portal system, not immune killing. *Parasite Immunol* 1983; 5: 595-601. [CrossRef]
12. McHugh SM, Coulson PS, Wilson RA. Pathologically induced alterations in the dimensions of the hepatic portal vasculature of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 1987; 94: 69-80. [CrossRef]
13. Frandsen F. Cultivation of schistosomes for chemotherapeutic studies. *Acta Pharmacol Toxicol* 1981; 49: 118-22. [CrossRef]
14. Phillips SM, Reid WA, Bruce JI, Hedlund K, Colvin RC, Campbell R, et al. The cellular and humoral immune response to *S. mansoni* infections in inbred rats. I. Mechanisms during initial exposure. *Cell Immunol* 1975; 19: 99-116. [CrossRef]
15. Cioli D, Dennert G. The course of *Schistosoma mansoni* infection in thymectomized rats. *J Immunol* 1976; 117: 59-65.
16. Smithers SR, Terry RJ. Acquired resistance to experimental infections of *S. mansoni* in the albino rat. *Parasit* 1965; 55: 711-9.
17. Knopf PM, Nutman TB, Reasoner JA. *S. mansoni*: resistance to reinfection in the rat. *Exp Parasit* 1977; 41: 74-81. [CrossRef]
18. Phillips SM, Reid WA, Sadun EH. The cellular and humoral immune response to *S. mansoni* infection in inbred rats. II. Mechanisms during reexposure. *Cell Immunol* 1977; 28: 75-83. [CrossRef]
19. Perez HA, Smithers SR. *Schistosoma mansoni* in the rat: the adherence of macrophages to schistosomula *in vitro* after sensitization with immune serum. *Int Journal Parasit* 1977; 7: 315-8. [CrossRef]
20. Dean DA, Wistar R, MuRuell KD. Combined in vitro effects of rat antibody and neutrophilic leukocytes on schistosomula of *S. mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 1974; 23: 420-7.
21. Perez HA, Clegg JA, Smithers SR. Acquired immunity to *Schistosoma mansoni* in the rat: measurement of immunity by the lung recovery technique. *Parasit* 1974; 69: 34915-20. [CrossRef]
22. Capron A, Dessaint JP, Capron M, Bazin H. Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature (Lond.)* 1975; 253: 47-52. [CrossRef]
23. Yi XY, Simpson AJ, de Rossi R and Smithers SR. The presence of antibody in mice chronically infected with *Schistosoma mansoni* which blocks in vitro killing of schistosomula. *J Immunol* 1986; 137: 3955-8.
24. McLaren DJ, Rogers MV. *Schistosoma mansoni*: liver phase challenge attrition is a stage-dependent phenomenon in guinea-pigs vaccinated with highly irradiated cercariae. *Parasite Immunol* 1986; 8: 307-18. [CrossRef]
25. Brown SP, Grenfell BT. An unlikely partnership: parasites, concomitant immunity and host defense. *Proc R Soc Lond B* 2001; 268: 2543-9. [CrossRef]



# The Value of micro-ELISA Test in the Diagnosis of *Fasciola hepatica* Infection

## *Fasciola hepatica* Enfeksiyonunun Tanısında micro-ELISA Testinin Değeri

Muhsin Kaya<sup>1</sup>, Remzi Beştaş<sup>1</sup>, Muttalip Çiçek<sup>2</sup>, Akın Önder<sup>3</sup>, Mehmet Ali Kaplan<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Gastroenterology, Faculty of Medicine, Dicle University, Diyarbakir, Turkey

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Dicle University, Diyarbakir, Turkey

<sup>3</sup>Department of General Surgery, Faculty of Medicine, Dicle University, Diyarbakir, Turkey

<sup>4</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Dicle University, Diyarbakir, Turkey

### ABSTRACT

**Objective:** In sero-diagnosis of parasitic infection, it is essential to inspect cross-reactivity between the target parasite and other parasites in order to assess diagnostic performance. The aim of this study was to determine the cut-off value of antibody titer for diagnosis of *F. hepatica* (FH) infection by using the micro-ELISA and diagnostic performance of this test.

**Methods:** The study population consisted of the following groups: FH group (n=42), *Echinococcus granulosus* (EG) group (n=27) and control group (n=33). The micro-ELISA test for detection of anti-*F. hepatica* antibody was performed in all groups.

**Results:** The test was positive in all patients with FH, in 3 out of 27 (11%) patients with EG and in none of the control group. Mean antibody titer was significantly higher in the FH group compared to the EG group (23.8±0.9 DU vs. 5.7±1.2 DU; p<0.001) and compared to the control group (23.8±0.9 DU vs. 2.4±0.2 DU; p<0.001). When we used 11,5 DU as a cut-off value for sero-diagnosis of FH, the positive predictive value was 93.3%, negative predictive value was 100%, sensitivity was 100%, and specificity was 95%.

**Conclusion:** Cross-reactions are an important issue in serological diagnosis of parasitic infections. The micro-ELISA test for FH antibody can not definitely discriminate fascioliasis from hydatid disease. (*Turkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 23-7)

**Key Words:** *Fasciola hepatica*, *Echinococcus granulosus*, micro-ELISA test

**Received:** 14.09.2012

**Accepted:** 28.11.2012

### ÖZET

**Amaç:** Paraziter hastalıkların serolojik tanısında kullanılan testin güvenilirliğini saptayabilmek için, hedef parazit ile diğer parazitler arasındaki çapraz reaksiyonun göz önünde bulundurulması gerekir. Çalışmamızın amacı *F. hepatica* (FH) tanısında kullanılan antikor titresinin eşik değerini saptamak ve testin güvenilirliğini ortaya koymaktır.

**Yöntemler:** Çalışmaya aşağıdaki gruplar alındı: FH grubu (n=42), *Echinococcus granulosus* (EG) grubu (n=27) ve kontrol grubu (n=33). FH antikorlarının saptanması için micro-ELISA testi tüm gruplarda çalışıldı.

**Bulgular:** Micro-ELISA testi FH grubundaki tüm hastalarda ve EG grubundaki 27 hastanın 3'ünde (%11) pozitif saptanırken, kontrol grubundaki hiç bir hastada pozitif saptanmadı. Ortalama antikor titresi FH grubunda EG grubuna göre (23.8±0.9 DU vs. 5.7±1.2 DU; p<0.001) ve kontrol grubuna göre (23.8±0.9 DU vs. 2.4±0.2 DU; p<0.001) anlamlı olarak daha yüksek saptandı. Fascioliasisin serolojik tanısı için 11.5 DU eşik değer olarak alındığında, micro-ELISA testinin pozitif prediktif değeri %93.3 ve negative prediktif değeri %100; duyarlılığı %100 ve özgüllüğü %95 olarak saptandı.

**Sonuç:** Paraziter enfeksiyonlarda çapraz reaksiyon önemli bir sorundur. FH enfeksiyonunun serolojik tanısında kullanılan micro-ELISA testi fascioliasisi hydatik hastalıktan ayırmada tek başına yeterli bir yöntem değildir. (*Turkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 23-7)

**Anahtar Sözcükler:** *Fasciola hepatica*, *Echinococcus granulosus*, micro-ELISA testi

**Geliş Tarihi:** 14.09.2012

**Kabul Tarihi:** 28.11.2012

**Address for Correspondence / Yazışma Adresi:** Dr. Muhsin Kaya, Department of Gastroenterology, Faculty of Medicine, Dicle University, Diyarbakir, Turkey Phone: +90 532 347 94 58 E-mail: muhsinkaya20@hotmail.com

doi:10.5152/tpd.2013.06

## INTRODUCTION

Fascioliasis is an infection caused by a trematode of the liver, *F. hepatica*, that particularly affects sheep, goats and cattle. The disease is transmitted to humans via ingestion of metacercaria from contaminated plants and after 3 to 4 months, the parasite is lodged in the biliary ducts of the liver. Afterwards, the final host releases the parasite eggs through the feces. Liver infection involves two stages- hepatic and biliary (1, 2). Common signs and symptoms of the hepatic phase are abdominal pain, fever, eosinophilia and abnormal liver function tests (1-4). The biliary phase usually presents with intermittent right upper quadrant pain with or without cholangitis or cholestasis (4, 5). Diagnosis may be delayed because of the wide spectrum of the differential diagnosis and low incidence of *F. hepatica* infection (1).

Diagnosis of *F. hepatica* infection has traditionally relied on detecting the presence of eggs in fecal samples, but this method is unreliable and complicated (6, 7). At present, the routine diagnosis of human fascioliasis is based on the detection of antifluke antibodies in serum. Methods such as immunoelectrophoresis and counterimmunoelectrophoresis, although they are very specific, have limited sensitivity (1, 8). Diagnosis was improved by the development enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (9-11). The cross-reactivity between *Echinococcus granulosus* (EG) and *F. hepatica* infection has been reported previously (12-14). Parasitic helminths express some antigen which often accounts for serological cross-reactions. In serodiagnosis, it is essential to inspect cross-reactivity between the target parasite and other parasites in order to assess diagnostic performance (14).

The aim of this study was: to determine the cut-off value of antibody titer by using micro-ELISA for diagnosis of *F. hepatica* infection, to determine the positivity rate of micro-ELISA test for EG in patients with *F. hepatica* infection, to determine the diagnostic performance of micro-ELISA test for *F. hepatica* infection (1-3).

## METHODS

### Study Population

This prospective study was conducted in the department of Gastroenterology and General Surgery of Dicle University Hospital between February 2010 and April 2012. The study population consisted of the following groups: *F. hepatica* group, Hydatid disease group and control group. All patients gave written informed consent and the study was approved by the local Ethics Committee.

In all subjects, initial complete clinical history, physical examination findings, routine laboratory results including complete blood count and routine biochemical analysis were recorded. Contrast enhancement abdominal computerized tomographic (CT) examination was performed in all patients with *F. hepatica* infection and hydatid disease. Abdominal ultrasound (US) examination was performed in all patients in the control group. All the CT scans were obtained using a 4 channel multislice CT scanner (Sensation 4, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany). A 3.75-MHz convex probe (Toshiba SSA-270 A, Tokyo, Japan) was used for US of the abdomen.

Micro-ELISA test using *F. hepatica* antigen from adult liver fluke [DRG Instrument GmbH, Germany; cut-off: 11.5 DRG Units (DU)] was used for serological diagnosis of fascioliasis. Titer of antibody was calculated according to the manufacturer's instruction.

The diagnosis of *F. hepatica* infection with the hepatic phase was based on: (a) The presence of previously described characteristic findings on the abdominal CT examination and exclusion of all known disease that cause hepatic lesions seen on CT examination; (b) and/or the presence of eggs of *F. hepatica* in the fecal examination (3, 4). The diagnosis of *F. hepatica* infection with the biliary phase was based on the extraction of living *F. hepatica* during endoscopic retrograde cholangio pancreaticography (ERCP).

The diagnosis of Hydatid disease was confirmed by characteristic CT findings before surgery and typical hydatid cystic appearance during surgery (15, 16).

Patients who were followed in the routine check-up department and without any disease were included in the study as the control group.

### Statistical Analysis

Mean and standard deviation (SD) were calculated for continuous variables. The normality of the variables was analyzed by the Kolmogorov-Smirnov test. The Chi-square ( $\chi^2$ ) test was used for categorical variables. The one-way ANOVA test was used for normal distributed numerical values. The Kruskal-Wallis test was used for non-normal distributed numerical values. Two-sided p values were considered statistically significant at  $p \leq 0.05$ . Analyses of nonparametric receiver operating characteristic (ROC) curves were performed to calculate the cut-off values. Statistical analyses were carried out by using the statistical packages for SPSS 17.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## RESULTS

Table 1 shows demographic features and laboratory results of all groups. During the study period, 42 patients were diagnosed as *F. hepatica* infection. In all patients, the diagnosis of fascioliasis was based on positive micro-ELISA test (titers  $>11.5$  DU) and characteristic abdominal CT findings. The mean titer of micro-ELISA for *F. hepatica*  $23.85 \pm 0.99$  (range: 13-38) DU. Forty-one out of 42 patients were accepted as hepatic phase of fascioliasis. The remaining one patient was accepted as biliary phase of fascioliasis. The diagnosis of biliary phase of fascioliasis was confirmed by extraction of living mobile *F. hepatica* from extrahepatic biliary ducts during the ERCP procedure. Microscopic examination of fecal specimen for eggs of *F. hepatica* revealed positive results only in two out of 42 patients with the hepatic phase of fascioliasis. After confirmation of fascioliasis, triclabendazole was administered at a dose of 10-12 mg/kg for 1 day in all patients. Six months after treatment, there was significant clinical, laboratory and tomographic improvement in all patients.

There were 27 patients in the hydatid disease group. Hydatid cyst was located with the right lobe of the liver in 18 patients, left lobe in 8 patients, and both lobes in 1 patient. The number of cysts was one in 18 patients, two in 6 patients and three in 3 patients. According to Gharbi's classification (16), there were type II cysts in 5 patients, type III in 15 patients and type IV in 7

**Table 1.** Shows initial demographic and laboratory features of all groups

	<i>Fasciola hepatica</i> group (F)	Hydatid disease group (H)	Control group (C)	p value
Gender (M/F)	12/30	9/18	21/12	NS
Age (range)	41.9 (18-72)	41.7 (17-79)	31.4 (15-65)	F-H: 0.726 H-C: 0.043 F-C: 0.001
Hb (g/dL)	12.4±0.26	12.5±0.3	13.1±0.3	NS
WBC (n/mm <sup>3</sup> )	10990±297	8420±552	6947±297	F-H: 0.028 H-C: 0.05 F-C: p<0.001
Eosinophil (n/mm <sup>3</sup> )	3276±628	406±189	154 ±18	F-H: <0.001 H-C: 0.103 F-C: <0.001
ALT (U/L)	36±17	60±28	20±2.4	F-H: <0.001 H-C: 0.011 F-C: 0.001
AST (U/L)	30±5.3	43±13	19±2.4	F-H: 0.267 H-C: <0.003 F-C: 0.031
GGT (U/L)	64±13	83±30	27±4.6	F-H: 0.856 H-C: <0.001 F-C: <0.001
T. bilirubin (mg/dL)	0.47±0.03	0.9±0.18	0.61±0.05	F-H: 0.039 H-C: 0.898 F-C: 0.039
ESR (mm/h)	38±6	12±1	20±3	F-H: <0.001 H-C: 0.258 F-C: 0.014
Micro-ELISA (DU)	23.8±0.9	5.7±1.2	2.4±0.2	F-H: <0.001 H-C: <0.001 F-C: <0.001

ALT: Alanine aminotransferase (range: 10-40 U/L), AST: Aspartat aminotransferase (range: 10-35 U/L), GGT: Gamma glutamyl transferase (range: 9-64U/L), ALP: Alkaline phosphatase (range: 40-150 U/L), T. bilirubin: Total bilirubin (range: 0.2-1.2 mg/dL), ESR: Erythrocyte sedimentation rate, NS: Not-significant, F-H: Fasciola hepatica group vs. Hydatid disease group, H-C: Hydatid disease group vs. control group, F-C: Fasciola hepatica group vs. control group. DU: DRG unite

patients. The mean cyst diameter was 8.35±0.68 (range: 34-122) mm. The mean titer of micro-ELISA for *F. hepatica* was 5.7±1.2 (range 1-32). The micro-ELISA test was positive in 3 out of 27 (11%) patients. Of patients with positive anti- *F. hepatica* antibody, two patients were female, and all patients had one cyst located in the right lobe of liver.

There were 33 subjects in the control group. Abdominal US showed no mass lesion in any of the patients. The mean titer of micro-ELISA for *F. hepatica* was 2.4±0.25 (range: 1-6) DU. The micro-ELISA test was negative in all patients.

#### Comparison of Groups

The positivity rate of micro-ELISA was significantly higher in the fascioliasis group compared to the hydatid disease group (100%

vs. 11%; p<0.001) and compared to the control group (100% vs. 0%; p<0.001). Mean micro-ELISA titers were significantly higher in the fascioliasis group compared to the hydatid disease group (23.8±0.9 DU vs. 5.7±1.2 DU; p<0.001) and compared to the control group (23.8±0.9 DU vs. 2.4±0.2 DU; p<0.001). When we used 11.5 DU as a cut-off value for sero-diagnosis of *F. hepatica*, the positive predictive value was 93.3%, negative predictive value was 100%, sensitivity was 100%, specificity was 95%.

There was no significant difference between the three groups regarding mean haemoglobin level. Mean eosinophil count was significantly elevated in the *F. hepatica* group compared to the hydatid disease group (p<0.001) and the control group (p<0.001). Serum alanine aminotransferase (ALT) level was significantly

lower in the fascioliasis group compared to the hydatid disease group ( $p < 0.001$ ) and significantly higher in the fascioliasis group compared to the control group ( $p = 0.001$ ). There were no significant differences between the fascioliasis group and hydatid disease group regarding serum aspartate aminotransferase (AST) and gamma glutamyl transferase (GGT) levels. Serum total bilirubin level was significantly higher in the fascioliasis group compared to the hydatid disease group and the control group ( $p = 0.039$ ). Erythrocyte sedimentation rate was significantly higher in the fascioliasis group compared to the hydatid disease group ( $p < 0.001$ ) and the control group ( $p = 0.014$ ).

## DISCUSSION

Parasitic helminths express various antigenic carbohydrates which often account for serological cross-reactions. In serodiagnosis, it is essential to inspect cross-reactivity between the target parasite and other parasites in order to assess diagnostic performance. Terminal Gal ( $\beta 1-6$ ) Gal1-motifs have previously been shown to represent antigenic epitopes of neogala-series glycosphingolipids from tape worms (17). The Gal ( $\beta 1-6$ ) Gal sequence is a common epitope between EG and *F. hepatica* (14). Wuhler et al. (17) reported that *F. hepatica* exhibits mammalian-type glycolipids as well as Gal ( $\beta 1-6$ ) Gal-terminating glycolipids that account for cestode serological cross-reactivity. Sera with *F. hepatica* infection have cross-reacted at the highest frequency (71.4%) against *Echinococcus multilocularis* antigen. In patients with other parasitic infections, sera showed cross-reaction against *F. hepatica* antigen bound to *Echinococcus multilocularis* antigen with a high frequency (23.7%) (14). In our previous study, we identified increased incidence of anti-*Echinococcus granulosus* antibody positivity using indirect immunofluorescence assay (IFA) in patients with *F. hepatica* infection (18). Şakru et al. (19) reported that 5 out of 226 (2.2%) *Echinococcus granulosus* suspected cases were found seropositive for *F. hepatica* antibodies by an excretory secretory ELISA (ES-ELISA) test. In this study, we showed that micro-ELISA test for *F. hepatica* is positive in 11% of patients with EG infection and it is negative in healthy control. The commercial DRG test was evaluated in cattle, obtaining a sensitivity and specificity of 98% and 96% at a cut-off value of 15% positivity, respectively. The sensitivity and specificity of ELISA in-house assays using DRG test for *F. hepatica* IgG antibody have been reported as 92.6% to 100% and 83.6% to 100% respectively (20-22). This IgG antibody may be in as 32 DU at high titers. The sensitivity of micro-ELISA test in our study is 100%, but the specificity is significantly lower (50%) compared to a previously reported study. Therefore, our findings are partially compatible with previously reported results. The false positive results of micro-ELISA test for *F. hepatica* in patients with hydatid disease may be related to antigenic similarity between *F. hepatica* and EG. The presence of cross-reactivity between parasites can suggest that serological tests without additional confirmative tests such as characteristic radiological findings are not reliable methods for diagnosis of these infections.

Typical organ lesion(s) detected by imaging technique (e.g. ultrasonography, computed tomography), specific serum antibodies assessed by high-sensitivity serological tests, histopathology or parasitology compatible with EG and detection of pathognomonic macroscopic morphology of cyst(s) in surgical specimens,

confirm the diagnosis of EG (16). Routine laboratory tests are not specific for diagnosis of Hydatid disease and may reveal normal or abnormal values. Screening tests such as indirect hemagglutination, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and latex agglutination use crude antigens and are associated with a high incidence of false-negative and false-positive results. The parasitic antigens of major diagnostic value are antigen 5 (arc-5) and antigen B (15). Purified fractions enriched in antigens 5 and B and glycoproteins from hydatid fluid yielded a sensitivity rate of 95%, with a specificity rate of 100% (23). The diagnosis of Hydatid disease was confirmed in all our patients by positive IFA test, computed tomography findings and pathognomonic surgical findings.

Diagnosis of fascioliasis may be delayed because of the wide spectrum of the differential diagnosis and low incidence of *F. hepatica* infection (3). Similar abnormal laboratory and radiological findings may represent viral hepatitis, liver abscess, malignancy, cholecystitis, sclerosan cholangitis, and AIDS-related cholangitis, ruptured hydatid cyst and parasites such as ascariasis and clonorchiasis (1, 3). The sensitivity and specificity of ELISA in-house assays using the DRG test for *F. hepatica* IgG antibody are between 92.6% to 100% and 83.6% to 100%; respectively (20-22).

Diagnosis is confirmed only by demonstrating the parasites or its egg in the bile or feces (1, 3). Negative stool examinations do not rule out the disease (3). A high index of suspicion and specific radiological findings including tunnel-like tracts extending towards the capsule and multiple, hypodense, linear or branching lesions on CT are very helpful in the diagnosis of fascioliasis (4). We suspected the possibility of fascioliasis in all patients with hepatic phase because of eosinophilia and characteristic CT findings. We found eggs in stool samples of two out of 42 (4.7%) patients with hepatic phase. Complete clinical, laboratory and radiological response after triclabendazole administration, associated with positive result in high titer of micro-ELISA against *F. hepatica*, confirmed the diagnosis in patients with hepatic phase of *F. hepatica* infection. Diagnosis in the patients with biliary phase was confirmed by extraction of living *F. hepatica* from bile ducts. We can suggest that stool examination for eggs is not a reliable method and both serological test and extraction of living parasites from the bile ducts are very reliable methods for diagnosis of fascioliasis.

## CONCLUSION

Cross-reactions are an important issue in serological diagnosis of parasitic infections. The micro-ELISA test for *F. hepatica* IgG antibody is positive in a minority of patients with hydatid disease and negative in healthy people. In clinical practice, the micro-ELISA test for *F. hepatica* IgG antibody cannot reliably discriminate fascioliasis from hydatid disease

## Conflict of Interest

No conflict of interest was declared by the authors.

## REFERENCES

1. Lim JH, Mairiang E, Ahn GH. Biliary parasitic diseases including clonorchiasis, opisthorchiasis and fascioliasis. *Abdom Imaging* 2008; 33: 157-65. [CrossRef]



2. Koç Z, Uluşan Ş, Tokmak N. Hepatobiliary fascioliasis: imaging characteristics with a new finding. *Diagn Interv Radiol* 2009; 15: 247-51.
3. Kabaalioglu A, Çubuk M, Şenol U, Cevikol C, Karaali K, Apaydin A, et al. Fascioliasis: US, CT; and MRI findings with new observations. *Abdom Imaging* 2000; 25: 400-4. [\[CrossRef\]](#)
4. Kaya M, Beştaş R, Çetin S. Clinical presentation and management of *Fasciola hepatica* infection: single-center experience. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4899-904. [\[CrossRef\]](#)
5. Bektaş M, Dökmeci A, Çınar K, Halici I, Öztas E, Karayalçın S, et al. Endoscopic management of biliary parasitic diseases. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 1472-8. [\[CrossRef\]](#)
6. Chen MG, Mott KE. Progress in morbidity due to *Fasciola hepatica* infection. *Trop Dis Bull* 1990; 87: 1-37.
7. Levine DM, Hillyer GV, Flores SI. Comparison of counter-electrophoresis, the enzyme-linked immunosorbent assay and Kato faecal examination for the diagnosis of fascioliasis in infected mice and rabbits. *Am J Trop Med Hyg* 1980; 29: 602-8.
8. Hillyer GV, Capron A. Immunodiagnosis of human fascioliasis by counter-immunoelectrophoresis. *J Parasitol* 1976; 62: 1011-3. [\[CrossRef\]](#)
9. Carnevale S, Rodríguez MI, Santillán G, Labbé JH, Cabrera MG, Bellegarde EJ, et al. Immunodiagnosis of human fascioliasis by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a micro-ELISA. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 174-7.
10. Rahimi MT, Ashra K, Koosha S, Abdi J, Rokni MB. Evaluation of Fast-ELISA versus Standard-ELISA to Diagnose Human Fasciolosis. *Arch Iran Med* 2011; 14: 18-21.
11. Arias MS, Piñero P, Hillyer GV, Francisco I, Cazapal-Monteiro CF, Suárez JL, et al. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of equine antibodies specific to a recombinant *Fasciola hepatica* surface antigen in an endemic area. *Parasitol Res* 2012; 110: 1001-7. [\[CrossRef\]](#)
12. Das K, Sakuja P, Aggarwal A, Puri AS, Tatke M. Non-resolving liver abscess with *Echinococcus* cross-reactivity in a non-endemic region. *Ind J Gastroenterol* 2007; 26: 92-3.
13. Ramzy RM, Helmy H, El Zeyyat EA, Rifaat MM, Abdel Hameed DM, Abdel-Baki MH. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgG1 antibodies specific to human cystic echinococcosis in Egypt. *Trop Med Int Health* 1999; 4: 616-20. [\[CrossRef\]](#)
14. Yamano K, Goto A, Nakamura-Uchiyama F, Nawa Y, Hada N, Takeda T. Galβ1-6Gal, antigenic epitope which accounts for serological cross-reaction in diagnosis of *Echinococcus multilocularis* infection. *Parasite Immunol* 2009; 31: 481-7. [\[CrossRef\]](#)
15. Sayek I, Tırnaksız MB, Doğan R. Cystic hydatid disease: Current trend in diagnosis. *Surg Today* 2004; 34: 987-96. [\[CrossRef\]](#)
16. Brunetti E, Kern P, Vuitton DA. Writing Panel for the WHO-IWGE. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Tropica* 2010; 114: 1-16. [\[CrossRef\]](#)
17. Wührer M, Grimm C, Dennis RD, Idris MA, Geyer R. The parasitic trematode *Fasciola hepatica* exhibits mammalian-type glycolipids as well as Gal (β1-6) Gal-terminating glycolipids that account for cestode serological cross-reactivity. *Glycobiology* 2004; 14: 115-26. [\[CrossRef\]](#)
18. Kaya M, Beştaş R, Girgin S, Çiçek M, Kaplan MA. Increased anti-*Echinococcus granulosus* antibody positivity in *Fasciola hepatica* infection. *Turk J Gastroenterol* 2012; 23: 339-43.
19. Şakru N, Korkmaz M, Demirci M, Kuman A, Ok ÜZ. *Fasciola hepatica* Infection in *Echinococcosis* Suspected Cases. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2011; 35: 77-80. [\[CrossRef\]](#)
20. Rokni MB, Massoud J, O'Neill SM, Parkinson M, Dalton JP. Diagnosis of human fasciolosis in the Gilan province of Northern Iran: application of cathepsin L-ELISA. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44: 175-9. [\[CrossRef\]](#)
21. Espinoza JR, Maco V, Marcos L, Saez S, Neyra V, Terashima A, et al. Evaluation of Fas2-ELISA for the serological detection of *Fasciola hepatica* infection in humans. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76: 977-82.
22. Figueroa-Santiago O, Delgado B, Espino AM. *Fasciola hepatica* saposin-like protein-2-based ELISA for the serodiagnosis of chronic human fascioliasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70: 355-61. [\[CrossRef\]](#)
23. Sbihi Y, Janssen D, Osuna A. Serologic recognition of hydatid cysts antigens using different purification methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 24: 205-11. [\[CrossRef\]](#)



# Kistik Ekinokokkozis Şüphesi ile 2005-2011 Yılları Arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına Gönderilen Örneklerin Değerlendirilmesi

Evaluation of Materials Sent due to Suspected Cystic Echinococcosis to the Parasitology Laboratory of Ondokuz Mayıs University Medical School between the Years 2005-2011

Adil Karadağ<sup>1</sup>, Keramettin Yanık<sup>1</sup>, Nevzat Ünal<sup>1</sup>, Hakan Odabaşı<sup>1</sup>, Murat Hökelek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

<sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

## ÖZET

**Amaç:** Kistik ekinokokkozis (KE) ülkemizde yaygın görülen önemli bir sağlık problemidir. Bu çalışmada Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına 2005-2011 yıllarında gönderilen ve KE şüpheli 454 hastanın serum örneklerinde anti- *Echinococcus granulosus* IgG antikorları aranmıştır.

**Yöntemler:** IHA (Fumouze, France) ve ELISA (R-Biopharm, Germany) testleri eş zamanlı olarak çalışılmıştır.

**Bulgular:** Çalışılan 454 hastanın 81'i (%18) her iki test ile pozitif olarak bulundu. Her iki testte pozitif olguların 40'ı (%49) kadın, 41'i (%51) erkek ve 25'i (%31) 31-50 yaşları arasındaydı. Hasta serumlarının 328'i (%72) her iki test ile negatif iken, 81'i (%18) her iki test ile pozitif olarak bulundu. Otuz üç (%7) hastada IHA negatif iken ELISA pozitif bulundu. İki (%0.4) hastada ise her iki testte düşük pozitiflik saptandı.

**Sonuç:** Yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip bu iki testin birlikte kullanılması KE'in serolojik tanısında önerilebilir. (*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 28-31)

**Anahtar Sözcükler:** Kistik ekinokokkozis, seroloji, tanı

**Geliş Tarihi:** 03.09.2012 **Kabul Tarihi:** 16.01.2013

## ABSTRACT

**Objective:** Cystic echinococcosis (CE) is an important health problem common in our country. In this study, anti-*Echinococcus granulosus* IgG antibodies were investigated in the serum samples of 454 patients who attended the Ondokuz Mayıs University, Faculty of Medicine, Department of Parasitology between 2005 and 2011.

**Methods:** IHA (Fumouze, France) and ELISA (R-Biopharm, Germany) tests were performed at the same time.

**Results:** While serum samples from 328 patients (72%) were negative with both tests, 81 samples (18%) were found to be positive with both tests. Forty (49%) cases were female, 41 (51%) cases were male who were positive by both tests. 25 (31%) positive cases were between 31 and 50 years old. While IHA was negative for 33 patients (7%) ELISA was positive for the same samples. In 2 patients (0.4%), both tests revealed low-positivity.

**Conclusion:** Using these two tests together for serologic detection of cystic echinococcosis could be recommended because of the high sensitivity and specificity ratios. (*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 28-31)

**Key Words:** Cystic echinococcosis, serology, diagnosis

**Received:** 03.09.2012 **Accepted:** 16.01.2013

## GİRİŞ

Ekinokokkozis, sestod sınıfı içerisinde yer alan ekinokok türlerinin neden olduğu zoonotik bir hastalıktır (1). Kistik ekinokokkozis (KE) ise *Echinococcus granulosus*'un sebep olduğu ve birçok ülkede olduğu gibi ülkemizde de yaygın görülen

önemli bir sağlık problemidir (2). Türkiye'de 1987-1994 yılları arasında, KE'li olgu sayısı 21.303 olarak bildirilmiştir (3).

*E. granulosus*' a bağlı hidatik kistlere, en çok karaciğerde (%44-%65) ikinci olarak akciğerlerde (%25-%31) ve daha az sıklıkla beyin, kalp, kemik, böbrek ve dalak (%10-%25) gibi

**Yazışma Adresi / Address for Correspondence:** Dr. Nevzat Ünal, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye Tel: +90 362 312 19 19 E-posta: drnevzatunal@hotmail.com

doi:10.5152/tpd.2013.07

organlarda rastlanmaktadır (3, 4). KE'nin tanısında kist sıvısının incelemesi yanında serolojik yöntemler kullanılmaktadır (1, 5). Özellikle klinik ve radyolojik olarak belirsizliğin olduğu vakalarda seroloji oldukça değerlidir (6). İnvaziv olmayan görüntüleme tekniklerinin, seroloji ile desteklenmesi gerekir. Tanıda bilinen bütün serolojik testler kullanılabilir gibi bunlar arasında İndirekt Hemaglütinasyon (IHA) ve Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testlerinin en çok kullanılan ve güvenilir olduğu bildirilmiştir (7).

Bu çalışmada, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına 2005-2011 yıllarında KE şüphesi ile gönderilen hastaların seroloji sonuçlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## YÖNTEMLER

Bu çalışmada KE ön tanılı toplam 454 hastanın serum örneği IHA yöntemi ile ticari kit (Hydatidose, Fumouze Laboratoires, France) test prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Serum dilüsyonları U tabanlı mikropklarda yapıldı. Antijenli eritrosit süspansiyonu eklendi ve oda ısısında 2 saatlik inkübasyon sonrası düğme iliği şeklinde çökelti olanlar negatif, kenarı tırtıklı düzensiz bir çökelti verenler veya çökelti olmayanlar pozitif olarak değerlendirildi. ELISA yönteminde ise (R-Biopharm, Germany) ticari kiti üretici firmanın prosedürüne göre değerlendirildi.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan toplam 454 hastanın 258'i (%57) kadın, 196'sı (%43) erkekti. Hasta serumlarının 328'i (%72) her iki test ile negatif iken, 81'i (%18) her iki test ile pozitif olarak bulundu. 33 (%7) hastada IHA negatif iken ELISA pozitifken, 2 (%0.4) hastada ise her iki testte düşük pozitiflik saptandı (Tablo 1). KE şüpheli hastaların yaş gruplarına, yıllara ve cinsiyete göre dağılımları Tablo 1, 2 ve 3'te sunulmuştur. Her iki testi pozitif olanların 40'ı (%49) kadın, 41'i (%51) erkekti ve bu olguların sıklıkla 31-50 yaşları arasında olduğu dikkati çekti.

## TARTIŞMA

*E. granulosus* tüm dünyada geniş bir coğrafi bölgeye yayılmıştır ve bütün kıtalarda görülmektedir. Ülkemizde KE'ye, veteriner kontrolünde olmayan sokak köpeklerinin yaygınlığı ve gerekli önlemlerin alınmaması gibi nedenlerden dolayı oldukça sık rastlanmaktadır (8). Hastalık yavaş seyirli olup, kist rüptüre olmadığı sürece eğer küçük boyutlarda ise çoğunlukla asemptomatiktir. Tedavi edilmediği durumlarda rüptüre olan kist, çeşitli komplikasyonlara ve ölüme sonuçlanan klinik tablolara neden olmaktadır. Erken tanı ve tedavi ile olası kötü sonuçların önü alınabilmek-

tedir (9). Bir yaş altı çocukluktan 75 ve üzeri yaş'a kadar her yaşta görülebildiği bilinmektedir (10).

Çeşitli çalışmalarda hastalığın cinsiyet ile bağlantısı incelenmiştir. İç Anadolu Bölgesinde yer alan 13 ilde 2001-2005 yılları arasında yapılan bir çalışmada KE tanısı konmuş 5346 olgunun 2998'inin (%56) kadın, 2348'inin (%44) erkek olduğu belirtilmiştir (11).

Canda ve ark. (12) KE'ye kadınlarda %60, erkeklerde ise %40 oranında rastladıklarını, Aldemir ve ark. (13) Konya Numune Hastanesinde cerrahi girişim yapılan KE olgularının %68.52'sinin kadın, %31.44'ünün ise erkek olduğunu bildirmişlerdir. Tefik ve ark. (8) Malatya'da yaptıkları çalışmada KE olgularının %57.75'inin kadın, %42.25'inin ise erkek olduğunu saptamışlardır. Delibaş ve ark.'nın (7) Dokuz Eylül Üniversitesi'nde 465 hastayı içeren çalışmalarında olguların %63.7'si kadın, %36.3'ü erkek olarak bildirilmektedir.

Parazitin her iki cinsiyette eşit oranlarda hastalık oluşturduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Karaman ve ark. (14) Kars bölgesinde hidatik kist prevalansını inceledikleri çalışmalarında kadınlarda %35.6, erkeklerde %33.6 pozitiflik bulmuş ve cinsiyet açısından anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Gündoğdu ve ark. (15) çalışmalarında KE tanısı konulan olguların %49.6'sının erkek, %50.4'ünün kadın hastalardan oluştuğunu tespit etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda veriler yukarıda sözü edilen birçok çalışmada olduğu gibi kadınlarda görülme sıklığının fazla olmasına ait sonuçlar ile uyumlu değildir. Bizim serolojik verilerimize göre her iki cinsiyette birbirine yakın oranda pozitiflik görülmektedir. Çalışmalar arasındaki bu farklılığın maruziyet açısından kadınların, bölgeler arasında kırsal alanda çalışma ve diğer yaşam alanlarında bulunma farklılıklarından kaynaklanabileceği düşüncesindeyiz.

Tefik ve ark. (8) Malatya'da yaptıkları çalışmada kist vakalarının en sık olarak (%24.01) 21-30 yaşları arasında olduğunu saptamışlardır. Aldemir ve ark.'da (13) vakaların en sık (%23.7) 21-30 yaşları arasında olduklarını bildirmişlerdir. Delibaş ve ark. (7) ise vakaların en sık (%46) 20-40 yaş grubunda olduğunu bildirmektedir. Bizim çalışmamızda ise her iki testi pozitif olanların %31'lik oranla en sık 31-50 yaş arasında olduğu saptandı. Olgulardan 0-15 yaş grubu arasındakilerin pozitiflik oranı %14, 61 yaş ve üzerindekiilerin ise %16 olarak belirlendi. Bu farklılığın, hastalığın yavaş seyirli bir enfeksiyon olması nedeniyle kişisel immünite ve bölgesel yaşam şekli farklılıklarından kaynaklanabileceği düşüncesindeyiz.

Yapılan bazı çalışmalar, duyarlılığı yüksek testler kullanılmasına rağmen KE'li hastaların bir kısmında antikor tespit edilemediğini göstermektedir. Beyinde ve gözde yerleşen kistler ve kalsifiye

**Tablo 1.** KE şüpheli olguların yaş gruplarına göre dağılımı

Test / Yaş	0-15	16-30	31-50	51-60	>61	Toplam
IHA-ELISA Negatif	74	41	78	54	81	328
IHA Pozitif-ELISA Negatif	1	3	4	0	2	10
IHA-ELISA Pozitif	11	15	25	17	13	81
IHA-ELISA Düşük Pozitif	0	0	2	0	0	2
IHA Negatif-ELISA Pozitif	12	3	5	7	6	33
Toplam	98	62	114	78	102	454

**Tablo 2.** KE şüpheli olgularda her iki testi pozitif olanların yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş/Yıl	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Toplam
0-15	1	1	1	0	2	4	2	11
16-30	0	1	1	3	0	7	3	15
31-50	6	7	4	1	1	2	4	25
51-60	2	1	4	0	1	7	2	17
>61	1	0	3	2	2	4	1	13
Toplam	10	10	13	6	6	24	12	81
Toplam Şüpheli Olgu Sayısı	32	48	99	35	40	117	83	454

**Tablo 3.** KE şüpheli olguların serolojik sonuçlarının cinsiyete göre dağılımı

Test / Cinsiyet	Kadın (%)	Erkek (%)	Toplam (%)
IHA-ELISA Negatif	186	142	328 (72)
IHA Pozitif-ELISA Negatif	7	3	10 (2)
IHA-ELISA Pozitif	40	41	81 (18)
IHA-ELISA Düşük Pozitif	1	1	2
IHA Negatif-ELISA Pozitif	24	9	33 (7)
Toplam	258 (57)	196 (43)	454

olmuş kistler genellikle çok düşük, hatta hiç antikor oluşturmamaktadır. Antikor yanıtı bazı insan popülasyonlarında ve çocuklarda da düşük olabilmektedir (5). Çalışmamızda düşük pozitif olarak saptanan iki olgunun 31-50 yaş aralığında olması bu yaş grubuna ait hastaların diğer yaş gruplarından fazla olması ya da kistlerin anatomik yerleşimi, hastalığın erken evresi gibi durumlara bağlı olabilir.

Tanıda önemli yeri olan radyolojinin yanında, serolojik testler de yaygın olarak kullanılmaktadır (2, 7, 9). Serolojik testler, operasyon öncesi radyoloji ile birlikte basit kist, abse, tümör gibi yer kaplayan olgularla, ayırıcı tanının yapılarak tanının desteklenmesi, operasyon sonrası nükslerin daha sağlıklı bir şekilde değerlendirilmesi ve tedavi başarısının izlenmesinde son derece önemlidir (2, 3, 9). Serolojik testlerin duyarlılık ve özgüllüğünün, kullanılan antijenin cinsi ve hazırlanma şekli, değişik pozitiflik kriterleri, kistin canlılığı ve lokalizasyonu, parazitin suşu gibi birçok etkene bağlı olarak farklı olabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle immüno-lojik tanıda duyarlılık ve özgüllüğü arttırmak için, aynı hasta serumunun birden fazla serolojik yöntemle çalışılması önerilmektedir (5, 11, 16). Çalışmamızda bu durum göz önüne alınarak IHA ve ELISA testleri birlikte uygulanmıştır. IHA'da tannik asitle duyarlılaştırılan eritrositlerin yüzey gerilimlerinin değişmesiyle antijen tutmaları özelliğinden yararlanılmaktadır (16). Bugüne kadar KE tanısında IHA testinden pek çok araştırmacı yararlanmış ve IHA ile %52-93 arasında değişen olumlu sonuçlar alınmıştır. Kistin yerleşimi, konağın biyolojik aktivitesi ve testin uygulanış şeklinin bu sonuçlar üzerine etkili olduğu bildirilmiştir (17). Polistren plaklara emdirilmiş antijen moleküllerine bağlanan özel antikolar üzerine, indirekt olarak enzim işaretli anti-insan immünglobülinlerinin bağlanması ve bileşimindeki enzimin substratı ile renk vermesi esasına dayanan ELISA testi, 1971 yılında Engvall ve Perlmann

tarafından geliştirilmiştir. Duyarlı, güvenilir ve kolay uygulanabilir olması, enzim işaretli kromojen substrat kullanılarak görülebilir ve okunabilir sonuçlar vermesi ve çok sayıda serumun aynı zamanda çalışabilmesi bu yöntemin avantajlarıdır (18).

Altıntaş (19) tarafından yapılan bir çalışmada operasyon ile KE tanısı kesin olarak doğrulanmış olgularda uyguladığı kompleman birleşmesi testinde %62.7, IHA'da %93.3, Immüno-diffüzyon testinde %27.7, Immünoelektroforez testinde %27.7 oranında seropozitiflik saptamıştır. Yazar ve Altıntaş, yaptıkları bir çalışmada, KE tanısı için serolojik testlerin tek başlarına ve birlikte kullanılmaları ile ilgili elde ettikleri sonuçları; IHA'da tek başına özgüllük %94.7, duyarlılık %94.1, ELISA'da tek başına özgüllük %96.7, duyarlılık %92.6, IHA ve ELISA birlikte kullanıldığında özgüllük %96.7, duyarlılık %91.9 olarak bildirmişlerdir (20). Force ve ark. (21) ise 131 hastada *E. granulosus*'a bağlı hidatik kist hastalığının preoperatif tanısı için 8 farklı serolojik test kullanmışlar, en duyarlı (%94) ve en özgül (%99) testin IgG ELISA olduğunu bildirmişlerdir.

## SONUÇ

Kistik ekinokokkozisin tüm dünyada ve ülkemizde olduğu gibi Samsun ve çevresi için de önemini koruyan bir sağlık sorunu olduğu görülmektedir. KE'nin serolojik tanısında tek bir testin yeterli olmadığı, birden fazla serolojik yöntemle elde edilen sonuçların daha güvenilir olduğu görülmektedir. Bu amaç doğrultusunda, duyarlılığı yüksek ve uygulaması kolay olması nedeniyle IHA ve ELISA testlerinin birlikte kullanılmasının, uygun olacağı kanısındayız.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

- King CH, Fairley JK. Cestodes (Tapeworms). in Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). 7th ed. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Elsevier, Churchill, Livingstone; 2009; 290: 3607-16.
- McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. *Echinococcosis*. Lancet 2003; 362: 1295-304. [CrossRef]
- Altıntaş N. Cystic and alveolar echinococcosis in Turkey. Ann Trop Med Parasitol 1998; 92: 637-42. [CrossRef]
- Ozekinci N, Bakir S, Mizrak B. [Evaluation of cystic echinococcosis cases given a histopathologic diagnosis from 2002 to 2007 in Diyarbakir]. Türkiye Parazitolojisi Dergisi 2009; 33: 232-5.
- Altıntaş N, Yazar S. Cystic Echinococcosisde Immun Tanı. Altıntaş N, Tınar R, Çoker A. eds. Echinococcosis. İzmir: Hidatidoloji Derneği, Yayın No:1; 2004: 159-80.

6. Kilimcioğlu A, Ok ÜZ. İnsanda Echinococcus Türlerinin Epidemiyolojileri, Coğrafi Yaygınlık ve Türkiye'deki Durum. Altıntaş N, Tınar R, Çoker A, eds. Echinococcosis. İzmir; 2004: 129-32.
7. Delibaş SB, Ozkoç S, Sahin S, Aksoy U, Akisü C. [Evaluation of patients presenting with a suspicion of cystic echinococcosis to the serology laboratory of the Parasitology Department of Dokuz Eylül University Medical Faculty]. Türkiye Parazit Derg 2006; 30: 279-81.
8. Tevfik M, Aldemir OS, Karadaş K, Çelik T, Daldal N. Malatya Bölgesinde Uniloküler Kistik Ekinokokkozis. Türkiye Parazit Derg 2000; 24: 33-6.
9. Eliades P, Karagouni E, Stergiatou I, Miras K. A simple method for the serodiagnosis of human hydatid disease based on a protein Arcolloidal dye conjugate. J Immunol Methods 1998; 218: 123-32. [\[CrossRef\]](#)
10. Ertabaklar H, Pektaş B, Turgay N, Yolasiğmaz A, Dayangaç M, Özdamar A, ve ark. İzmir ve çevresindeki Hastanelerde Ocak 1997-Mayıs 2001 Arasında Saptanan Kistik Ekinokokkozis Olgular. Türkiye Parazit Derg 2003; 27: 125-8.
11. Yılmaz RG, Babür C. Ekinokokkozis Tanısı. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 2007; 64: 35-44.
12. Canda MŞ, Canda T. Ekinokokkozis: 47 Olgunun Sunumu ve Türkiye'nin Ekinokokkozis Sorunu. Türkiye Parazit Derg 1995; 19: 64-82.
13. Aldemir OS, Baykan M, Gökçen A. Konya Numune Hastanesinde 1986-1998 Yılları Arasındaki Kist Hidatik Olgularının Retrospektif Değerlendirilmesi. Türkiye Parazit Derg 2000; 24: 73-5.
14. Karaman U, Mıman O, Kara M, Gıcık Y, Aycan OM, Atambay M. [Hydatid cyst prevalence in the region of Kars.]. Türkiye Parazit Derg 2005; 29: 238-40.
15. Gündoğdu C, Arslan R, Arslan MO, Gıcık Y. [Evaluation of cystic and alveolar echinococcosis cases in people in Erzurum and surrounding cities.]. Türkiye Parazit Derg 2005; 29: 163-6.
16. Özcel MA, Altıntaş N. Parazit Hastalıklarında Tanı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:15; 1997: 193-214.
17. Akgün S. Echinococcus Granulosus'a Karşı Oluşan Antikorların IHA, IFA ve ELISA ile Tesbiti ve Western Blot ile Antikor Çeşitliliğinin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Gaziantep: Gaziantep Üniversitesi Mikrobiyoloji Ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. 2008.
18. Grigorova R, Norris JR. Methods in Microbiology. Academic Press Limited. UK; 1990: 22: 512-20.
19. Altıntaş N. Kist Hidatik ve iç organlar larva göçü hastalıklarında immünolojik tanı yöntemleri ve değerleri. Doktora Tezi. İzmir: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Bilim Dalı 1985.
20. Yazar S, Altıntaş N. Serodiagnosis of Cystic Echinococcosis in Turkey. Helminthologia 2003; 40: 9-13.
21. Force L, Torres JM, Carrillo A, Busca J. Evaluation of eight serological tests in the diagnosis of human echinococcosis and follow-up. Clin Infect Dis 1992; 15: 473-80. [\[CrossRef\]](#)



# Head Lice Prevalence and Associated Factors in Two Boarding Schools in Sivas

Sivas'ta İki Yatılı Okulda Baş Biti Yaygınlığı ve Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesi

Serpil Değerli<sup>1</sup>, Erdoğan Malatyalı<sup>1</sup>, Kosta Y. Mumcuoğlu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Cumhuriyet University, Sivas, Turkey

<sup>2</sup>Department of Microbiology and Molecular Genetics, The Kuvın Centre for the Study of Infectious and Tropical Diseases, Jerusalem, Israel

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of the study was to determine the prevalence of head louse infestations and the factors affecting the rate of infestation in primary school children in Sivas.

**Methods:** A total of 342 children (249 girls and 93 boys) were examined with a louse comb for the presence of head lice. A questionnaire with 23 questions was distributed among the pupils and their parents.

**Results:** The overall infestation rate for head lice was 10.2% (n=35). The infestation rate was higher in girls (13.7%) than in boys (1.1%) (p<0.05). Children who had been infested in the past (27.1%) were more likely to be infested than those who had not been infested previously (7.2%) (p<0.05). The same was true for children whose family members were previously infested and those who were not (30% and 8.5%, respectively) (p<0.05). Head lice infestation was highest (20%) in children aged 6-11 and lowest (5.3%) in children aged 13-15 (p<0.05). The frequency of bathing and washing their hair, sharing combs, beds and towels, the hair color, hair thickness and quantity of dandruff, the number of family members and number of rooms per family member, were not significantly different between infested and non-infested children. A significant difference was found in the infestation of long haired (15.1%) compared with short haired pupils (4.5%) (p<0.05).

**Conclusion:** Girls were more often infested than boys and children who were previously infested with lice, or came from families where there had been previous infestation, had a greater chance of being re-infested. (*Turkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 32-5)

**Key Words:** *Pediculus humanus capitis*, head louse, epidemiology, Sivas, Turkey

**Received:** 10.07.2012

**Accepted:** 30.11.2012

## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada ilköğretim çağındaki çocuklarda baş biti görülmesini etkileyen faktörlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntemler:** Bu amaçla yatılı ilköğretim bölge okullarında (Merkez YİBO ve Pamukpınar YİBO) öğrenim gören, yaşları 6-15 arasında değişen 249'u kız ve 93'ü erkek olmak üzere toplam 342 çocuk baş biti açısından değerlendirilmiştir. 23 sorulu bir anket çocuklara dağıtılmıştır.

**Bulgular:** Öğrencilerin %10.2'inde (%10.2) bit infestasyonu tespit edilmiştir. Kız öğrenciler arasında (%13.7) baş biti görülme oranının erkeklerle (%1.1) göre daha fazla olduğu ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır (p<0.05). Ankete göre, geçmişte bit infestasyonu geçiren öğrencilerin %27.1'inde tekrar baş biti saptanırken, daha önce bit infestasyonu geçirmeyen öğrencilerin %7.2'inde yeni bitlenme olduğu bulunmuştur (p<0.05). Ailesinde bitlenen başka birinin olduğunu bildiren çocuklarda baş biti yaygınlığı (%30) olmayanlara göre (%8.5) daha yüksek bulunmuştur (p<0.05). Bit infestasyonu 6-11 yaşındaki öğrencilerde (%20) diğerlerine oranla daha yüksektir (p<0.05). Uzun saçlı öğrencilerin %15.1'inde ve kısa saçlı öğrencilerin ise %4.5'inde bit tespit edilmiştir (p<0.05).

**Sonuç:** Kızlar, erkeklerle nazaran daha fazla infeste olmakta, daha önce bitlenen ve diğer aile üyelerinde bitlenme durumu olan çocukların, tekrar bitlerle infeste olma şanslarının daha yüksek olduğu görülmüştür. (*Turkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 32-5)

**Anahtar Sözcükler:** *Pediculus humanus capitis*, baş biti, epidemiyoloji, Sivas, Turkey

**Geliş Tarihi:** 10.07.2012

**Kabul Tarihi:** 30.11.2012

**Address for Correspondence / Yazışma Adresi:** Dr. Serpil Değerli, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Cumhuriyet University, Sivas, Turkey Phone: +90 346 219 10 10 E-mail: sdegerli@cumhuriyet.edu.tr

doi:10.5152/tpd.2013.08

## INTRODUCTION

Head lice are an ongoing public health problem for children and their parents worldwide. The prevalence of the parasite can greatly vary from country to country and between regions of the same country, and it is usually higher among children aged 3 to 14 years (1-4). The socio-economic level of the examined population, the season in which they were examined, and the hygienic conditions under which children and their families lived, could be of importance (5). Head lice spread rapidly in overcrowded places such as nurseries, schools, prisons, and mental hospitals (4). The gold standard in the diagnosis of head lice is the detection of living adults, nymphs and/or eggs on the scalp. Although most of the studies are conducted by visual inspection of the hair, using a louse comb is approximately 5 times more effective in detecting lice than examination by hand (6, 7). Detection of living lice indicates an active infestation, while the presence of nits only indicates a past infestation (8).

The aim of the present study was to determine head lice prevalence in two boarding schools in Sivas, Turkey and to assess the risk factors related to infestation.

## METHODS

### Locality of the Schools and Period of Examination

The present study was conducted during the period of February to May 2011 in a boarding school in the center of the city of Sivas and in Yıldızeli, one of the 17 districts of Sivas. Sivas is located in the eastern part of the central Anatolian region of Turkey and is the capital of the second largest province of Turkey.

At the beginning of the study, teachers and pupils were informed about head louse biology and control by a short power point presentation. Before the physical examination, the hair color (brown, black, blond), hair structure (straight, wavy, curly), hair length (short, medium, long), hair thickness (thin, thick) and presence and quantity of dandruff was noted for each child. A total of 249 girls and 93 boys were examined for the presence of head louse adults, nymphs and eggs/nits. The hair of each child examined for at least 2-3 minutes with the help of a louse comb (Sirma®, İstanbul). After examination, the comb was given as a present to the examined child. Collected lice and hair with nits/eggs, which were cut from the infested child's hair, were preserved in 70% ethyl alcohol and later brought to the laboratory for more detailed examination under a light microscope.

### Questionnaire

After the examinations, pupils were asked to complete a questionnaire with 23 closed-ended questions. Both parents and teachers were requested to help pupils to fill in the questionnaire and to return it to the examiners. The survey included questions related to the age of the child, the frequency of bathing and washing hair, number of family members, number of rooms per family member at home, and customs of sharing combs, bed and towels.

### Statistics Analyses

The collected data were evaluated using the SPSS for Windows 14 program. Results were considered to be of statistical significance if the relevant p-value was <0.05.

## RESULTS

The overall prevalence of head louse infestation in the two boarding schools was 10.2%. No statistical difference was observed between the two schools regarding louse infestation. Out of 35 infested children, 16 were infested with nits alone, 11 with all stages of the parasite, 5 with nymphs and 3 with adult lice only. Girls were significantly more infested (13.7%) than boys (1.1%) ( $p < 0.05$ ). Schoolchildren who had been infested in the past with lice were more infested (27.1%) than those who had not been infested before (7.2%) ( $p < 0.05$ ). The same was true for children whose family members were previously infested with lice than those coming from families who had never had lice (30% and 8.5%, respectively) ( $p < 0.05$ ) (Table 1). Head louse infestations were highest (20%) in children aged 6-11 and lowest in children aged 14-15 ( $p < 0.05$ ) (Table 2). The frequency of bathing and washing hair, number of family members, number of rooms per family member, habits of sharing combs, bed and towels, hair color, hair thickness and quantity of dandruff, were not significantly different between infested and non-infested children. A significant difference was found between longhaired (15.1%) and shorthaired pupils (4.5%) ( $p < 0.05$ ) (Table 3, 4). In the majority of cases (81.1%), the mothers were responsible for the diagnosis and treatment of head lice.

## DISCUSSION

A total of 342 schoolchildren were screened for the presence of head lice and, in 35 of them (10.2%), head lice were detected. In

**Table 1.** Prevalence of head lice infestation in relation to infestation in the past, infestation of another family member and level of knowledge in pupils regarding head lice

	Actually infested n (%)	Statistical analysis
Infestation with lice in the past		
Yes	13 (27.7)	$\chi^2=18.89$ $p < 0.05$
No	2 (7.2)	
Infestation with lice of other family members		
Yes	9 (30)	$\chi^2=13.61$ $p < 0.05$
No	26 (8.5)	
Knowledge of head lice		
Yes	14 (9.7)	$\chi^2=0.26$ $p > 0.05$
No	20 (10.3)	

**Table 2.** Prevalence of head lice by age in two primary boarding schools

Age of the examined child	Number examined	Positive for head lice n (%)	Statistical analysis
6-9	30	6 (20.0)	$\chi^2=6.59$ $p < 0.05$
10-12	198	23 (11.6)	
13-15	114	6 (5.3)	
Total/Average	342	35 (10.2)	



**Table 3.** Prevalence of head lice infestation in relation to hair color, hair structure, hair length, hair thickness and quantity of dandruff

	Number examined	Positive for head lice n (%)	Statistical analysis
Hair color			
Brown	156	21 (13.5)	$\chi^2=4.32$ $p>0.05$
Black	143	9 (6.3)	
Yellow	42	5 (11.9)	
Hair style			
Straight	229	21 (9.2)	$\chi^2=2.10$ $p>0.05$
Curly	27	2 (7.4)	
Wavy	83	12 (14.5)	
Hair length			
Short	132	6 (4.5)	$\chi^2=7.89$ $p<0.05$
Medium	123	16 (13)	
Long	86	13 (15.1)	
Hair thickness			
Thin	230	22 (9.6)	$\chi^2=0.48$ $p>0.05$
Thick	108	13 (12)	
Dandruff problem			
Yes	125	13 (10.4)	$\chi^2=0.0$ $p>0.05$
No	216	22 (10.2)	

**Table 4.** Prevalence of head lice infestation in relation to frequency of bathing, washing hair, and sharing personal items

	Number examined	Positive for head lice (%)	Statistical analysis
Bathing frequency			
Once a week	73	7 (9.6)	$\chi^2=0.62$ $p>0.05$
Twice a week	173	20 (11.6)	
Three times a week	93	8 (8.6)	
Hair washing frequency			
Once a week	70	8 (11.4)	$\chi^2=1.34$ $p>0.05$
Twice a week	143	17 (11.9)	
Three times a week	128	10 (7.8)	
Sharing combs, bed and/or towels			
Yes	154	13 (8.4)	$\chi^2=0.62$ $p>0.05$
No	153	17 (11.1)	

Turkey, several studies of head louse epidemiology were conducted and a wide range of infestation rates (0.7-59%) was observed (9). Some of the important reasons for the different outcomes obtained in these studies were the region's socio-economic position, age group studied, study period (year, month), children's gender, different examination modalities (visual inspection vs. examination with a louse comb) and whether nits were considered as a sign of infestation. In pupils coming from families with higher socio-economic status in Konya, the infesta-

tion rate was 0.6%, while in children from the provinces of this city with lower socio-economic levels, the infestation rates were 2.1-13.2% (10). Prevalence studies conducted in school children from Malatya in 2004 and 2007 demonstrated infestation rates of 1.1% and 5.1%, respectively (4, 11). Üner et al. (12) examined 2,906 children in Izmir and reported an infestation rate of 1.5%. Güleç et al., (13) who examined children from a low socio-economic level in the Ankara region, found an infestation rate of 5.2%. In Kayseri, 9.2% of 1,261 primary school children were positive for head lice, while in Sakarya, a prevalence of 34.1% was reported (3, 14). In epidemiological studies conducted in Sivas in the years 1990, 1993, 2002, 2006 and 2010 infestation rates of 7.3%, 3.6%, 1.1%, 9.5% and 5.9%, respectively, were found (15-19).

In the present study, girls were significantly more infested than boys. Payzin reported an infestation rate of 54% in girls and 17.2% in boys (14). Daldal et al. (11) found lice in 2% of the girls and in none of the boys examined. Artan et al. (3) reported a prevalence of 2.1% in boys and 16.4% in girls. This phenomenon could be explained by the fact that girls have longer hair, which facilitates the transmission of lice from head to head, and they are more sociable, frequently touching other girls' hair. In addition, in long hair, nits remain attached as the hair grows and accordingly, these signs of previous infestations, which had been treated successfully, remain for months, while a short hair-cut in boys, removes the nits.

In this study, no significant differences were found between different hair colour hair structure and hair density. Borges et al. (20) reported that girls with long, dark and wavy hair were more infested, while they found no differences between the different hair colors and structures.

In the present study, children 6-10 years-old were more frequently infested than other age groups. This is in agreement with Özcelik et al. (18) who found that first grade students (6-7 years old) were more infested than other age groups. Kamiabi et al. (21) also reported that 9-year-old children were the most infested age group.

Çiftçi et al. (22) stressed the importance of socio-economic status and parental education related to head louse infestation, emphasizing that children from lower socio-economic levels and those who had parents with lower education were more frequently infested. Heukelbach et al. (23) also reported that children under the age of 15, who lived in rural areas, were more often infested.

## CONCLUSION

Girls were more often infested with head lice than boys were, and children who were previously infested with lice, as well as children from families where there had been previous infestations, had a greater chance of being re-infested.

## Acknowledgement

We would like to thank Dr. Jacqueline Miller and Dr. Avi Keysary for their critical review of the manuscript.

## Conflict of Interest

No conflict of interest was declared by the authors.

## REFERENCES

1. Budak S, Delibaş SB. Pediculosis ve pthiriosis. In: Özcel MA (Ed): Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. 1st ed, 845-847. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir, 2007.
2. Akisu C, Aksoy U, Delibas SB, Ozkoc S, Sahin S. The prevalence of head lice infestation in school children in izmir, Turkey. *Pediatr Dermatol* 2005; 22: 372-3. [\[CrossRef\]](#)
3. Artan MO, Baykan Z, Koc AN. Kayseri ili kırsalındaki sekiz ilköğretim okulunda *Pediculus capitis* prevalansı. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2006; 30: 112-24.
4. Atambay M, Karaman O, Karaman U, Aycan O, Yoloğlu S, Daldal N. [The frequency of intestinal parasites and head lice among students of the Akşemsettin Primary School for Deaf Students]. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2007; 31: 62-5.
5. Dursun N, Cengiz ZT. Van'ın Erciş ilçesinde baş bitinin yayılışı. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2010; 34: 45-9.
6. Mumcuoglu KY, Friger M, Ioffe-Uspensky I, Ben-Ishai F, Miller J. Louse comb versus direct visual examination for the diagnosis of head louse infestations. *Pediatr Dermatol* 2001; 18: 9-12. [\[CrossRef\]](#)
7. Balcioglu C, Burgess IF, Limoncu ME, Sahin MT, Ozbel Y, Bilaç C, et al. Plastic detection comb better than visual screening for diagnosis of head louse infestation. *Epidemiol Infect* 2008; 136: 1425-31. [\[CrossRef\]](#)
8. Mumcuoglu KY, Barker SC, Burgess IE, Combescot-Lang C, Dalgleish RC, Larsen KS, et al. International guidelines for effective control of head louse infestations. *J Drugs Dermatol* 2007; 6: 409-14.
9. Falagas ME, Matthaiou DK, Rafailidis PI, Panos G, Pappas G. Worldwide prevalence of head lice. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1493-4. [\[CrossRef\]](#)
10. Oflaz M. Konya'da sosyo-ekonomik yönden farklı olan iki bölgedeki ilköğretim okullarındaki çocuklarda *Pediculus humanus capitis* yaygınlığı. Selçuk Üniv., Sağlık Bil. Enst. Parazitoloji (Vet) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 2006.
11. Daldal N, Atambay M, Aycan ÖM, Karaman Ü, Ersoy Y. Malatya'da iki ilköğretim okulu çocuklarında *Pediculus capitis* yaygınlığının araştırılması. İnönü Üniv Tıp Fak Derg 2000; 11: 11-3.
12. Üner A, Özensoy S, Tappeh KH, Akar Ş, Gürüz Y, Kundakçı Ü. İzmir Karşıyaka ilçesi ilkokul çocuklarında bağırsak parazitleri ve baş biti araştırılması. *Türkiye Parazitoloj Derg* 1997; 21: 39-43.
13. Güleç M, Kır T, Tekbaş ÖF, Ceylan S, Hasde M. Çiçekli İlköğretim Okulu öğrencilerinde *Pediculus humanus capitis* enfestasyonu prevalansının ve buna etki eden faktörlerin araştırılması. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2000;57: 13-18.
14. Payzın F. Sakarya sığütlü sağık ocağı bölgesindeki ilkokul birinci sınıflarda baş biti prevalansı. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 1995; 15: 57-60.
15. Saygı G, Özçelik S, Temizkan N, Erandaç M. Sivas'ta üç ilkokul öğrencileri arasında *Pediculus humanus capitis* yaygınlığının araştırılması. *Türkiye Parazitoloj Derg* 1990; 14: 75-83.
16. Öztürkcan S, Özçelik S, Saygı G. Sivas çocuk yuvasındaki çocuklar arasında Scabies ve *Pediculus humanus* sıklığının araştırılması. *Türkiye Parazitoloj Derg* 1993; 17: 42-6.
17. Saygı G, Oğuztürk H, Akın Z. İki köy ilköğretim okulu öğrencilerinde *Pediculus türlerinin* araştırılması. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2002; 26: 192-4.
18. Özçelik S, Değerli S, Aslan A. Sivas Alahacı köyü ilköğretim okulu öğrencilerinde *Pediculus yaygınlığının* araştırılması. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2006; 30: 184-6.
19. Değerli S, Malatyali E, Çeliksöz A, Özçelik S, Mumcuoğlu KY. The prevalence of *Pediculus humanus capitis* and the coexistence of intestinal parasites in young children in boarding schools in Sivas, Turkey. *Pediatr Dermatol* 2012; 29: 426-9. [\[CrossRef\]](#)
20. Borges R, Mendes J. Epidemiological aspects of head lice in children attending day care centres, urban and rural schools in Uberlandia, central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 189-92. [\[CrossRef\]](#)
21. Kamiabi F, Hosain FN. Prevalence of pediculosis capitis and determination of risk factors in primary-school children in Kerman. *East Mediterr Health J* 2005; 11: 989-92.
22. Ciftci IH, Karaca S, Dogru O, Cetinkaya Z, Kulac M. Prevalence of pediculosis and scabies in preschool nursery children of Afyon, Turkey. *Korean J Parasitol* 2006; 44: 95-8. [\[CrossRef\]](#)
23. Heukelbach J, Wilcke T, Winter B, Feldmeier H. Epidemiology and morbidity of scabies and pediculosis capitis in resource-poor communities in Brazil. *Br J Dermatol* 2005; 153: 150-6. [\[CrossRef\]](#)



## Kuşadası, Aydın'da Doğadan Yakalanan Kum Sineklerinde (*Phlebotomus tobbi*) Saptanan Entomopatojen Nematod [EPN] ve Biyolojik Kontrol Ajanı Olarak Kullanımının Değerlendirilmesi

Detection of Entomopathogen Nematode [EPN - Sand Flies (*Phlebotomus tobbi*)] Caught in the Wild in Aydın, Kuşadası Town and its Assessment as a Biological Control Agent

Mehmet Karakuş<sup>1</sup>, Suha K. Arserim<sup>1</sup>, Seray Özensoy Töz<sup>2</sup>, Yusuf Özbel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

### ÖZET

**Amaç:** Araştırmada, kum sineklerinin direkt yöntem ile parazit ve diğer organizmaların varlığı yönünden incelenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntemler:** Aydın ili Kuşadası ilçesinde doğadan toplanan kum sineklerinde mide diseksiyonu yapılmış ve mide içerikleri ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Diseksiyon sonrasında baş ve genital yapıların bulunduğu abdomenin son iki segmenti şeffaflaştırılarak kalıcı preparat haline getirilen kum sineği örneklerinin tür tayinleri yapılmıştır.

**Bulgular:** Çalışmada toplam 1027 kum sineği diseke edilmiştir. Kum sineklerinin identifikasyonu ile 8 *Phlebotomus*, 2 *Sergentomyia* cinsine ait örnekler saptanmış, *Phlebotomus tobbi*'nin %61.34 ile dominant tür olduğu belirlenmiştir. Diseksiyon sırasında bir *P. tobbi* örneğinin hemosölünde *Steinernematidae* familyasına ait 3. evre enfektif juvenil entomopatojen nematod tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Araştırma sırasında saptanan bu bulgu, ülkemizde kum sineklerinde bildirilen ilk entomopatojen nematod bulgusudur. Çalışmada, leishmaniasis açısından endemik bir alan olan Kuşadası'nda kum sineği faunası da belirlenmiş ve bunların kontrolünde çevreye zararları tam olarak bilinmeyen insektisitler yerine hedef dışı hiçbir organizmaya zarar vermeyen entomopatojen nematodların kullanılabilmesi kanısına varılmıştır. (*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 36-9)

**Anahtar Sözcükler:** Kum sinekleri, *Phlebotomus tobbi*, Entomopatojen nematod, Kuşadası, Türkiye

**Geliş Tarihi:** 22.01.2013 **Kabul Tarihi:** 25.01.2013

### ABSTRACT

**Objective:** In this study, the midgut of the sand flies investigated with direct method for the presence of parasites and other organisms.

**Methods:** Wild sand flies collected in Kuşadası Town-Aydın, were dissected and midgut contents were examined by light microscopy. After midgut dissection, the head and genitalia of sand fly specimens were clarified and mounted for species identification.

**Result:** During the study, a total of 1027 sand flies were dissected. Eight and two species belonging to *Phlebotomus* and *Sergentomyia* genera were determined, respectively. *Phlebotomus tobbi* was found to be most abundant species (61.34%). A third stage of infective Entomopathogen Nematode belonging to Steinernematidae family was observed in the hemocoel of one specimen of *P. tobbi* during the dissection process.

**Conclusion:** This is the first finding related to entomopathogen nematodes found in sand flies in Turkey. In the study, the sand fly fauna was determined in Kuşadası Town. For the control of sand flies, entomopathogenic nematodes which are not harmful for non-target organisms, can be used instead of chemical insecticides that can cause unknown damage in the environment. (*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 36-9)

**Key Words:** Sand fly, *Phlebotomus tobbi*, Entomopathogen Nematode, Kuşadası, Turkey

**Received:** 22.01.2013 **Accepted:** 25.01.2013

## GİRİŞ

Phlebotomine kum sinekleri (Diptera: Psychodidae), leishmaniasise neden olan *Leishmania* cinsi protozoon parazitler, tatarlık hummasına neden olan Filovirüs cinsinden çeşitli virüsler ve bartonellosise neden olan *Bartonella bacilliformis* gibi mikroorganizmalara biyolojik vektörlük yapmalarından dolayı halk sağlığı açısından önemli bir yere sahiptirler (1).

Halk sağlığı açısından zararlı olan artropodlar ile savaşımında kimyasal yöntemlerin yanı sıra çeşitli biyolojik ajanlar da kullanılmaktadır. Bu ajanlar, konağını öldürebilen virüsler, bazı protozoonlar, akarlar, bakteriler, mantarlar ve nematodlar olabilmektedir (2). Çok sayıda nematod türü doğada çeşitli artropodlarla ilişki içindedir. Bu ilişki forezisten parazitizme kadar değişik şekillerde olabilmektedir. Entomopatojen nematodlar hayvanlar aleminin Nematoda şubesinin Rhabditida takımının *Steinernematidae* ve *Heterorhabditidae* familyalarına bağlı 0.2-10 mm uzunluğunda, 20-100 mikron genişliğinde iplik şeklinde, şeffaf, Türkçe'de "iplik solucanları" adı verilen canlı grubundandır (3). Artropodlarla ilişki içerisinde bulunan 3.000'in üzerinde entomofilik (böcekçil) nematod türü olduğu bilinmektedir (4, 5).

Artropod-nematod ilişkisi bakımından en büyük çeşitlilik *Secernentea* sınıfında, *Rhabditida*, *Tylenchida*, *Aphelenchida*, *Oxyurida*, *Spirurida*, *Strongylida*, *Rhigonematida* ve *Ascarida* takımlarında görülmektedir (6). Bu entomopatojen nematodların aynı zamanda mutualistik ilişki içinde oldukları bakterilerin aktivitelerini arttırmak suretiyle de böcek konaklarını 48 saat içerisinde öldürme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu özellikleri de entomopatojen nematodları biyolojik kontrolde kullanılabilecek uygun bir ajan haline getirmektedir (7, 8).

Bu çalışma, leishmaniasis için endemik bir bölge olan Aydın, Kuşadası'nda vektör kum sineklerinde direkt yöntem ile parazit ve diğer organizmaların varlığı yönünden incelenmesi sırasında hemosölde gözlenen entomopatojen nematod üzerine hazırlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda, Kuşadası'nda çeşitli lokalitelerden CDC ışıklı tuzaklar yardımıyla canlı kum sinekleri toplanmıştır. Kum sinekleri sabah erken saatlerde tuzaklardan alınarak toplandıkları lokalitelere göre ayrı kaplara konulmuş, dişi kum sinekleri stereo mikroskop altında mide diseksiyonu için ayrılmıştır. Toplanan erkek kum sinekleri ise doğrudan diseke edilerek preparat haline getirilmiştir.

**Mide Diseksiyonu:** Canlı kum sinekleri buz üzerinde bayıldıktan sonra steril %0.9'luk NaCl, antibiyotik (%1.5'lik Penisilin potasyum ve Streptomisin sülfat) ve antimikotik (%1.5'lik Flukonazol) içeren solüsyon içerisine alınmıştır. Herhangi bir kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak için diseksiyon iğneleri her bir örnek sonrasında ateş yardımıyla dezenfekte edilmiştir. Kum sineklerinin baş ve genital bölgeleri tür identifikasyonu amacıyla preparat yapmak için ayrılmış, mide ve malpighi tüplerini içeren kısım ise ayrı bir steril damla içine alınarak lamel ile kapatılmış ve olası organizmalar açısından ışık mikroskopunda (x400) kontrol edilmiştir.

Preparat haline getirilen erkek ve dişi kum sineklerinin tür tayinleri, Akdeniz havzası için geçerli olan tür tayin anahtarlarına göre teşhis edilmiştir (9-11).

## BULGULAR

Çalışmada toplam 1027 adet dişi kum sineği diseke edilmiş ve tür identifikasyonları yapılmıştır. Buna göre *Phlebotomus* cinsine dahil 8 tür; *P. tobbi* %61, *P. papatasi* %11, *P. neglectus/syriacus* %7, *P. alexandri* %5, *P. brevis* %1, *P. similis* %1, *P. mascitti* %1 ve *P. simici* %1, ve *Sergentomyia* cinsine dahil 2 tür; *S. dentata* %10 ve *S. minuta* %1, tespit edilmiştir (Tablo 1).

*P. tobbi* olduğu saptanan dişi bir kum sineği hemosölünde canlı halde 1 adet ergin entomopatojen nematod gözlenmiştir. Bunun dışında diseke edilen kum sineklerinin hiçbirinin hemosölünde başka bir nematoda veya yumurtaya rastlanmamıştır. Entomopatojen nematodun kuruması beklenmeden kalıcı preparat haline getirilmiştir. Fakat saha koşullarında çeşitli boyama ve fikse işlemleri yapılamadığı için tür düzeyinde bir identifikasyon gerçekleştirilememiştir. Yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda entomopatojen nematodun, 3. evre enfektif *Steinernematidae* ailesine ait juvenil bir nematod olduğu belirlenmiştir. Uzunluk ölçümleri sonucunda entomopatojen nematodun boyunun ortalama 0.7 mm olduğu saptanmıştır (Şekil 1).

## TARTIŞMA

Çalışma alanı olarak belirlenen Kuşadası, zoonotik bir hastalık olan leishmaniasisin insandaki her iki klinik formunun (visseral ve kutanöz) görüldüğü ve köpeklerin rezervuar olarak saptandığı önemli bir endemik alandır (12, 13). Daha önce Kuşadası'nda köpeklerde yapılan çalışmalarda, 253 köpek taranmış ve %16.6 oranında seropozitiflik saptanmıştır (12). Araştırmamız sırasında nematodun tesbit edildiği *Phlebotomus tobbi*, *Leishmania infantum*'un kanıtlanmış vektörüdür (14). Çalışma alanında vektör *P. tobbi*'nin %61 gibi bir dominantlığa sahip olması ve köpeklerde seroprevalansın yüksek olması leishmaniasis açısından riskin boyutlarını ortaya koymaktadır.

Günümüzde kum sinekleri ve diğer tarım zararlıları ile savaşımında kullanılan insektisitlerin çevreye olan olumsuz etkilerinin her geçen gün daha açık bir şekilde ortaya çıkması ve kullanılan insektisitlere karşı vektör artropodların direnç geliştirmesi alternatif mücadele yöntemlerinin araştırılmasını zorunlu hale getirmiştir (3). Ülkemizde yakın zamanda çeşitli bölgelerden toprak örnekleri alınarak doğal entomopatojenler incelenmiştir. Bu

**Tablo 1.** Diseksiyon yapılan kum sineklerinin türleri ve yüzde dağılımları

Kum Sineği Türleri	Sayısı	%
<i>P. tobbi</i>	630	61.34
<i>P. papatasi</i>	119	11.59
<i>P. neglectus/syriacus</i>	78	7.59
<i>P. alexandri</i>	52	5.06
<i>P. brevis</i>	10	0.97
<i>P. similis</i>	15	1.46
<i>P. simici</i>	3	0.29
<i>P. mascitti</i>	1	0.10
<i>S. dentata</i>	111	10.81
<i>S. minuta</i>	8	0.78



**Şekil 1.** Kum sineği hemosölünde gözlenen entomopatojen nematod

çalışmalardan en kapsamlısı Hazır ve ark. (8) tarafından yapılmış ve 1080 toprak örneğinden 22 adet pozitif sonuç tespit edilmiştir. Bu çalışmalar sırasında yeni bir *Steinernema* türü tespit edilmiştir. Aydın'da yapılan bir çalışmada da topraktan alınan örnekler incelenmiş ve 28S rRNA, D2D3 ve ITS (internal transcribed spacer) bölgelerinin dizi analizleri ile morfolojik ve morfometrik incelemelerden elde edilen verilere dayanarak Aydın'da *Steinernema* varlığı gösterilmiştir (15). Çalışmada tespit edilen entomopatojen nematodun saha koşullarında uygun preparat teknikleri uygulanmadığı için tür düzeyinde identifikasyonu yapılamamıştır. Yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda *Steinernematidae* familyasına ait olduğu ortaya konmuştur. Araştırma sırasında saptanan bu bulgu, ülkemizde kum sineklerinde bildirilen ilk entomopatojen nematod bulgusudur.

Kum sinekleri ile yapılan bazı çalışmalarda entomopatojen nematodların sadece dişilerde değil aynı zamanda bitki özuları ile beslenen erkek sineklerde de bulunduğu gösterilmiştir (16). Entomopatojen nematodların laboratuvar kolonilerini de tehdit edebildiği, kum sineklerinin larva evresi de dahil olmak üzere her evresinde gözlenebildiği ve bu nedenle bulaşması durumunda deneysel çalışmalarda kullanılan laboratuvar kolonilerinin tamamını çok kısa bir sürede yok edebildiği bildirilmiştir (2). Entomopatojen nematodlar yaşamlarını sürdürebilmek için nemli topraklara ihtiyaç duymaktadırlar. Kum sineği larvalarının da nemli topraklarda bulunmasından, yani aynı ekolojik ortamı paylaşmalarından dolayı, kum sineği larvaları ile savaşımında entomopatojen nematodların etkili olabileceği düşünülmektedir (2).

Entomopatojen nematodların sadece fiziksel olarak değil aynı zamanda mutualistik yaptığı bakteri türleriyle de konağını öldürdüğü çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (7, 8). İnsektisit ve pestisitlerin kullanılmasının yasak olduğu veya gelişen direncin belirlendiği bölgelerde alternatif bir kontrol yöntemi olarak kullanılabilir.

mesi açısından oldukça yararlı organizmalar olduğu, hedef dışı organizmalara hiçbir zararı olmadığı ve uygun toprak şartlarında 6 ay kadar etkinliklerini korudukları belirtilmiştir (17).

## SONUÇ

Entomopatojen nematodun leishmaniasis için vektör olan *Phlebotomus tobbi*'de bulunması, nematodun bu türü de enfekte edebileceğini ve bu vektör türle mücadelede kullanılabileceğini göstermektedir. Yine ülkemizde de varlığı saptanmış olan *P. alexandri*, *P. papatasi* ve *P. sergenti* türlerini hedef olarak yapılan bir çalışmada nematod ile enfekte edilen dişi kum sineklerinin kan ememediği, erkek kum sineklerinin de çiftleşme davranışı sergileyemediği gözlenmiştir (18). Bunun yanı sıra, entomopatojen nematodların farklı artropodlarla mücadele etkinliklerinin aynı olmadığı, mücadele edilecek türe göre kullanılacak entomopatojen nematodun değişebileceği belirtilmiştir (19). Bu durum da endemik alanlarda vektör olduğu saptanan kum sineği türleri ile ilgili nematod türlerinin etkileşimi konusunda araştırma yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu çalışma ile *Steinernematidae* türlerinin *P. tobbi*'yi enfekte edebildiği ve biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. Ancak bu alanda sadece ülkemizde değil, leishmaniasisin endemik olduğu birçok ülkede daha kapsamlı araştırmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir. Kum sineklerinin uçmak yerine daha çok zıplama hareketi ile yer değiştirmeleri ve yere yakın hareket etmeleri, larva pupa dönemlerinin toprakta olması entomopatojen nematodlarla temas etme olasılığını artırmaktadır.

## Çıkar Çatışması

Bu çalışma, TÜBİTAK 109S448 nolu projenin desteği ile gerçekleştirilmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Daldal N, Özbel Y. Phlebotomus spp. Vektörlükleri ve kontrolü. Arthropod Hastalıkları ve Vektörler, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, 1997; 13: 49-109.
2. Secundino NF, Araújo MS, Oliveira GH, Massara CL, Carvalho OS, Lanfredi RM, et al. Preliminary description of a new entomoparasitic nematode infecting *Lutzomyia longipalpis* sand fly, the vector of visceral leishmaniasis in the New World. J Invertebr Pathol 2002; 80: 35-40. [CrossRef]
3. Armağan B, Ulu TC, İkizler T. Bursa İli Nilüfer İlçesi Görükle Mevkii Topraklarında Entomopatojen Nematod Sürveyi U.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi 2010; 24: 91-8.
4. Koppenhöfer, AM, Lacey, LA, Kaya, HK. Field manual of techniques in invertebrate pathology. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer; 2000.pp.283-301.
5. Giblin-Davis RM, Davies KA, Morris K, Thomas WK. Evolution of Parasitism in Insect-transmitted Plant Nematodes. J Nematol 2003; 35: 133-41.
6. Giblin-Davis RM, Davies K.A, Taylor GS, Thomas, WK. Entomophilic Nematode Models for Studying Biodiversity and Cospeciation. Nematology, Advances and Perspectives. Chen, Z.X., Chen S.Y. and Dickson, D.W., Tsinghua University Press/CABI Publishing. New York., USA. 2003; 492-538.
7. Burnell AM, Stock SP. Heterorhabdits, Steinernema and their bacterial symbionts- lethal pathogens of insects. Nematology 2000; 2: 31-42. [CrossRef]
8. Hazır S. Türkiye'deki Entomopatojenik Nematodlar (*Steinernematidae* ve *Heterorhabditidae*) Üzerine Faunistik Çalışmalar. Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara. 2002.

9. Artemiev MM, Neronov VM, Distribution and Ecology of Sandflies of the Old World (Genus *Phlebotomus*), Institute of Evolution, Morphology and Animal Ecology, USSR, Moscow, 1984.p.208.
10. Perfil'ev PP. Phlebotomidae (sandflies), In Fauna of USSR. Second edition; 1968.
11. Killick-Kendrick R, Tang Y, Killick-Kendrick M. The identification of female sandflies of the subgenus *Larrousius* by the morphology of the spermathecal ducts. *Parassitologia*. 1991; 33.
12. Özensoy Töz S, Ertabaklar H, Paşa S, Balcıoğlu IC, Özbek Y. Canine Leishmaniasis In Turkey. Third World Congress on Leishmaniasis. April. Palermo-Terrasini, Sicily, Italy. 2005.p.10-5.
13. Özensoy Töz S, Özbek Y, Ertabaklar H, Yıldızlı N, Korkmaz M, Alkan MZ. Comparisons of clinical findings and serological data in the diagnosis of canine leishmaniasis. *Türk J Vet Anim Sci* 2005; 29: 269-73.
14. Svobodova M, Alten B, Zidkova L, Dvořak V, Hlavackova J, Myškova J, et al. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. *Int J Parasitol* 2009; 39: 251-6. [\[CrossRef\]](#)
15. Aydın MS. Entomopatolojenik Nematodların (*Steinernematidae* ve *Heterorhabditidae*) Aydın İli ve Çevresindeki Topraklarda Tür Çeşitliliği ve Dağılımlarının Belirlenmesi. Doktora Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.
16. Kakarsulemankhel JK. Preliminary observations on nematode parasites of phlebotomine sandflies in Pakistan. Communication II. *J Invertebr Pathol* 2003; 84: 63-5. [\[CrossRef\]](#)
17. Entomopatolojen (Böcek Paraziti) Nematodlar ve Tarımsal Mücadele Kullanımları URL: [http://ziraat.uludag.edu.tr/ureticiler/ENTOMOPATOJEN\\_NEMATODLAR.pdf](http://ziraat.uludag.edu.tr/ureticiler/ENTOMOPATOJEN_NEMATODLAR.pdf)
18. Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Qala NA, Ashford RW, Tang Y. Preliminary observations on a tetradonematid nematode of Phlebotomine sandflies of Afghanistan. *Annals Parasit. hum. comp.* 1989; 64: 332-9.
19. Crow WT. Using Nematodes to Control Insects: Overview and Frequently Asked Questions. University of Florida. Extension on Institute of food and Agricultural Sciences, 2002; URL: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN46800.pdf>



## *Myxobolus leafa* sp. nov. (Myxozoa: Bivalbulida) from the gill filament of *Labeo bata* (Hamilton) from Manipur, India

Hindistan (Manipur)'daki *Labeo bata* Balığının Solungaç Filamentinden Yeni Bir Tür *Myxobolus leafa* sp. nov. (Myxozoa: Bivalbulida)

Hemananda Thounaojam<sup>1</sup>, Naorem Mohilal<sup>1</sup>, Probir K. Bandyopadhyay<sup>2</sup>, Amlan Kumar Mitra<sup>3</sup>, Gözde Gürelli<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Manipur University, Parasitology Laboratory, Life Sciences Department, Canchipur, India

<sup>2</sup>University of Kalyani, Parasitology Laboratory, Department of Zoology, Kalyani, West Bengal, India

<sup>3</sup>Ranaghat College, P.O. Ranaghat, Department of Zoology, District- Nadia, Pin, West Bengal, India

<sup>4</sup>Department of Biology, Faculty of Science and Art, Kastamonu University, Kastamonu, Turkey

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to investigate the gill filaments of *Labeo bata* in India parasitologically and to describe the new Myxozoa parasite species, *Myxobolus leafa* sp. nov., which was determined.

**Methods:** Fish were collected alive from fish farms from Manipur (India). Sporogonic plasmodia were removed with sterile forceps and observed under phase contrast microscope. For permanent preparations, air dried smears were stained with Giemsa after fixation in acetone free absolute methanol.

**Results:** Mature spores of the new species appear as leaf-like structures in valvular or frontal view, tapering at both ends. The anterior end of the spore is broader than the posterior end. Spores measure 15.3-11.8  $\mu\text{m}$  ( $16.91 \pm 1.16$ ) in length and 13.6-15.3  $\mu\text{m}$  ( $14.15 \pm 0.67$ ) in breadth.

**Conclusion:** The new gill parasite species, *Myxobolus leafa* sp. nov., was described from fish in India. The prevalence of the parasite was 3.3% and two stages (cyst and spore) of the parasite existed in its life cycle. (*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 40-3)

**Key Words:** Myxozoa, parasite, fish, *Myxobolus leafa* sp. nov., India

**Received:** 01.10.2012

**Accepted:** 07.12.2012

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı Hindistan'daki *Labeo bata* balık türünün solungaç filamentlerini parazitolojik açıdan araştırmak ve tespit edilen yeni Myzoa parazit türünü *Myxobolus leafa* sp. nov. tanımlamaktır.

**Yöntemler:** Balıklar Manipur'daki (Hindistan) balık çiftliklerinden canlı olarak elde edilmiştir. Sporogonik plazmodyumlar steril penslerle çıkarılarak faz kontrast mikroskop altında incelenmiştir. Daimi preparasyonlar için, havayla kurumuş yayma preparatlar saf metanolden arındırılmış etanolde tespit edildikten sonra Giemsa'yla boyanmıştır.

**Bulgular:** Tespit edilen yeni parazit türünün olgun sporları önden bakıldığında yaprak benzeridir ve her iki uca doğru daralır. Sporların ön ucu arka uçtan daha geniştir. Sporların uzunluğu 15.3-11.8  $\mu\text{m}$  ( $16.91 \pm 1.16$ ), genişliği 13.6-15.3  $\mu\text{m}$  ( $14.15 \pm 0.67$ )'dir.

**Sonuç:** Hindistan'daki balıklardan yeni bir solungaç paraziti *Myxobolus leafae* sp. nov. tanımlanmıştır. Parazitin yaygınlığı %3.3'tür ve yaşam döngüsünde 2 safha (kist ve spor) mevcuttur. (*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 40-3)

**Anahtar Sözcükler:** Myxozoa, parazit, balık, *Myxobolus leafa* sp. nov., Hindistan

**Geliş Tarihi:** 01.10.2012

**Kabul Tarihi:** 07.12.2012



## INTRODUCTION

Numerous descriptions of myxosporean species of fish have been made from different geographic areas (1, 2). Myxozoa Bütschli, 1882 include more than 1200 valid species commonly found in fish (2, 3). Among them, *Myxobolus* Bütschli, 1882, with 744 species described, is the largest genus of the family Myxobolidae and has been reported as an important pathogen in freshwater fish (3).

Manipur, located in the Himalayan range, has a rich fish faunal diversity. However, the survival of many indigenous fish species has been hampered with the introduction of many new exotic fish species. This has also given rise to an increase in parasites including myxozoans. Many of these myxosporidians have pathogenic effects on the fish, causing serious damage to various body parts and resulting in heavy economic loss to the fish farmers and also threatening the biodiversity of indigenous fish species.

During a parasitological survey, examinations were conducted on various host fish species, which revealed the presence of a new myxozoan species of the genus *Myxobolus* from the gill filaments of *Labeo bata* (Hamilton) collected from a fish farm of Langmeidong, Manipur, India.

## METHODS

Host fish of the genus *Labeo bata* (Hamilton) were collected alive from fish farms of Langmeidong, brought to the laboratory and examined immediately. Sporogonic plasmodia, when found, were carefully removed with sterile forceps, smeared on clean grease free slides with drops of 0.5% NaCl solution, covered with cover slips and sealed with bee wax for examination under the oil immersion lens of the Olympus CH2 phase contrast microscope. Some of the fresh smears were treated with various concentrations (2-10%) of KOH solution for the extrusion of polar filaments. The Indian ink method of was employed for observing the mucous envelope of spores (4). For permanent preparations, air dried smears were stained with Giemsa after fixation in acetone free absolute methanol (5). Measurements (based on twenty fresh spores treated with Lugol's iodine) were done with the aid of a calibrated ocular micrometer. All measurements are presented in  $\mu\text{m}$  as mean $\pm$ SD followed in parentheses by the range.

Drawings were made on fresh or stained material with the aid of a mirror type camera lucida and the Corel Draw 10.0 computer programme.

To describe the morphology of the parasite, several abbreviations have been used, as follows.

## RESULTS

### *Myxobolus leafa* sp. nov. (Figures 1a-j, Tables 1, 2)

Phylum: Myxozoa

Class: Myxosporea

Order: Bivalvulida

Family: Myxobolidae

Genus: Myxobolus

Species: *leafa*

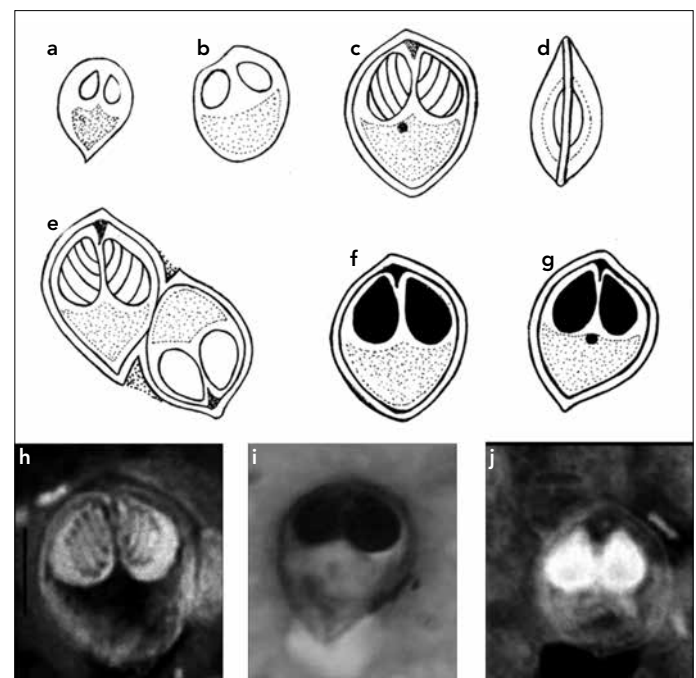
## Diagnosis

**Cyst:** Numerous yellowish white, spherical cysts or plasmodia are found attached to the gill filaments of the host, measuring 1.4-1.6 mm in diameter. Cysts contain mostly mature spores. A few developmental stages are also observed.

**Spore:** Mature spores appear as leaf-like structures in the valvular or frontal view, tapering at both ends. The anterior end of the spore is broader than the posterior end. The spore measures 15.3-11.8  $\mu\text{m}$  (16.91 $\pm$ 1.168) in length and 13.6-15.3  $\mu\text{m}$

**Table 1.** Measurements of 20 fresh/stained spores of *Myxobolus leafa* sp. nov.

Characters	Range	Mean	SD	SE	CV (%)
LS	15.3-18.7	16.91	1.168	0.261	6.907
BS	13.6-15.3	14.152	0.673	0.150	4.755
LPC	5.95-8.5	6.67	0.724	0.162	10.854
BPC	5.1-5.95	5.31	0.368	0.082	6.23
<b>Spore Index</b>					
LS:	BS=1:	0.836			
LPC:	BPC=1:	0.796			
LS:	LPC=1:	0.394			
BS:	BPC=1:	0.375			
LS: length of the spore, BS: breadth of the spore, LPC: length of the polar capsule, BPC: breadth of the polar capsule, LPF: length of the polar filament, DIV: diameter of iodophilous vacuole					



**Figure 1.** (a-g) Camera lucida drawings of different stages of matured spores of *Myxobolus leafa* sp. nov. (h-j) Photomicrographs of matured fixed spores in valvular view (Giemsa stained) of *Myxobolus leafa* sp. nov. scale bar - 6.67  $\mu\text{m}$ . (a, b) Fresh spore-developmental stages. (c) Fresh spore in valvular view. (d) Fresh spores in sutural view. (e) Fresh spore in valvular view-Lugol's iodine. (f, g) Fixed spores in valvular view-Giemsa stained

**Table 2.** Morphometric comparison of *Myxobolus leafa* sp. nov. to closely related species

Characters	<i>M. drijagini</i>	<i>M. iucundus</i>	<i>M. hendricksoni</i>	<i>M. magnaspherus</i>	<i>M. mokhayeri</i>	<i>Myxobolus leafa</i> sp. nov.
LP	12.5	13	13.1	18	14.4-16.6 (15.8)	15.3-18.7, (16.19±1.13)
BS	9.5	10.7	12.3	20	11.6-13.3 (12.5)	13.6-15.3 (14.15±0.67)
LPC	Unequal L: 6, S: 3.35	8	-	10	Unequal L: 7.7- 7.9 (7.5), S: 5.8 -7.5 (6.6)	5.95-8.5, (6.67±0.72)
BPC	Unequal, L: 3.8, S: 2.35	3.6	-	6	L: 4.1-4.9 (4.6), S: 3.3-4.1 (3.6)	5.1-5.95 (5.31±0.36)
Host	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	<i>Galaxia maculata</i>	<i>Pimephales promelas</i>	<i>Lepomis gibbosus</i>	<i>Capoeta trutta</i>	<i>Labeo bata</i>
Site of infection	Subcutaneous tissue	Skin	Brain	Kidney	Fin	Gill
Reference	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	Present study
LPC: length of the polar capsule, BPC: breadth of the polar capsule, BS: breadth of the spore						

(14.15±0.67) in breadth. On sutural view the spore is pyriform in shape with a distinct, slightly curved sutural line without a ridge or fold. Two shell valves are symmetrical, smooth, thin and uniform with no parietal fold. The posterior part of the spore is surrounded by a mucus envelope.

Two equal polar capsules are oval to pyriform in shape with a broadly pointed anterior end and rounded posterior end. Each polar capsule measures 5.95-8.5 µm (6.6±0.72) in length and 5.1-5.95 µm (5.31±0.36) in breadth. Inside the polar capsule, polar filaments coil obliquely forming 4-5 turns. Polar capsules converge slightly at the anterior part. An intercapsular ridge is present as an outgrowth of the inner wall of the spore at the anterior half of the spore cavity. The extracapsular region is occupied by a double crescent shaped sporoplasm. An oödinophilous vacuole is absent but a tiny sporoplasmic nucleus is present at the upper part of the sporoplasm.

In many cases, the mucus envelope is very prominent while in some spores, the mucus envelope remains in restricted areas at the posterior most part of the spore. In some other cases, the posterior end is prominently pointed-like the tip of a leaf, while in some spores it is bluntly pointed. In most cases the anterior portion is wider than the posterior portion.

#### Taxonomic Summary:

Type Host: *Labeo bata* (Hamilton)

Type Locality: Langmeidong, Thoubal Dist.[24° 27'30.47" N; 93°55'15" E]

Site of Infection: Gill

Prevalence: 7/210 (3.3%)

Type material: Slides containing holotype (MU/P/My) and paratype (MU/P/My<sub>a-d</sub>) has been deposited in the collection of Parasitology Section, Life Sciences Department, Manipur University, Canchipur, Imphal, India.)

Number of specimen measured: 30

Etymology: This species was named as per structural resemblance of the parasite to a leaf.

#### DISCUSSION

Due to the presence of two equal pyriform to oval polar capsules with intercapsular appendage, the present myxozoan species is placed under the genus *Myxobolus* Bütschli, 1882 and group I of Tripathi's grouping of the genus *Myxobolus* (3). When the present species is compared with other closely related species of the genus *Myxobolus*, it resembles *M. drijagini* Akmerov, 1954 (6) reported from the subcutaneous tissue of *Hypophthalmichthys molitrix* from Amur River, Russia [LP-12.5, BS-9.5, LLPC-6, LSPC-3.35, BLPC-3.8, BSPC-2.35]; *M. iucundus* Hine, 1977 (7) reported from the skin of *Galaxias maculata* from New Zealand [LP-13, BS-10.7, LPC-8, BPC-3.6]; *M. hendricksoni* Mitchell et al. (8), reported from the brain of *Pimephales promelas* from USA [LP-13.1, BS-12.3]; *M. magnaspherus* Cone et al. (9), reported from the kidney of *Lepomis gibbosus* [LP-18, BS-20, LPC-10, BPC-6] and *M. mokhayeri* Baska et al. (10), reported from the fin of *Capoeta trutta* [LS-15.8, BS-12.5, LLPC-7.5, BLPC-4.6, LSPC-6.6, BSPC-3.6]. However, *M. drijagini* have a smaller spore size, unequal polar capsule and anteriorly more expanded spore than the present species. *M. iucundus* have a smaller spore size, and longer and narrower capsule than the present species. *M. hendricksoni* also have a smaller spore size than the present species. Moreover, its ovoid or spheroid spore differs from the leaf-like spore of the present species. *M. magnaspherus* have larger and broader spores than the present species. *M. mokhayeri* have an unequal sized polar capsule whereas the present species have equal sized polar capsules.

#### CONCLUSION

Considering all these differences, we propose the *Myxobolus* species we have obtained from Manipur as new to science and name it as *Myxobolus leafa* sp. nov.

#### Conflict of Interest

No conflict of interest was declared by the authors.

## REFERENCES

1. Landsberg JH, Lom J. Taxonomy of the genera *Myxobolus*/*Myxosoma* group (Myxobolidae: Myxospodea): current listing of species and revision of synonyms. *Syst Parasitol* 1991; 18: 165-86. [\[CrossRef\]](#)
2. Lom J, Dyková I. Protozoan parasites of fishes. Development of Aquaculture and Fisheries Science, Elsevier, Amsterdam; 1992.
3. Bütschli O. Myxosporidia. In Bronn's Klass Ordn., des Tierreiches. *Protozoa* 1882; 1: 590-603.
4. Lom J, Vavrů J. Mucous envelope of spores of the subphylum. Cnidospora (Deflein, 1901). *Vist Esl Spol Zool* 1963; 27: 4-6.
5. Hemananda T, Mohilal N, Bandyopadhyay PK, Mitra AK. *Thelohanellus imphalensis* sp. nov. (Myxozoa) infecting gills of a major carp *Labeo rohita* Hamilton 1822 from Thoubal, Manipur, India. *Protistol* 2010/11; 6: 280-3.
6. Akhmerov A Kh. K voprosu o "sarannom" kizhuche na kamchatke o porazhenii ryb miksosporidiei I merakh profilaktiki [Problem of "saran" in silver salmon of Kamchatka (fish disease caused by Myxosporidia and prophylaxis)]. *Izv Tikhook Nauchuo-Issled Inst Rybn Khoz I Okeanogr* 1954; 41: 347-8.
7. Hine PM. *Myxobolus incundus* n. sp. (Sporozoa: Myxosporidae) parasitic in *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842) in New Zealand. *J R Soc N Z* 1977; 1: 157-61. [\[CrossRef\]](#)
8. Mitchell LG, Seymour CL, Gamble JM. Light and electron microscopy of *Myxobolus hendricksoni* sp. nov. (Myxozoa: Myxobolidae) infecting the brain of the fathead minnow, *Pimephales promelas* Rafinesque. *J Fish Dis* 1985; 8: 75-89.
9. Cone DK, Anderson RC. Myxosporidian parasites of pumpkinseed (*Lepomis gibbosus* L.) from Ontario. *J Parasitol* 1977; 63: 657-66. [\[CrossRef\]](#)
10. Baska F, Masoumian M. *Myxocolus molnari* sp. n. and *M. mokhayeri* sp. n. (Myxosporea, Myxozoa) infecting a Mesopotamian fish, *Capoeta trutta* Heckel, 1843. *Acta Protozool* 1996; 35: 151-6.



# *Toxoplasma gondii* Takizoit ve Doku Kistlerinin Kriyoprezervasyonu

## Cryopreservation of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites and Tissue Cysts

Mert Döşkaya<sup>1</sup>, Ayşe Caner<sup>1</sup>, Hüseyin Can<sup>2</sup>, Sultan Gülce İz<sup>3</sup>, Aysu Değirmenci<sup>1</sup>, A. Yüksel Gürüz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir, Türkiye

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir, Türkiye

<sup>3</sup>Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Bornova, İzmir, Türkiye

### ÖZET

*Toxoplasma gondii* takizoit ve doku kistleri çalışmaları aşı, tanı testleri ve ilaç araştırmaları, biyokimyasal ve moleküler yapı çalışmaları gibi birçok bilimsel çalışmada kullanılmaktadır. Doku kisti ve takizoitlerin sürekli *in vivo* pasajlanması zahmetli bir işlem olduğu kadar diğer yandan sürekli hayvan kullanılmasından kaynaklanan yüksek maliyetli ve etik sorunlar çıkaran bir işlemdir. Takizoitlerin ve doku kistlerinin kriyoprezervasyonunun gerektiğinde *in vivo* canlandırılması ekonomik kayıpları, iş gücü ve hayvan etik sorunlarını azaltılabilecektir. Bu makalede takizoit ve doku kistlerinin farelerde, intraperitoneal üretimi, kriyoprezervasyon için hazırlanması ve kriyolanmış örneklerin çözülürülerek farelere tekrar uygulanması detaylı olarak tarif edilmiştir. (*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 44-6)

**Anahtar Sözcükler:** Kriyoprezervasyon, doku kisti, takizoit

**Geliş Tarihi:** 16.11.2012

**Kabul Tarihi:** 03.12.2012

### ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* tachyzoites and tissue cysts are largely used for developing diagnostic assays, vaccines and in drug research as well as biochemical and molecular structure studies. Continuous passaging of tachyzoites or tissue cysts in animal models encounter ethical and economical problems and it is a time consuming procedure. Cryopreservation of tachyzoites and tissue cysts and revitalization of cryopreserved samples whenever needed, can decrease the economical loss, ethical problems and labour. In the present article, production of tachyzoites and tissue cysts in mice, preparation of samples for cryopreservation, cryopreservation of tachyzoites and tissue cysts, defrosting of cryopreserved samples and reinoculation to mice have been described in detail. (*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 44-6)

**Key Words:** Cryopreservation, tissue cyst, tachyzoite

**Received:** 16.11.2012

**Accepted:** 03.12.2012

### GİRİŞ

*Toxoplasma gondii*, bir protozoon parazit olup, kuşlar dahil tüm memelileri enfekte edebilmektedir. Tıbbi önemi yüksek olan parazitin dünyadaki insanların yaklaşık üçte birini enfekte ettiği tahmin edilmektedir (1-3). İnsanlarda genelde asemptomatik seyretmekle beraber, düşük, ölü doğum, konjenital toxoplasmosis, görme bozuklukları, ensefalit, organ reddi ve hatta ölüme dahi yol açabilen klinik tablolar yaratabilmektedir (4-8). Bu parazitin morfolojik özelliklerinin

ve evriminin en ince detaylarının açıklığa kavuşması toxoplasmosis tanısı, tedavisi ve aşı çalışmaları açısından büyük önem taşımaktadır.

*T. gondii*'nin kompleks hayat döngüsün de üç form; takizoitler, bradizoitler (doku kisti içinde) ve sporozoitler (ookist içinde) tanımlanmıştır. *T. gondii*'nin evriminde takizoitler hızlı bölünen form olup tüm insan hücrelerini işgal edebilmektedir ve akut enfeksiyondan sorumludurlar (8, 9). Ortalama 14 gün içinde, işgal ettikleri hücrede bölünme hızları yavaşlaya-

**Yazışma Adresi / Address for Correspondence:** Dr. Aysu Değirmenci, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir, Türkiye Tel: +90 232 390 47 34 E-posta: aysu.degirmenci@ege.edu.tr

doi:10.5152/tpd.2013.11

rak bradizoitlere dönüştür ve kronik enfeksiyondan sorumlu doku kistlerini oluştururlar. Parazitin bu aseksüel döngüsü dışında, sadece kesin konak olan kedide gerçekleşen bir de seksüel döngüsü vardır. Bu döngüde kediler *T. gondii*'yi ookist veya doku kisti olarak alırlar. Kedinin bağırsak epitel hücrelerinde farklılaşarak oluşan mikrogametosit ve makrogametositler, gametogoni ile mikrogamet ve makrogametlere dönüşmektedir. İki uzun flagellalı mikrogametlerin, makrogametleri dölemesi ile oluşan zigotun etrafında duvar oluşur ve bu forma ookist denir. Enfekte epitel hücrelerini patlatarak çıkan ookistler bağırsak yolu ile dış ortama atılmaktadırlar (5, 6, 8, 9). Dış ortama atılan ookist içinde, çevre ısısı ve oksijen miktarına bağlı olarak 1-21 gün içinde sporogoni ile öncelikle iki adet sporokist, her sporokistin içinde ise dönder adet sporozoit gelişir. Ookistlerin nemli toprakta ortalama 18 ay boyunca canlılığını koruyabildiği gösterilmiştir (5, 6).

*T. gondii* tanı testlerinde, etkene karşı geliştirilen aşı, ilaç çalışmaları yanında biyokimyasal ve moleküler yapı araştırmalarında, parazitin hayat döngüsünde yer alan takizoit ve bradizoit formları sıklıkla kullanılmaktadır. Bu formların istenildiğinde el altında bulunabilmesi için araştırma merkezlerinde sürekli *in vivo* sağlama yerine kriyoprezervasyona başvurulmaktadır (2-10). Bu makalede *T. gondii* RH Ankara suşu takizoitleri ve PRU suşu doku kistleri ile farelerde gerçekleştirilen pasajlama tekniği anlatılacak ve sonrasında elde edilen formların kriyoprezervasyon işlemleri detaylı olarak anlatılacaktır.

## YÖNTEMLER

### 1. Kullanılan Hayvanlar

*T. gondii* takizoit ve doku kisti üretiminde 4-6 haftalık BALB/c veya Swiss outbred fareler kullanılmaktadır.

### 2. *T. gondii* RH Ankara Suşu Takizoitlerinin Farelerde Pasajlanması

Daha önceden *T. gondii* takizoitleri ile enfekte edilmiş farelere CO<sub>2</sub> ile ötenazi sonrası servikal dislokasyon uygulanır. Daha sonra farenin batin bölgesi %70 etanol ile spreylenecek şekilde temizlenir, periton zarına kadar olan deri kısmı açılır ve iki yana diseksiyon yapılır. Periton alt-orta hattan açılarak intraperitoneal alan periton duvarına doğru pastör pipeti ile yaklaşık 10 mL steril %0.9 NaCl püskürtülerek yıkanır ve periton çalkantı suyu steril olarak 15 mL tüpe aktarılır (Resim 1A, B). Elde edilen eksudadaki takizoit miktarı, ışık mikroskopunda 40x objektifte hemositometre ile sayıldıktan sonra 1x10<sup>6</sup>/mL takizoit içerecek şekilde sulandırılır. Bu örnekten alınan 100 µL (yaklaşık olarak 1x10<sup>5</sup> takizoit içerir) 4-6 haftalık farelere intraperitoneal olarak uygulanır. İlk günü takip eden 3. veya 4. günde pasaj tekrarlanır (10-12).

#### 2.1. Takizoitlerin Kriyoprezervasyon için Hazırlığı

Bölüm 1.1.'de anlatıldığı gibi enfekte farelere ortalama 4. günde CO<sub>2</sub> ile ötenazi sonrası servikal dislokasyon uygulanır. Sonra batin bölgesi %70 etanol ile spreylenecek şekilde temizlenir ve periton zarına kadar deri kısmına diseksiyon uygulanır, periton açılmaz. Steril 5 mL enjektöre 2 mL %0.9 NaCl çekilir. Periton steril penset ile kaldırılır ve 2 mL %0.9 NaCl periton içine verilip, periton penset ile hafifçe çalkalanır. Enjektör iğnesi çıkarılır ve plastik kısmı ile verilen 2 mL %0.9 NaCl geri çekilir (Resim 1C). Eksuda içinde bulunan takizoit miktarı, ışık mikroskopta 40x objektifte hemositometre ile sayıldıktan sonra zaman geçirmeden kriyoprezervasyon işlemine geçilir.

### 3. *T. gondii* PRU Suşu Doku Kistlerinin Pasajlanması ve Kriyoprezervasyon için Hazırlığı

Daha önce *T. gondii* doku kistleri ile enfekte edilmiş 4-6 haftalık BALB/c veya Swiss outbred farelere ötenazi uygulanır. Fare tüplerinin ortama uçmaması için %70 etanol ile spreylenecek şekilde temizlenir. Steril penset ve makas ile kafa kaide kemikleri açılır, çıkarılan beyin dokusu, 1 mL %0.9 NaCl içeren 50 mL'lik tüpe aktarılır (Resim 1D, E). Beyin dokusu 20 G 1" enjektör iğnesi bulunan 5 mL enjektör ile 50 mL tüp içinde homojenize edilir ve üzerine 3-4 damla Penisilin (10.000 U/mL)/Streptomisin solüsyonu (10.000 µg/mL) (Biochrom) eklenir (Resim 1F). Homojenattan alınan 4 adet 20 µL örnek lam lamel arasında ışık mikroskopta 20x büyütmede incelenir ve kist miktarı sayılır. Elde edilen homojenat, kriyoprezervasyon ve pasajlama için kullanılabilir.

Örnek gece boyunca +4°C'de saklandıktan sonra sağlam farelere intraperitoneal olarak ortalama 10-15 doku kisti olacak şekilde pasajlanır. Yaklaşık 40 günde enfekte farelerde oluşan doku kistleri ile tekrar pasaj yapılabilir. Pasaj aralığı 6 ayı geçmemelidir (10-12).

### 4. Kriyoprezervasyon

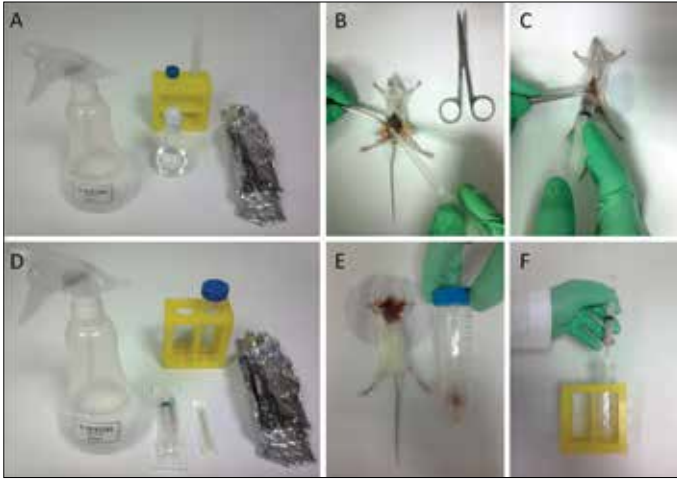
Bölüm 2.1. ve 3.'te anlatıldığı gibi elde edilen 0.5 mL takizoit içeren eksuda veya doku kisti içeren homojenat, önceden hazırlanmış 2 mL kriyo tüpü içindeki 1 mL kriyoprezervasyon solüsyonuna (150 µL Dimethyl Sulfoxide (Dimetilsülfoksit; DMSO), 150 µL FBS (Fetal Bovine Serum) içeren 700 µL RPMI 1640 besiyeri) eklenir. Daha sonra doku kisti içeren kriyo tüplerinin 15-45 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmesi gerekmektedir. Kriyoprezervasyon tüplerinin üzerine suşun adı, tüp içinde ne kadar takizoit veya doku kisti bulunduğu ve tarih yazılması önemlidir. Takizoit içeren kriyo tüpü hemen, doku kisti içeren tüp ise inkübasyon sonrası, -80°C derin dondurucuda bulunan strafor kutu içine konulur. Ortalama 4 saat sonra kriyo tüp -80°C derin dondurucuda bulunan kriyo kutusuna aktarılır (12).

#### 4.1. Kriyoprezervasyonda Bulunan Örneklerin Çözdürülmesi

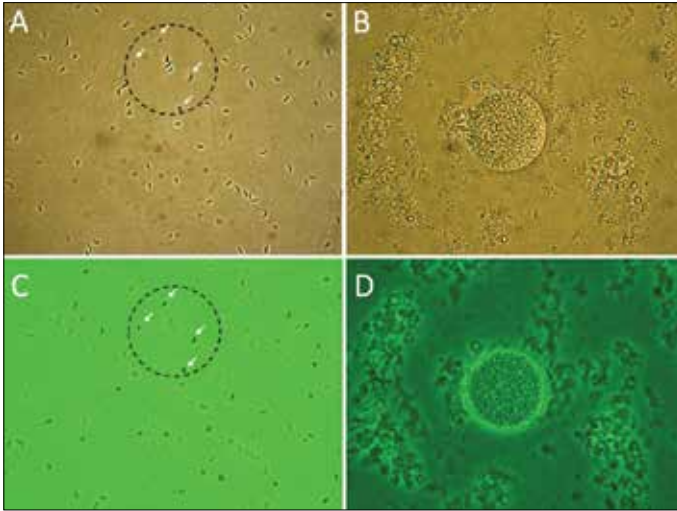
Kriyoprezervasyon solüsyonunda bulunan DMSO takizoit veya doku kistlerine zarar verebileceğinden, çözündürme işlemi hızlı gerçekleştirilmelidir. Bunun için daha önceden hazırlanmış 5 mL RPMI 1640 besiyeri içeren 15 mL tüp ve steril pastör pipeti hazırlanır ve su banyosu 37°C'ye getirilir. Kriyo tüp -80°C derin dondurucudan çıkarıldığı gibi 37°C su banyosuna konulur ve içerik çözüldükten hemen sonra steril pastör pipeti ile 5 mL RPMI 1640 besiyeri içeren 15 mL tüpe eklenir. Daha sonra tüp 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Üst sıvı 0.5 mL kalana kadar pastör pipeti ile atılır ve pellet üstüne 2 mL RPMI 1640 eklenerek, pastör pipeti ile yavaşça homojenize edilir.

Homojenattan alınan örnekteki takizoit miktarı, ışık mikroskopta 40x objektifte canlılık açısından faz kontrast mikroskopi ile değerlendirilir (Resim 2A-C). Daha sonra 1x10<sup>6</sup>/mL canlı takizoit içerecek şekilde RPMI 1640 ile süspanse edilir ve en az 3 fareye intraperitoneal yoldan farklı miktarlarda (100-300 µL) uygulanır.

Doku kisti içeren homojenattan alınan 4 adet 20 µL örnek içinde bulunan doku kistlerinin canlılığı lam lamel arasında ışık ve faz kontrast mikroskopunda 20x büyütmede değerlendirilir ve kist miktarı sayılır (Resim 2B-D). Daha sonra sağlam farelere intraperitoneal yoldan 10-15 canlı kist olacak şekilde verilir. Yaklaşık 40 gün sonrasında enfekte farelerin beyininde oluşan doku kistleri ile tekrar pasaj yapılabilir.



**Resim 1.** *T. gondii* RH Ankara suşu takizoitleri ve PRU suşu doku kistlerinin kriyoprezervasyonu için hazırlığı. (A-B) Takizoit pasajı için gerekli malzemeler ve pasajlama (C) Takizoit kriyoprezervasyonu için eksuda örneği alımı. (D) Doku kisti pasajı için gerekli malzemeler. (E, F) Doku kisti kriyoprezervasyonu için örnek alımı ve homojenizasyon



**Resim 2.** *T. gondii* RH Ankara suşu takizoitleri ve PRU suşu doku kistlerinin ışık mikroskop (A, B) ve faz kontrast (C, D) mikroskop görüntüleri (x40 büyütme). (A-C) Yuvarlak içine alınmış bölgedeki oklar canlılığını yitirmiş takizoitleri göstermektedir

## SONUÇ

Parazitin değişik evrim formlarını elde etmek için sürekli pasajlarda deney hayvanı veya hücre kültürü kullanımı ekonomik ve etik açıdan, olduğu kadar iş gücü kayıpları açısından da çeşitli sorunları beraberinde getirmektedir. Bu nedenle kriyoprezervasyonun ihtiyaç duyulduğunda çözdürülerek kullanılması bu sorunların

önüne geçmektedir. Pek çok parazit türleriyle başarılı kriyoprezervasyon çalışmaları yapılabilmektedir (13, 14).

*T. gondii*, hücre biyolojisi ve moleküler çalışmaları için iyi bir model olması yanında tıbbi ve veterinerlik çalışmalarında sıklıkla kullanılması nedeniyle çok sayıda araştırmada yararlanılmaktadır (2). Laboratuvar da tanı, tedavi, aşı geliştirme ve moleküler özelliklerin araştırılması aşamasında *T. gondii*'nin takizoit ve bradizoit formlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Takizoit ve bradizoit formlarının üretimleri, kriyoprezervasyonu ve kriyo eritme basamaklarını içeren iyi bir standart laboratuvar uygulama protokolü hazırlamak *T. gondii* ile araştırma laboratuvarının olmazsa olmazlarından.

## Teşekkür

*T. gondii* PRU suşunu sağlayan Fransa Limoges Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji-Mikoloji bölümü öğretim görevlisi Prof. Dr. Marie-Laure Dardé ve diğer çalışanlara teşekkür ederiz.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Ajioka JW, Morrisette NS. A century of *Toxoplasma* research. Int J Parasitol 2009; 39: 859-60. [CrossRef]
2. Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. J Eukaryot Microbiol 2008; 55: 467-75. [CrossRef]
3. Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma*: the next 100 years. Microbes Infect 2008; 10: 978-84. [CrossRef]
4. Gürüz AY, Özcel MA. Toxoplasmosis. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. M. Ali Özcel (Editör). Meta Basım, Bornova/İzmir, 2007.s.141-89.
5. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet 2004; 363: 1965-76. [CrossRef]
6. Montoya JG, Remington JS. *Toxoplasma gondii*. Mandell: Principles and Practice of Infectious Diseases 5th Ed. Churchill Livingstone, Inc, 2000.
7. Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. Int J Parasitol 2009; 39: 895-901. [CrossRef]
8. Weiss LM, Kim K. *Toxoplasma gondii*, The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods, 2007; 1st ed. Elsevier Ltd., Great Britain.
9. Dubey, JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 267-99.
10. Üner A, Değirmenci A. Hayvan İnkübasyonları. Parazitolojide Laboratuvar. Metin Korkmaz, Ülgen Zeki Ok (Editörler). Meta Basım, Bornova/İzmir, 2011.s.429-52.
11. Döşkaya M, Can H. Workshop I: *Toxoplasma gondii* Takizoit ve Doku Kistlerinin Hayvan Modelinde Pasajı. Yüzyıllık Tecrübe; *Toxoplasma gondii* Uluslararası Katılımlı Sempozyum ve Workshop Kitabı İzmir 17-20 Mart 2010; 1-2.
12. Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1988; 30-6.
13. Özbilgin A, Östan İ, Tabak T, Aşar K. [Cryopreservation of plasmodia with malaria models and establishment of a cryobank]. Türkiye Parazit Derg 2010; 34: 146-51. [CrossRef]
14. Özbilgin A, Östan İ, Kurt Ö. Kriyoprezervasyon. Parazitolojide Laboratuvar. Metin Korkmaz, Ülgen Zeki Ok (Editörler). Meta Basım, Bornova/İzmir, 2011.s.405-8.



# Dünyada Kistik Ekinokokkoz Epidemiyolojisi

## Epidemiology of Cystic Echinococcosis in the World

Özlem Tünger

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

### ÖZET

Kistik ekinokokkozun insidans ve prevalansı son yıllarda belirgin olarak düşmekle birlikte, bazı ülkelerde ve bazı coğrafi bölgelerde, özellikle ekonomik sıkıntılara bağlı olarak kontrol programlarının uygulanamaması nedeniyle, önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Bu parazitik enfeksiyonun coğrafi dağılımı, parazitin ara konağı olan ve göçebe-yarı göçebe yaşayan koyun ve keçi sürülerinin sayısına ve bu sürülerin parazitin son konağı olan ve insanlara bulaşta önemli bir rol oynayan köpeklerle birlikteliğine bağlıdır. Ekinokokkoz tüm dünyaya yayılan bir coğrafi dağılım gösterir ve her bir kıtada endemik odaklar vardır. En fazla ılıman iklim kuşağında yer alan ülkelerde görülmektedir. Başta Akdeniz ülkeleri olmak üzere, Güney ve Orta Rusya, Orta Asya, Çin, Avustralya, Güney Amerika, Kuzey ve Doğu Afrika bu enfeksiyonun görüldüğü coğrafi bölgelerdir. Bu derlemede kistik ekinokokkozun dünyadaki coğrafi dağılımı ve epidemiyolojisi irdelenmiştir. (*Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2013; 37: 47-52)

**Anahtar Sözcükler:** *Echinococcus granulosus*, epidemiyoloji, kistik ekinokokkoz

**Geliş Tarihi:** 13.07.2012

**Kabul Tarihi:** 31.10.2012

### ABSTRACT

The incidence and prevalence of cystic echinococcosis have fallen dramatically over the past several decades. Nonetheless, cystic echinococcosis remains a major public health issue in several countries and regions as a result of a reduction of control programmes due to economic problems. Geographic distribution differs by country and region depending on the presence of large numbers of nomadic or semi-nomadic sheep and goat flocks that represent the intermediate host of the parasite, and their close contact with the final host, the dog, which mostly provides the transmission of infection to humans. The greatest prevalence of cystic echinococcosis in human and animal hosts is found in countries of the temperate zones, including Mediterranean regions, southern and central parts of Russia, central Asia, China, Australia, South America and north and east Africa. In this article, the geographic distribution and epidemiology of cystic echinococcosis worldwide are reviewed. (*Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2013; 37: 47-52)

**Key Words:** *Echinococcus granulosus*, epidemiology, cystic echinococcosis

**Received:** 13.07.2012

**Accepted:** 31.10.2012

### GİRİŞ

Kistik ekinokokkoz, tenya (sestod) ailesinde yer alan *Echinococcus granulosus*'un neden olduğu kozmopolit zoonotik bir enfeksiyondur. Şimdiye kadar tanımlanmış altı türü olmakla birlikte, insanlarda hastalık yapan en önemli iki tür *E. granulosus* (kistik ekinokokkoz etkeni) ve *Echinococcus multilocularis* (alveolar ekinokokkoz etkeni)'dir. *E. granulosus*'un bulaşması evcil veya vahşi ara konaklarına

bağlıdır ve insanların yapmış olduğu aktivitelerden, davranış şekillerinden ve uygulanan politikalardan etkilenir (1, 2).

Mitokondrial DNA sekansları üzerinde yapılan moleküler çalışmalar sonrasında *E. granulosus* kompleksinin 3 tür ve morfolojileri, konak özgüllükleri ve moleküler özellikleri birbirinden farklı 10 genotipten (G1-10) meydana geldiği gösterilmiştir. Her bir tür içinde de yaşam siklüsü, konak özgüllüğü, antijenite, bulaştırıcılık, kemoterapötiklere duyarlılık ve

**Bu derleme Kistik Ekinokokkoz Sempozyumu'nda, (17-18 Mayıs, Manisa) sunulmuştur.**

**Yazışma Adresi / Address for Correspondence:** Dr. Özlem Tünger, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye Tel: +90 236 236 03 30 E-posta: otunger@hotmail.com  
doi:10.5152/tpd.2013.12



patolojiye ait özellikleri bakımından birbirinden farklı olan genetik varyantlar olduğu belirlenmiştir. Bu özellikler aşıların geliştirilmesinde, tanıda kullanılacak reagenlerin belirlenmesinde, tedavide kullanılan ilaçların etkinliğinde önemli rol oynamakta, dolayısıyla hastalığın epidemiyolojisi ve kontrolünü belirlemektedir. Gerçekten de her bir ekinokok türünün konağa özgül genetik bir kimliği vardır (3).

### E. granulosus Genotiplerinin Dünyadaki Dağılımı

Tanımlanmış olan 10 farklı genotipten ikisi koyunlarda (G1, G2), ikisi sığırlarda (G3, G5), biri atlarda (G4), biri develerde (G6), ikisi domuzlarda (G7, G9), biri geyiklerde (G8) ve sonuncusu da bir rengeyiğinden (G10) izole edilmiştir. Bu genotiplerle ilgili yapılan epidemiyolojik çalışmalar olmakla birlikte konak ve coğrafik dağılım ile genotip arasındaki ilişkiyi belirlemek için daha ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır (3-5).

İnsanlarda en sık kistik ekonokkoza neden olan ve tüm dünyada en yaygın olan genotip G1'dir. Özellikle koyun çiftliklerinin yoğun olduğu coğrafi alanlarda daha baskın olarak görülmektedir. Bu genotipin insan ekinokokkozunun yaygın olduğu Fas, Tunus, Kenya, Kazakistan, Batı Çin ve Arjantin'de daha fazla olduğu bildirilmiştir (4).

G2 genotipinin koyunlar arasında görüldüğü ve insan ekinokokkozuna neden olabileceği bilinmekle birlikte G1'den farklı genetik özelliklere ve dolayısıyla farklı yaşam siklusüne sahiptir. Avustralya ve Tazmanyadan rapor edilmiştir.

G3 genotipi bufalolar arasında yaygındır ve suyla bulaşır. Güney Asya'da görülmektedir. İnsanların bu genotipe duyarlı oldukları bildirilmemiştir.

Daha önceden *Echinococcus equinus* olarak bilinen G4 genotipi ara konak olarak atlarda bulunur, şimdiye kadar insan olgusu bildirilmemiştir. Güney Afrika'nın yanı sıra İspanya, İtalya, Lübnan, Suriye gibi Akdeniz ülkelerinde görülmektedir.

*Echinococcus ortleppi* olarak bilinen G5 genotipi sığırlarda enfeksiyona neden olur. Avrupa, Asya, Afrika'nın bir bölümü ve Güney Amerika'da görülür. Şimdiye kadar sadece bir insan olgusu bildirilmiştir. Koyunlardaki genotipe göre daha az patojen olduğu düşünülmektedir.

G6-G10 genotiplerinin diğerlerinden ayrımı zor olmakla birlikte koyunlarda görülen genotiplerden belirgin olarak farklılıkları vardır. G6 özellikle deve ve keçilerde enfeksiyona neden olur. Hayvan enfeksiyonları Orta Doğu, Afrika, Güneybatı Asya ve Güney Amerika'dan, insan enfeksiyonları ise Nepal, İran, Kenya ve Arjantin'den bildirilmiştir (5).

G7 genotipi Avrupa'da (özellikle İspanya ve İtalya), Asya ve Güney Amerika'da evcil domuzlarda gösterilmiştir. G7 ile çok yakın genetik benzerlik gösteren G9 genotipi ise Polonya'da insan enfeksiyonu şeklinde bildirilmiştir, G9 genotipinin hayvanlarda enfeksiyon yaptığı gösterilememiştir.

G8 genotipinin Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika'da vahşi kurt ve geyiklerde enfeksiyon yaptığı gösterilmiştir. Bu genotipin insanlarda diğer genotiplere göre daha hafif seyirli enfeksiyon yaptığı bildirilmiştir. Bununla birlikte bu genotipin patojenitesine ilişkin daha ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır (5).

### Kistik Ekonokokkozun Kıtaldaki Durumu

#### Amerika

Kuzey Amerika'da en fazla görülen geyik suşu (G8) ve koyun suşu (G1)'dur. G8 özellikle Kanada, Alaska ve Minesota'da vahşi yaşam arasında daha yaygın olarak bulunmaktadır. Vahşi yaşamdaki en önemli rezervuarları kurtlar, çakallar, geyikler ve köpeklerdir. Kistik ekinokokkoz ilk kez Kanada'da 1950'li yıllarda Kızılderili ve Eskimolar gibi yerli halkta tüberküloz taraması nedeniyle akciğer grafilerinin çekilmesiyle birlikte pulmoner hidatidoz şeklinde görülmeye başlamıştır. Aynı dönemde Alaska'da 101 yerli olgu bildirilmiştir. Ontario ve British Columbia'daki Amerikan geyiklerinin %50'sinin, Kuzeybatı Kanada'daki köpeklerin %28-50'sinin enfekte olduğu tahmin edilmektedir. İnsanlarda pulmoner tutulum yaygındır. Alberta'dan yapılan bir derlemede 22 kesin ve olası vaka değerlendirilmiş, hastaların %70'inin kadın, %41'inin yerli olduğu, %40'unda pulmoner %50'sinde hepatik tutulum olduğu bildirilmiştir (6, 7).

Arizona, Kaliforniya, New Mexico ve Utah gibi Kuzey Amerika'nın batı eyaletlerinde koyun suşunun insanlar arasındaki yayılımı 1960'larda belgelenmiştir. Bu ekinokok enfeksiyonunun kaynağının Avustralyalı koyun köpekleri olduğu ve 1938'de Utah'a geldiği, bu bölgede koyunlar arasında yayıldığı ve daha sonra da koyun ticaretiyle komşu eyaletlere yayıldığı saptanmıştır. Bir diğer enfeksiyon kaynağı ise İzlanda, İtalya, Yunanistan ve son yıllarda ise özellikle Orta Doğu ve Asya gibi bu enfeksiyonun daha endemik olduğu bölgelerden Amerika'ya gelen göçmenlerdir (7).

İkinci Dünya Savaşı'ndan sonra insanlar ve köpekler arasında yakın temasa bağlı olarak Mississippi vadisi gibi birkaç bölgede domuz ve köpeklere de bulaş olduğu bildirilmiş, ancak yüzyıl ortasında enfeksiyon bulaşı sona ermiştir. Daha sonra 1960'ların ortalarında Kalifornia, Utah, New Mexico ve Arizona gibi batı eyaletlerinde koyun ve insanlarda bir epidemiyoloji olmuştur. Koyunculuk yapan çiftçilerde ve Kaliforniya'da baskılar, Orta Utah'ta mormonlar, New Mexico ve Arizona'da kızılgeriler gibi evlerinde koyun kesen kişilerde enfeksiyon daha fazla görülmüştür (7).

Amerika Birleşik Devletleri'nin yanı sıra Avrupa gibi diğer bölgelerden gelen evcil hayvanlarla birlikte tüm *E. granulosus* kompleksinin tüm genotipleri Güney Amerika'ya girmiştir. Özellikle Peru, Şili, Arjantin ve Brezilya'da en yaygın olan koyun suşu (G1)'dur (8-10).

Peru'da hidatidoz prevalansının çiftlik hayvanlarından koyunlarda %89, sığırlarda %80 olduğu bildirilmiştir. Kesin konak olarak köpeklerde enfeksiyon prevalansı endemik bölgelerde %32-88 arasında bildirilmiştir. Orta ve Güneybatı Peru'da kistik ekinokokkozun cerrahi insidansı 100.000'de 1-2, asemptomatik enfeksiyon oranı %3-9.3 olarak saptanmıştır. Bununla birlikte Peru'nun kıyı şeridinde yer alan bir şehirde 1998'de yapılan çalışmada yıllık cerrahi insidans 100.000'de 32 olarak bildirilmiştir. İnsidansdaki bu artış kayıt sisteminin iyi olmasına ve daha önce uygulanan kontrol önlemlerinde yetersizlik bulunmasına bağlanmıştır (8).

Şili ekinokokkoz için endemik bir bölgedir. Kontrol önlemlerinin uygulanmasıyla birlikte 2000 yılından sonra enfeksiyon prevalansı sığırlarda %22.3, koyunlarda %6.3 ve köpeklerde %11'e kadar gerilemiştir. İnsanlardaki enfeksiyona bakıldığında, 1992 ile 2004

yılları arasındaki hastalık insidansı, tanısı konulmuş hastalar dikkate alındığında 100.000'de 2-2.5, bildiri yapılan olgular dikkate alındığında ise 100.000'de 10 olarak bildirilmiştir. Enfeksiyon açısından en önemli endemik bölge olan Güneybatı Şili'de 2005'de cerrahi insidans 100.000'de 6-20'dir. Hatta bazı bölgelerde bu sayı 162'ye kadar yükselmektedir (2).

Arjantin'de *E. granulosus* ve *E. ortleppi* türlerinin değişik suşları bildirilmiştir. İnsanlarda ve hayvanlarda koyun suşu (G1, insanlarda en sık görülen), Tazmanya koyun suşu (G2), sığırlar suşu (G5) ve deve suşu (G6) saptanmıştır. Domuz suşu olan G7 ise domuz ve köpeklerde saptanırken, insan olgusu bildirilmemiştir. Çiftlik hayvanlarında kistik ekinokokkoz insidansı sığırlarda %7, koyunlarda %12.5, domuzlarda %9.8 ve keçilerde %6 olarak bildirilmiştir. İnsanlardaki enfeksiyon prevalansı ise bölgenin endemisitesine bağlı olarak farklılıkları gösterebilmektedir. Endemisitesi düşük bölgelerde 100.000'de 1.4 iken Neuquen'de 404, Chubut'da 260, Rio Negro (Patagonya)'da 30 gibi yüksek oranlar bildirilmektedir (9).

Brezilya'da en önemli endemik bölüm güney batı bölgesidir. Sadece koyun suşu ve *E. ortleppi* bildirilmiştir. Bu bölgede hayvanlardaki enfeksiyon prevalansı sığırlarda %25.5, koyunlarda %30.2 ve köpeklerde %11.4-38 olarak bildirilmiştir. İnsanlardaki seroprevalans ise kırsal bölgede %6, kentsel bölgede %3.5 bulunmuştur. Bununla birlikte bu bölgedeki farklı suşların epidemiyolojisine ve bunun ekonomi ve halk sağlığına olan etkisine ilişkin ait veriler yetersizdir (10).

### Avustralya

Avustralya'da en sık görülen suş G1'dir. Daha önceleri özellikle Tazmanya'da G2 suşu da bildirilmekle birlikte, köpekler arasında helmantik enfeksiyonların önlenmesine yönelik sıkı önlemlerin alınmasıyla birlikte G2 suşunun genetik olarak değişikliğe uğradığı düşünülmektedir. Vahşi yaşamda enfeksiyonun yayılımının olmaması ve sıkı kontrol programlarının uygulanmasıyla birlikte 1990'ların ortalarında Tazmanya'da *E. granulosus* enfeksiyonu eradike edilmiştir (11).

Avustralya'da özellikle bazı vahşi yaşam alanlarında *E. granulosus* bulaşı için yüksek riskli bölgeler rapor edilmiştir. Güneydoğu Avustralya'da enfeksiyonun bulaşından en fazla sorumlu olan kesin konak vahşi köpekler, ara konaklar ise kangurulardır. Batı Avustralya'da, Perth şehrinin güneyinde, *E. granulosus* için bir diğer endemik alan belirlenmiştir. Bu bölgede enfeksiyonun kaynağı yeni tanımlanmış, benzer ara konaklar bildirilmiştir.

Evcil çiftlik hayvanlarında, köpeklerde ve insanlarda enfeksiyonun gelişmesinde devamlı kalıcı bir kaynak olmaları nedeniyle vahşi yaşamdaki rezervuar hayvanlar önemli bir rol oynamaktadır. Townsville'de, Queensland'ın kenar banliyölerinde ve Maroochy Shire'da yapılan incelemelerde vahşi köpeklerde enfeksiyon gösterilmiştir. Koyunlarda enfeksiyon gelişmesi çiftliklerde halen daha önemli bir problemdir. Sürülere bakan çok sayıda evcil köpeklerin idaresinde yetersizlikler vardır ve sürüler hala daha vahşi köpekler tarafından saldırıya uğramaktadır. Enfekte vahşi köpekler otlaqları ekinokok yumurtaları ile kontamine etmektedirler. Son yıllarda köpek ve koyunlarda enfeksiyon prevalansı azalmakla birlikte, özellikle güneydoğudaki bazı kırsal alanlarda *E. granulosus*'un evcil köpekler arasında tekrar sorun olmaya başladığına ilişkin raporlar bildirilmektedir. New South Wales'de

köpeklerin %29'unun, Victoria'da ise %18'inin enfekte olduğu saptanmıştır (12).

Tüm ülkede yıllık yeni olgu sayısı 80-100 arasında sabit olarak seyretmektedir. Kırsal kesimde enfekte evcil hayvanlardan insanlara bulaş devam etmekle birlikte, tilki ve vahşi köpek gibi kesin konakların şehirlere girmesiyle insanlara kazayla bulaşma riski artmaktadır. Bu vahşi hayvanlar özellikle eğlence alanlarındaki çöpleri yiyecek bulma amacıyla karıştırılmaktadır. İnsanlar da ya bu vahşi hayvanların dışkıları ya da sinekler aracılığıyla *E. granulosus* yumurtalarıyla direkt temas etmektedirler. Bunun dışında domuz avında kullanılan köpekler aracılığıyla da enfeksiyon bulaşma riski olduğu rapor edilmiştir. Ekinokokkoz olgularının saptanmasında herhangi bir izleme sistemi kullanılmadığı, sadece kişisel bildirimler olduğu için gerçek insidansı belirlemek zordur (11).

### Asya

İran'da en sık görülen suş koyun, keçi, sığır ve develeri enfekte eden G1'dir. Bunun yanı sıra yine koyun, deve ve sığırlarda enfeksiyon oluşturan G6 suşu da saptanmıştır. İnsan enfeksiyonlarında her iki genotip de tanımlanmıştır (13).

Kazakistan'da enfeksiyon prevalansı genç koyunlarda (<1 yaş) %20-25, yaşlı koyunlarda (>6 yaş) %74-80, vahşi köpeklerde %23, köy köpeklerinde %6 olarak belirlenmiştir. En fazla parazit yükü kırsal alandaki köpeklerde saptanmış ve bunların insanlara enfeksiyon bulaşında en önemli rol oynayan hayvanlar olduğu bildirilmiştir. İnsan enfeksiyon oranları da giderek artmış, 1990'lı yılların ortalarında yıllık cerrahi olgu sayısı 200 iken, günümüzde bu sayı 1000'e yaklaşmıştır. Aynı eğilim diğer orta Asya ülkeleri için de geçerlidir. Bununla birlikte bu coğrafyada enfeksiyonun bulaşması ve yayılımı hakkında ayrıntılı veriler yoktur (2).

Suriye, İsrail ve Filistin gibi Arap yarımadasındaki ülkelerde kistik ekinokokkoz endemiktir. En önemli risk faktörleri özellikle Kuzey Suriye, Kuzey İsrail ve Batı Filistin bölgelerinde çiftçilik ve göçebe hayatı olarak tanımlanmıştır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda Suriye'de köpeklerde prevalans %9-15, çiftlik hayvanlarında %5-17, İsrail'de köpeklerde %5.4-14.2, koyunlarda %4.6-10, Filistin'de köpeklerde %7.9-14.3 olarak bildirilmiştir. Yıllık cerrahi prevalans 1990 ortalarında Jerusalem'de 100.000'de 1.76, Filistin West Bank'de 3.1, Hebron'da 4.9, Jericho'da 5.0, Bethlehem'de 5.1 olarak bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada insanlarda kümülatif enfeksiyon oranı Kuzey İsrail'de 100.000'de 1.5, Güney İsrail'de 0.68 saptanmıştır (14).

Çin kistik ekinokokkoz için en önemli endemik bölgelerden biridir. Koyun suşu (G1) ve deve suşu (G6) olmak üzere sadece iki genotip tanımlanmış ve her ikisine ait insan enfeksiyonları rapor edilmiştir. En endemik alanlar batı Xinjiang, Ningxia ve Moğolistan olarak tanımlanmıştır. En yüksek prevalans oranları ise Doğu Tibet platolarında yer alan Güneybatı Qinghai ve Kuzeybatı Sichuan gibi kırsal alanlar ile Çin'in batı ve kuzey batısında bulunan Güney Gansu'dan bildirilmiştir. Koyunlarda %99, sığırlarda %88, domuzlarda %70 gibi yüksek prevalans oranları rapor edilmiştir. Çin'in batı ve kuzeybatısında yer alan kırsal alanlarda hayvancılık, 350 milyon koyun ve diğer at, deve gibi büyük hayvanların geçim kaynağı olarak kullanıldığı önemli bir endüstridir. Buna karşılık bu bölge için hastalığın esas kesin konağı evcil köpeklerdir.

Bazı kırsal alanlarda kurt ve çakal gibi vahşi hayvanlar bulaştırıcı-likten sorumlu olabilir (15).

Çin'de ilk insan enfeksiyonu 1905'de rapor edilmiştir. Son yüzyıl-da yaklaşık 35,000 olgu cerrahi olarak tedavi edilmiştir. Xinjiang'da 21,560 olgu bildirilmiş, prevalans 100.000'de 80 olarak saptan-mıştır. Tüm Çin'de yaklaşık 1 milyon insan ekinokokkozu bulun-duğu, bunun da %70'inin karaciğerde kronik kistik lezyonlar şeklinde olduğu ileri sürülmektedir. Kadınlarda enfeksiyon oranı erkeklerle göre daha fazladır. Bu da köpek besleme, yakıt amacı-yla gübre toplama ve süt sağma gibi işleri kadınların yapmasına bağlanmıştır. Özellikle hayvancılığın önemli bir geçim kaynağı olduğu ve kadınların kesin konakla daha fazla temas ettiği Çin'in batı ve kuzeybatı bölgelerinde kistik ekinokokkoz için en önemli risk faktörü göçebe ve yarı göçebe kırsal yaşam şeklidir. Bu yaşam şekliyle ilişkili olarak erişkinlerde enfeksiyon riski çocuklara göre daha fazladır. Hasta sayısının günümüzde daha fazla olma-sının nedenlerinden biri de tanı yöntemlerinin gelişmesi ve sos-yal yardım programlarının iyileştirilmesiyle tanı yöntemlerine daha kolay ulaşılabilmesidir. Günümüzde Çin ekinokokkoz araşt-ırmaları için önemli bir odak haline gelmiştir (15, 16).

#### Afrika

Afrika'nın çoğu bölgesinde araştırmaların az yapılması ve bildirim-lerin yeterli olmaması nedeniyle yeterli ve güvenilir bilgi edinmek zor olmakla birlikte, Afrika ülkelerinde birkaç genotipin varlığı bil-dirilmiştir. Başta koyun besiciliğinin yaygın olduğu Kuzey ve Doğu Afrika'da olmak üzere en fazla görülen suş G1'dir. Bunun yanı sıra G6 suşunun varlığı da rapor edilmiştir. Güney Afrika'da *E. equinus* (at suşu) ve aslan suşu gibi vahşi suşlar da tanımlanmıştır. Bununla birlikte Afrika'nın vahşi yaşam alanlarındaki ekinokokkozun duru-mu hakkındaki bilgilerimiz yetersizdir (17).

Yakın zamanda Libya'da yapılan bir çalışmada sokak köpeklerin-de seroprevalans %25.8, sahipli köpeklerde %21 olarak bulun-muştur. Bazı çalışmalarda ise %58'e varan oranlar bildirilmektedir. Diğer hayvanlarla ilgili yapılan çalışmalarda enfeksiyon oranları koyunlarda %1.7-33.4, sığırlarda %1.0-13.9, develerde %1.4-40.0, keçilerde %0.1-18.0 saptanmıştır. Libya'nın kuzey kıyılarında 36 köyde yapılan bir çalışmada 20,200 kişi kist hidatit açısından ult-asonla taranmış, enfeksiyon prevalansı %1.7 bulunmuştur. Doğu Libya'da yapılan başka bir çalışmada insidans oranı 100.000'de 4.2 olarak bildirilmiştir. İnsanlarda en sık enfeksiyondan sorumlu olan koyun suşu (G1)'dur (18). Kuzeybatı Kenya ve Güneydoğu Sudan sınırlarında görülen insan enfeksiyonlarından elde edilen 179 izolatin genetik incelemelerinde sadece bir tanesinin G6, diğerlerinin ise G1 olduğu saptanmıştır.

Ekinokokkoz Mısır'da düşük endemisitede görülür. Köpeklerde prevalansı şehirlerde %3.2, kırsal alanda %6 olarak bildirilmiştir. Kahire'den %15 gibi daha yüksek oranlar rapor edilmiştir. Diğer hayvanlardaki prevalans oranları ise koyun ve keçilerde %0.3, domuzlarda %0.7, inek ve bufalolarda %6.4, develerde %2.5, eşeklerde %10.6 bulunmuştur. Yıllık cerrahi insidans oranları 100.000'de 1.3-2.6 olarak bildirilmiştir (19).

Tunus'da ekinokokkoz önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmekte, prevalansı ve morbiditesi yüksek seyretmektedir. En fazla G1 koyun suşu ve G6 deve suşu görülmektedir. Koyun bes-leme önemli bir risk faktörüdür. Hastaların %94.7'sinin koyun

beslediği saptanmış, çiftlik çalışanlarının ise %58.3'ünün seropo-zitif olduğu gösterilmiştir. 1999 ile 2007 yılları arasında yapılan epidemiyolojik çalışmalarda prevalans oranları kuzularda %10.4, 1-2 yaş arası koyunlarda %75.4, 2 yaş üstü koyunlarda %83.8-100, develerde %10.1 olarak bildirilmiştir. Yeterli çalışma olmamakla birlikte yıllık cerrahi insidansı 100.000'de 15'dir (17).

Cezayir'de de suşların dağılımı benzer bulunmuştur. Koyun, sığır ve insanları enfekte eden G1 suşu, develeri enfekte eden G6 suşu tanımlanmıştır. Çiftlik hayvanları ve insan enfeksiyonları için en önemli kaynağın köpekler olduğu belirlenmiştir. Prevalans oranı develerde %24.8, sığırlarda %13.9 ve atlarda %6 olarak bildirilmiştir. İnsan enfeksiyonları için yeterli veri olmamakla bir-likte Sağlık Bakanlığı'nın verilerine göre yıllık 700'den fazla cerra-hi olgu rapor edilmiştir. Son verilere göre hastalık insidansının 100.000'de 3.6-4.6 olduğu belirlenmiştir (20).

Fas da ekinokokkozun endemik olduğu ülkelerden biridir. G1 suşunun yanı sıra bu genotipe benzer bir genotip, deve ve atlar-da gösterilmiştir. Enfeksiyon prevalans oranları köpeklerde %22-62.8, koyunlarda %10.6, keçilerde %1.9, sığırlarda %22.9, devel-erde %12.1, atlarda %17.8 olarak bildirilmektedir. Bazı coğrafi bölgelerde bu oranlar daha yüksektir. Orta Atlas'da sığırlarda %48.7, Kuzey batı bölgesinde sığırlarda %37.6, koyunlarda %31.6 oranları bildirilmiştir. İnsanlarda yıllık cerrahi olgu sayısı 2006'da 100.000'de 4.55 olarak rapor edilmiştir (21).

#### Avrupa

Malta ve Güney Kıbrıs gibi hastalığın elimine edildiği düşünülen bölgeler haricinde Arap yarımadası ve tüm Akdeniz ülkelerinde kistik ekinokokkoz önemli bir sorundur (22). İlki 1970'li yıllarda ikincisi 1990'lı yıllarda başlatılan eradikasyon programlarından önce Kıbrıs'da yıllık cerrahi insidans 100.000'de 12.9'du. Kuzey Kıbrıs'da 1998-1999'daki oranlara göre 2000-2003 yıllarındaki enfeksiyon oranları belirgin olarak azalmış, köpeklerde %1.95'den %0.012'ye, sığırlarda %23.58'den %6.61'e, koyunlarda %5.31'den %1.53'e gerilemiş, keçilerde hep %0.5'in altında kalmış ve %0.13'de devam etmiştir. Bunun yanı sıra Güney Kıbrıs'da ise kontrol programları sonucunda hastalık neredeyse eradike edil-miştir (23).

*E. granulosus* İrlanda, İzlanda ve Danimarka dışında tüm Avrupa ülkelerinde vardır. Kuzey ve Orta Avrupa'da ekinokokkoz nadir-dir. Özellikle Finlandiya'da geyik ve domuzlarla bulaş bildirilmiş-tir. Finlandiya'daki geyik suşu Kuzey Amerika tanımlanan G8'den genetik olarak farklı olduğu için yeni bir suş olarak tanımlanmıştır (G10). En fazla bulaşmanın kurtlar, rengeyikleri ve kanada geyik-leri arasında olduğu belirlenmiştir (24).

Avrupa'da en fazla endemik alanlar Akdeniz bölgesinde bulunur ve insanlarda yıllık insidans 100.000'de 4-8'dir. Bulgaristan gibi bazı Doğu Akdeniz ülkelerinde de aynı durum söz konusudur. Ancak Polonya, Ukrayna ve Slovakya gibi Doğu Avrupa ülkelerinde domuz suşlarına bağlı (G6-G10) hayvan ve bazen de insan enfeksi-yonları görülür. Sırbistan ve Karadağ'da ara konak olarak rol oynayan en önemli hayvan domuzlardır. İnsan enfeksiyonları hakkında yeterli veri olmamakla birlikte, hayvanlarda enfeksiyon oranları %4.6 ile %57.6 arasında bildirilmektedir. Arnavutluk, Bosna ve Hersek gibi diğer ülkelerde hastalık endemiktir, ancak ne hayvan ne de insan enfeksiyonları için yayınlanmış veri yoktur (22).

Yunanistan'da güneydeki Peleponnesus bölgesinde koyun ve keçilerde yapılan genotip ve prevalans çalışmalarında koyunların G1 (koyun suşu), G3 (bufalo suşu), G7 (domuz suşu) ile enfekte oldukları gösterilmiştir. Çiftlik hayvanlarında yapılan çalışmalarda 1980 ortalarında ve 1990 ortalarındaki prevalans oranları sırasıyla sığırlarda %82-56.6, koyunlarda %80-100, keçilerde %24-15.4, domuzlarda %5-9.3 olarak bildirilmiştir. İnsanlarda yıllık cerrahi olgu sayısı 1984'de 100.000'de 12.9 iken 1999'da 29'a yükselmiştir. Çiftlik hayvanlarında 1998'de yapılan bir izlem sonrasında prevalans oranlarının koyunlarda %31.3, keçilerde %10.3, domuzlarda %0.6 ve sığırlarda %0 olduğu belirlenmiştir. Orta Yunanistan'da yapılan yeni bir çalışmada ise Orta Yunanistan'da 2006'da koyunlardaki insidansın %39.3'e ulaştığı yayınlanmıştır. İnsanlardaki insidansın ise 1967'de 100.000'de 9.77 iken, 1983'de 10.59'a yükseldiği, yapılan çeşitli çalışmalarda insidansın 100.000'de 11.6 ile 13.35 arasında seyrettiği bildirilmiştir. İnsidans oranları günümüze değin giderek azalmış, 2007'de 100.000'de 0.122 olarak rapor edilmiştir. Tüm ülkeyi kapsayan bir veri olmamakla birlikte, her yıl 800 kistik ekinokokkoz tanısı konulduğu ve bunların da 300-400'üne cerrahi tedavi uygulandığı ileri sürülmektedir (25).

Batı Avrupa'da da hakim olan genotip G1'dir. Daha önceden Almanya ve İsviçre'de sığırlardan bulaşan *E. ortleppi* enfeksiyonları rapor edilmiş olmakla birlikte, günümüzde sporadik olgular bildirilmekte, Hollanda'dan sadece bir insan olgusu yayınlanmıştır.

İngiltere'de enfeksiyon sadece orta ve güney Wales bölgesinde sınırlandırılmıştır. Bu bölgede ekinokokkozun tekrar önem kazandığı, kırsal alandaki köpeklerde prevalansın 1989'da %3.4 iken, 2002'de %8.1'e yükseldiği bildirilmektedir (22).

İspanya'da özellikle kuzey doğu, orta ve batı bölgelerinde ekinokokkoz endemiktir ve prevalans son birkaç yılda giderek artmıştır. En fazla bulunan suşlar koyun, sığır, keçi, domuz, yabandomuzu ve insanları enfekte eden G1 suşu (koyun suşu), domuz, keçi ve yabandomuzlarını enfekte eden G7 suşu (domuz suşu) ve atları enfekte eden *E. equinus* (eski G4 suşu)'dur. Alava bölgesinde yapılan çalışmalarda prevalans oranları köpeklerde %8, kurtlarda %15 bulunmuştur. Prevalans oranlarının Madrid bölgesindeki koyunlarda %2.88, Laroja bölgesindeki koyunlarda %20.3, ülkenin kuzey doğu, orta ve batı bölümlerindeki koyun ve ineklerde %23 olduğu bildirilmiştir. İnsanlarda ekinokokkozla ilişkili olarak, ülkenin batısında bulunan Salamanca şehrinde yüksek insidans oranları bildirilmiş, 1980-2000 yılları arasında cerrahi enfeksiyon insidansı 100.000'de 10.8 olarak rapor edilmiştir. Laroja bölgesinde ise kistik ekinokokkoz prevalansı 2000 yılına kadar 100.000'de 19'dan 4'e gerilemiş, ülkenin diğer bölümlerinde ise 1.1 ile 3.4 arasında olduğu bildirilmiştir (26).

Fransa'da yapılan bir izlem sonrasında 1990 ortalarında ekinokokkoz prevalansının çiftlik hayvanlarında %2.5, insanlarda ise 100.000'de 0.28'den az olduğu belirlenmiştir. Fransa'nın Korsika adasında ise 100.000'de 10 gibi daha yüksek oranlar bildirilmiştir. Avrupa Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (European Centre for Disease Prevention and Control) 2005'de 17 insan olgusu rapor etmiştir (22).

İtalya'nın ekinokokkoz için orta riskli bir bölge olduğu kabul edilmektedir. İtalya'da özellikle ülkenin güneyindeki Campania bölgesi, Sardunya ve Sicilya başta olmak üzere, çiftlik hayvanlarında

G1 (koyun), G2 (Tazmanya koyun), G3 (bufalo), G4 (at), G7 (domuz) genotipleri saptanmıştır. Koyunlarda *E. granulosus* prevalansı Basilicata bölgesinde %5-28, Abruzzo bölgesinde %22, Toskana bölgesinde %47 olarak bildirilmiştir. Kistik ekinokokkoz Sicilya'da sığırlarda %67.1, koyunlarda %11.13-57.6, köpeklerde %5.6-19, Sardunya'da koyunlarda %70-92.8, sığırlarda %9.4, domuzlarda %9.411.1, atlarda %1, köpeklerde %3-19, Campania bölgesinde sığırlarda %10.4-14.8, bufalalarda %10-18.6 olarak bulunmuştur (22, 27).

Hayvanlarda *E. granulosus* enfeksiyonunun endemitesisi kuzeyde düşük olmakla birlikte, İtalya'nın orta bölgelerinde orta düzeydedir. Prevalans oranları Orta İtalya'da koyunlarda %47-81.18, sığırlarda %15.3, keçilerde %71.97, domuzlarda %0.82, Abruzzo'da koyunlarda %20.2, sığırlarda %15.3 olarak bildirilmiştir. Kuzeyde bulunan Emilia Romagna bölgesinde prevalans oranları ise oldukça düşüktür. Sığırlarda %0.39-0.54, koyunlarda %0.3, keçilerde %0.39, atlarda %0.34, domuzlarda ise milyonda 0.95 bulunmuştur. Apennines dağlarında ise kistik ekinokokkoz prevalansı köpeklerde %31, kurtlarda %15 olarak rapor edilmiştir (28).

İtalya'da çiftlik hayvanlarında prevalans düşüktür. Sığırlarda %0.52, koyunlarda %1.30, keçilerde %0.6, domuzlarda %0.0013 ve atlarda %0.019 bulunmuştur. İnsanlarda enfeksiyon insidansı tüm ülke genelinde 100.000'de 1.3, Sardunya'da ise 100.000'de 4-8'dir. Her yıl 1000'den fazla olgu cerrahi tedavi gerektirmektedir. Hayvan enfeksiyonu açısından endemik olan Sicilya, Sardunya, Orta ve Güney İtalya bölgelerinde insan enfeksiyonu da daha fazladır. Cerrahi enfeksiyon insidansı Sardunya'da 100.000'de 6.6-10.6, Emilia Romagna'da 1.57-5.6, Sicilya'da 2.3, Lombardia'da 1.22, Basilicata'da 1.76, Campania'da 0.46, Apulia'da 2.33'dür. Hastalığın yayılmasında en önemli risk faktörleri olarak koyun çiftçiliği, illegal hayvan kesimi ve köpek besleme olarak tanımlanmıştır (27, 28).

## SONUÇ

Kistik ekinokokkozun dünyadaki coğrafi dağılımına bakıldığında birçok ülkede, hatta daha önceden düşük insidansa sahip ülkelerde bile tekrar önem kazanan bir enfeksiyon haline geldiği görülmektedir. Ekonomik problemler, kaynak yetersizlikleri nedeniyle kontrol programlarının yeterince uygulanamaması nedeniyle, daha ciddi seyirli enfeksiyonlarla karşılaşmakta, ekonomik kayıp artmakta ve sonuçta ciddi bir halk sağlığı problemi haline gelmektedir.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Eckert J, Conraths FJ, Tackmann K. Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? Int J Parasitol 2000; 30: 1283-94. [CrossRef]
2. Grosso G, Gruttadauria S, Biondi A, Marventano S, Mistretta A. Worldwide epidemiology of liver hydatidosis including the Mediterranean area. World J Gastroenterol 2012; 18: 1425-37. [CrossRef]
3. McManus DP, Thompson RC. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. Parasitology 2003; 127: 37-51. [CrossRef]
4. Thompson RC, McManus DP. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. Trends Parasitol 2002; 18: 452-7. [CrossRef]
5. Thompson RC, Lymbery AJ, Constantine CC. Variation in *Echinococcus*: towards a taxonomic revision of the genus. Adv Parasitol 1995; 35: 145-76. [CrossRef]

6. Somily A, Robinson JL, Miedzinski LJ, Bhargava R, Marrie TJ. Echinococcal disease in Alberta, Canada: more than a calcified opacity. *BMC Infect Dis* 2005; 5: 34. [\[CrossRef\]](#)
7. Pappaioanou M, Schwabe CW, Sard DM. An evolving pattern of human hydatid disease transmission in the United States. *Am J Trop Med Hyg* 1977; 26: 732-42.
8. Moro PL, Lopera L, Cabrera M, Cabrera G, Silva B, Gilman RH, et al. Short report: endemic focus of cystic echinococcosis in a coastal city of Peru. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71: 327-9.
9. Haag KL, Ayala FJ, Kamenetzky L, Gutierrez AM, Rosenzvit M. Livestock trade history, geography, and parasite strains: the mitochondrial genetic structure of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *J Parasitol* 2004; 90: 234-9. [\[CrossRef\]](#)
10. De la Rue ML, Dinkel A, Mackenstedt U, Romig T. New data on *Echinococcus* spp. in Southern Brasil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006; 48: 103-4. [\[CrossRef\]](#)
11. Jenkins DJ. Hydatid control in Australia: where it began, what we have achieved and where to from here. *Int J Parasitol* 2005; 35: 733-40. [\[CrossRef\]](#)
12. Jenkins DJ, Macpherson CN. Transmission ecology of *Echinococcus* in wild-life in Australia and Africa. *Parasitology* 2003; 127: 63-72. [\[CrossRef\]](#)
13. Harandi MF, Hobbs RP, Adams PJ, Mobedi I, Morgan-Ryan UM, Thompson RC. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Iran. *Parasitology* 2002; 125: 367-73.
14. Shimshony A. Epidemiology of emerging zoonoses in Israel. *Emerg Infect Dis* 1997; 3: 229-38. [\[CrossRef\]](#)
15. Bart JM, Abdukader M, Zhang YL, Lin RY, Wang YH, Nakao M, et al. Genotyping of human cystic echinococcosis in Xinjiang, PR China. *Parasitology* 2006; 133: 571-9. [\[CrossRef\]](#)
16. Yang YR, Rosenzvit MC, Zhang LH, Zhang JZ, McManus DP. Molecular study of *Echinococcus* in west-central China. *Parasitology* 2005; 131: 547-55. [\[CrossRef\]](#)
17. Sadjjadi SM. Present situation of echinococcosis in the Middle East and Arabic North Africa. *Parasitol Int* 2006; 55: 197-202. [\[CrossRef\]](#)
18. Buishi IE, Njoroge EM, Bouamra O, Craig PS. Canine echinococcosis in northwest Libya: assessment of coproantigen ELISA, and a survey of infection with analysis of risk-factors. *Vet Parasitol* 2005; 130: 223-32. [\[CrossRef\]](#)
19. Kandeel A, Ahmed ES, Helmy H, El Setouhy M, Craig PS, Ramzy RM. A retrospective hospital study of human cystic echinococcosis in Egypt. *East Mediterr Health J* 2004; 10: 349-57.
20. Bardonnnet K, Benchikh-Elfegoun MC, Bart JM, Harraga S, Hannache N, Haddad S, et al. Cystic echinococcosis in Algeria: cattle act as reservoirs of a sheep strain and may contribute to human contamination. *Vet Parasitol* 2003; 116: 35-44. [\[CrossRef\]](#)
21. Azlaf R, Dakkak A. Epidemiological study of the cystic echinococcosis in Morocco. *Vet Parasitol* 2006; 137: 83-93. [\[CrossRef\]](#)
22. Eckert J, Thompson RC. Echinococcus strains in Europe: a review. *Trop Med Parasitol* 1988; 39: 1-8.
23. Economides P, Christofi G. Evaluation of control programmes for echinococcosis/hydatidosis in Cyprus. *Rev Sci Tech* 2000; 19: 784-92.
24. Hirvela-Koski V, Haukialmi V, Kilpela SS, Nylund M, Koski P. *Echinococcus granulosus* in Finland. *Vet Parasitol* 2003; 111: 175-92. [\[CrossRef\]](#)
25. Sotiraki S, Himonas C, Korkoliakou P. Hydatidosis-echinococcosis in Greece. *Acta Trop* 2003; 85: 197-201. [\[CrossRef\]](#)
26. Daniel Mwambete K, Ponce-Gordo F, Cuesta-Bandera C. Genetic identification and host range of the Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Acta Trop* 2004; 91: 87-93. [\[CrossRef\]](#)
27. Garippa G, Varcasia A, Scala A. Cystic echinococcosis in Italy from the 1950s to present. *Parassitologia* 2004; 46: 387-91.
28. Garippa G. Updates on cystic echinococcosis (CE) in Italy. *Parassitologia* 2006; 48: 57-9.



# A Case of Giant Hyperkeratotic Cutaneous Leishmaniasis in the Penis

## Peniste Dev Hiperkeratotik Kutanöz Layşmanyazis Olgusu

Mehmet Gülüm<sup>1</sup>, Yavuz Yeşilova<sup>2</sup>, Murat Savaş<sup>1</sup>, Halil Çiftçi<sup>1</sup>, Ercan Yeni<sup>1</sup>, Fadile Yıldız Zeyrek<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Urology, Faculty of Medicine, Harran University, Şanlıurfa, Turkey

<sup>2</sup>Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Harran University, Şanlıurfa, Turkey

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Harran University, Şanlıurfa, Turkey

### ABSTRACT

*Cutaneous leishmaniasis* is a protozoan disease caused by leishmanias, which results in deformations of the skin. *Cutaneous leishmaniasis* is endemic in the southeastern parts of Turkey. *Cutaneous leishmaniasis* is the most common form and is often observed in open regions of the body. Involvement of the penis was rarely reported. In this paper, we present a case of a giant hyperkeratotic form of cutaneous leishmaniasis in the glans penis. (*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 53-4)

**Key Words:** *Cutaneous leishmaniasis*, glans penis, giant, hyperkeratotic

**Received:** 20.06.2012

**Accepted:** 05.12.2012

### ÖZET

*Kutanöz layşmanyazis* ciltte deformatelerle sonuçlanan, *Leishmania* türlerinin neden olduğu bir protozoal enfeksiyondur. Türkiye'nin güneydoğu bölgesinde endemik olarak görülmektedir. *Kutanöz layşmanyazis* en yaygın formdur ve sıklıkla vücudun açık bölgelerinde görülür. Penis tutulumu nadir bildirilmiştir. Bu yazıda, glans peniste *kutanöz layşmanyazis*'in dev hiperkeratotik formu ile seyreden bir olgu sunulmuştur. (*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 53-4)

**Anahtar Sözcükler:** *Kutanöz layşmanyazis*, glans penis, dev, hiperkeratotik

**Geliş Tarihi:** 20.06.2012

**Kabul Tarihi:** 05.12.2012

### INTRODUCTION

Leishmaniasis is a parasitic disease and a public health problem, which is caused by protozoa of the genus *Leishmania*. It is one of the leading conditions observed in people with skin disorders who travel from tropical countries (1). Leishmaniasis is categorized as cutaneous, mucosal, and visceral. Patients with leishmaniasis make up 90% of *Cutaneous leishmaniasis* (CL) cases (2). Localization of CL in the penis is rare. In this case, there was a giant hyperkeratotic type of CL in the glans penis.

### CASE REPORT

A 45-year-old male patient was admitted to our clinic with the complaint of a crusty scar on his penis, which had been present for approximately 4 years. The patient was not previously admitted to any health institution and had experienced difficulty in sexual intercourse over the previous 1 year. The patient had not previously received any treatment. Dermatological examination showed hyperkeratotic plates, which fully spread in the glans penis, with a slightly indurated base and sometimes seuro-hemorrhagic crust lesion





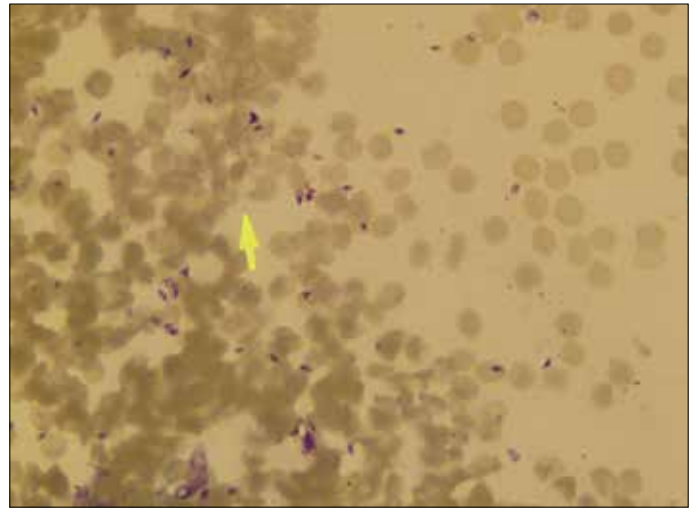
**Figure 1.** A non-healing hyperkeratotic plates, which fully spread in the glans penis

and fissure (Figure 1). Leishmaniasis smear was positive (Figure 2); other laboratory tests were normal. Benign and malignant skin tumors were excluded based on excisional skin biopsy collected from the hyperkeratotic lesion. The patient received intralesional meglumine antimoniate treatment (twice weekly, for 8 weeks) and the treatment continued with 20 mg/kg meglumine antimoniate. During the course of the treatment, an improvement was observed in the hyperkeratotic plates and shrinkage of the lesion. However, the patient was planned to receive a secondary 20 mg/kg meglumine antimoniate treatment, but did not attend subsequent controls.

## DISCUSSION

It is estimated that leishmaniasis affects approximately 12 million people in 90 countries. The World Health Organization included leishmaniasis as a serious tropical disease for research, along with malaria, leprosy, dengue fever, hemorrhagic fever, filariasis and trypanosomiasis (1). Şanlıurfa Province, in southeastern Anatolia, Turkey, is highly endemic for CL and has drawn considerable attention (3). CL is generally observed in open regions of the body such as the face, eyelids, forehead, hands, wrists and sometimes the legs. The literature includes several cases of CL localized in the penis (4-7). The majority of penis lesions are destructive, painless and slowly progressing ulcers that resemble scabies ulcers (6). Unlike previously reported cases, there was a giant and hyperkeratotic CL I in our patient.

The lesion of our patient was hyperkeratotic and underwent a long development period. Since CL is locally endemic, we suspected CL in this lesion, which had not healed for a long time. Smear tests were performed and found to be positive. Leishmaniasis culture negative. CL was considered after subsequent serologic evaluation. However, excisional biopsy was also conducted, to exclude skin malignancy due to localization, clinical outlook and long history.



**Figure 2.** The typical presentation of amastigotes in a smear preparation, stained with Giemsa

## CONCLUSION

*Cutaneous leishmaniasis* should be considered for lesions that do not heal for a long time in individuals who live or travel to regions that have a high risk of CL, no matter whether lesions are located in covered or non-covered areas. In addition, in non-recessing, long-term cases in the genital area, an extensive distinctive diagnosis would be considered; in particular, benign and malignant skin tumors should be excluded via laboratory tests and skin biopsies.

## Conflict of Interest

No conflict of interest was declared by the authors.

## REFERENCES

1. Ono M, Takahashi K, Taira K, Uezato H, Takamura S, Izaki S. *Cutaneous leishmaniasis* in a Japanese returnee from West Africa successfully treated with liposomal amphotericin. *Br J Dermatol* 2011; 38: 1062-5. [\[CrossRef\]](#)
2. Gontijo CM, da Silva ES, de Fuccio MB, de Sousa MC, Pacheco RS, Dias ES, et al. Epidemiological studies of an outbreak of *cutaneous leishmaniasis* in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop* 2002; 81: 143-50. [\[CrossRef\]](#)
3. Gurel MS, Ulukanligil M, Ozbilge H. *Cutaneous leishmaniasis* in Sanliurfa: epidemiologic and clinical features of the last four years (1997-2000). *Int J Dermatol* 2002; 41: 32-7. [\[CrossRef\]](#)
4. Masmoudi A, Boudaya S, Bouzid L, Frigui F, Meziou TJ, Akrouf F, et al. Penile sporotrichoid *cutaneous leishmaniasis*. *Bull Soc Pathol Exot* 2005; 98: 380-1.
5. Schubach A, Cuzzi-Maya T, Gonçalves-Costa SC, Pirmez C, Oliveira-Neto MP. *Leishmaniasis* of glans penis. *JEADV* 1998; 10: 226-8. [\[CrossRef\]](#)
6. Castro Coto A, Hidalgo Hidalgo H, Solano Aguilar E, Coto Chacón F. *Leishmaniasis* of the genital organs. *Med Cutan Ibero Lat Am* 1987; 15: 145-50.
7. Grunwald MH, Amichai B, Trau H. *Cutaneous leishmaniasis* on an unusual site: the glans penis. *Br J Urol* 1998; 82: 928. [\[CrossRef\]](#)





# Kronik Steroid Kullanan İmmüsuprese Hastada Strongyloidoza Bağlı Loeffler Sendromu

Strongyloidosis Caused Loeffler's Syndrome in an Immunosuppressed Patient Who Uses Chronic Steroid

Özlem Özen Ekmekci<sup>1</sup>, Meryem Tahmaz<sup>2</sup>, Semih Altıparmak<sup>3</sup>, Gülnar Gülaçtı<sup>2</sup>, A. Kadir Ergen<sup>2</sup>, A. Baki Kumbasar<sup>2</sup>, Sezer Sepetcioğlu<sup>3</sup>, Y. Ali Öner<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Haseki Eğitim Araştırma Hastanesi, Aile Hekimliği Kliniği, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Haseki Eğitim Araştırma Hastanesi, 3. Dahiliye Kliniği, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup>İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Parazitoloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

## ÖZET

*Strongyloides stercoralis* tüm dünyada on milyonlarca insanı enfekte eden bir insan barsak nematodudur. Ülkemizde nadiren görülmektedir. İmmün yetmezlikli hastalarda dissemine strongyloidosis enfeksiyonu gelişebilir. *S. stercoralis* hiperenfeksiyonu sıklıkla enterik organizmalar ile oluşan menenjit veya sepsise eşlik eder. Glukokortikoid tedavisi hiperenfeksiyonu tetikleyen en sık durumlardan birisidir fakat hematolojik maligniteler, malnutrisyon ve AIDS ile ilişkili vakalar bildirilmektedir. İvermektin gibi antihelmintik ajanlar hiperenfeksiyon sendromunu tedavide başarı ile kullanılmaktadır. Biz burada uzun süredir steroid kullanan ve akciğerde kitle öntanısı ile tetkik edilen 82 yaşındaki bir hastada saptanan *S. stercoralis* enfeksiyonu ve Loeffler sendromlu bir olguyu sunuyoruz. Hasta göğüs hastalıkları kliniğinde sağ akciğer üst lobda kitle görüntüsü nedeniyle tetkik edilirken, karın ağrısı, diare ve kaşıntı şikayetlerinin olması üzerine tarafımıza yönlendirilmişti. Periferik yaymasında %43 eozinofili görüldü. Gaitanın parazitolojik incelemesinde *Strongyloides stercoralis* larvaları görüldü. Hastada parazitoz ve loeffler sendromu olabileceği düşünüldü. Albendazol tedavisi sonrası hastanın şikayetlerinde önemli ölçüde gerileme izlendi. (*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 55-7)

**Anahtar Sözcükler:** *Strongyloides stercoralis*, kronik diyare, Loeffler sendromu

**Geliş Tarihi:** 11.01.2012

**Kabul Tarihi:** 12.01.2013

## ABSTRACT

*Strongyloides stercoralis* is an intestinal nematode of humans that infects tens of millions of people worldwide. It is a rarely reported parasitic infestation in Turkey. Disseminated strongyloidosis may develop in patients with immunodeficiencies. *S. stercoralis* hyperinfection is often accompanied by sepsis or meningitis with enteric organisms. Glucocorticoid treatment is one of the conditions most specifically associated with triggering hyperinfection, but cases have been reported in association with hematologic malignancy, malnutrition, and AIDS. Anthelmintic agents such as ivermectin have been used successfully in treating the hyperinfection syndrome. We report a case of *Strongyloides stercoralis* infection and Loeffler syndrome that developed in a patient who had systemic prednisolone. The patient in the pulmonary disease department clinic was examined because of right lung upper lobe mass image, and referred to us with complaints of abdominal pain, diarrhea and pruritus. Peripheral smear showed 43% eosinophilia. Parasitological examination of faeces showed larvae of *Strongyloides stercoralis*. Parasitosis and Loeffler's syndrome was considered in the patient. The patient's complaints declined significantly after treatment with albendazole. (*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 55-7)

**Key Words:** *Strongyloides stercoralis*, chronic diarrhea, Loeffler's syndrome

**Received:** 11.01.2012

**Accepted:** 12.01.2013

**Bu olgu, Aile Hekimliği Kongresi'nde (18-22 Mayıs 2011, Fethiye, Türkiye) poster olarak sunulmuştur.**

**Yazışma Adresi / Address for Correspondence:** Dr. Semih Altıparmak, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Parazitoloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye Tel: +90 212 614 49 85 E-posta: biosemihaltiparmak@gmail.com  
doi:10.5152/tpd.2013.14

## GİRİŞ

*Strongyloides stercoralis* (*S. stercoralis*) enfeksiyonlarına tropikal iklim kuşağında endemik olarak rastlanmaktadır (1). Bu enfeksiyon Türkiye gibi ılıman ülkelerde ise genellikle bağırsıklığı baskılanmış hastalarda sporadik olgular şeklinde görülmektedir. *S. stercoralis* daha nadir görülmesine rağmen diğer nematodlara göre daha sık klinik bulgu veren fırsatçı bir parazittir (2). Özcan ve arkadaşları (3) tarafından yapılan çalışmalarda *S. stercoralis* sıklığı %0.3 ile %0.9 arasında bildirilmiştir. *Enfeksiyon insanda, topraktaki filariform larvanın deriden girmesiyle başlamaktadır. Gelişme evresinde alveollere uğrayıp loeffler sendromuna neden olabilir. S. stercoralis'in neden olduğu ciddi strongyloidiasis, kontamine toprağa sahip ülkelere seyahat eden ve herhangi bir kortikosteroid tedavisi almış hastada temastan sonraki 30 yıl sonra bile ortaya çıkan yaşamı tehdit eden önlenebilir bir hastalıktır. Bu tanı nadir görülen gastrointestinal ve pulmoner semptomları olan ya da gram negatif basillerin sebep olduğu açıklanamayan sepsisli ve kortikosteroid tedavisi almış olan hastalarda da akla getirilmelidir* (4). Bu çalışmada ayırıcı tanıda mutlaka akılda tutulması gereken Strongyloidiasis enfeksiyonunun yol açtığı anemi, hipotalbüminemi, ödem, kronik diare ile Loeffler Sendromu olduğu düşünülen bir olgu sunulmuştur.

## OLGU SUNUMU

Seksen iki yaşında erkek hasta halsizlik, karın ağrısı, ödem ve ishal nedeniyle kliniğimize başvurdu. Tetkiklerinde anemi ve hipotalbüminemi saptanması üzerine tetkik amaçlı interne edildi. Hastanın ekim 2010 tarihinde göğüs hastalıkları kliniğince istenen Toraks bilgisayarlı tomografisi (BT)'nde sağ akciğer üst lob santral kesimde 22 mm boyutunda düzensiz infiltrasyon saptanmış. Anamnezinde 1 yıldır karın ağrısı ve 4-5 kez/gün kansız-mukussuz dışkılama şikayeti mevcuttu. Özgeçmişinde; 10 yıl önce kaşıntılı cilt lezyonları nedeniyle başvurduğu dermatoloji kliniğince büllöz pemfigoid tanısı ile steroid tedavi başlanmış. Hasta uzun süredir gün aşırı 4 mg metilprednizolon kullanıyordu. Fizik muayenede tüm vücutta yaygın, eritemli ve kaşıntılı lezyonlar saptandı. Kaşıntılı cilt lezyonları büllöz pemfigoidle uyumlu bulunmadı. Laboratuvar testlerinde ESH: 19 mm/saat, lökosit: 24900/mm<sup>3</sup>, Hb: 12.8 g/dL, Htc: 37% , MCV: 88 fL, PLT: 207000/mm<sup>3</sup>, AST: 26 U/L, ALT: 35 U/L, kreatinin: 1.2, albümin: 2.3 mg/dL, globülin 3.6 mg/dL, IgE: 2430 mg/dL (normal 0.01-100 mg/dL) idi. Periferik yaymada hipereozinofili (%43) saptandı, atipik hücre görülmedi. Batın ultrasonografisi ve Batın BT'sinde hastanın şikayetlerini açıklayacak patoloji saptanmadı. Toraks BT'de daha önce görülen kitle lezyonunda gerileme izlendi. Gaita kültüründe üreme olmadı. Gaita incelemesinde direkt bakıda parazit görülmedi. Gaita örneği İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Merkez Parazitoloji Laboratuvarı'nda nativlugol ve formaldehit eter çöktürme yöntemiyle tekrar incelendi. Kopro-parazitolojik bakıda bol miktarda *S. stercoralis* larvaları görüldü. Hastanın ekim 2010 tarihli BT' sinde rastlanan akciğer lezyonu Loeffler Sendromu olarak değerlendirildi. Hastaya tedavi olarak 3 gün Albendazol 400 mg tb başlanıp, 200 mg'la 21 güne tamamlandı. Takiplerinde şikayetleri gerileyen ve eozinofilisi düzelen hastanın gaita incelemesinde herhangi bir parazit gözlenmedi.

## TARTIŞMA

*S. stercoralis*, sıcak, nemli veya sulu toprakta çıplak ayakla dolaşan kişilerde sık görülmektedir. En çok kerpiç, tuğla ve kiremit yapım yerlerinde, maden ocaklarında, sulu tarım yapılan derelerde ve bataklık kıyılarında çıplak ayakla dolaşan kişilerin enfekte olduğu görülmektedir. *Larvalar otinfeksiyon veya sindirim*

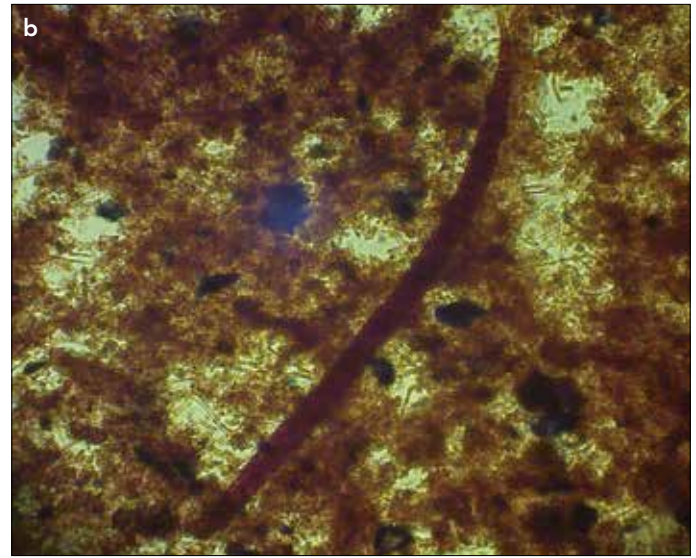
*yoluyla da alınabilir.* İnsan cildiyle temas sonrası filariform larva barsaklara yerleşmeden önce akciğerlere girer. Larva dolaşım yoluyla akciğerlere ulaşmakta, buradan alveol boşluğuna geçip trakea, farinks ve duodenuma gelmektedir. Bu gelişim iki hafta sürmekte ve dişi yumurta üretmeye başlamaktadır. Duodenum mukozasına girerek yumurtalarını bırakmasından sonra kısa sürede yumurtadan çıkan rhabditoid larva, barsak lümenine geçerek dışkı ile dışarı atılmaktadır (5, 6). Hastamızın Karadeniz Bölgesi'nde çıplak ayakla nemli toprak ile temas öyküsü mevcuttu.

Strongyloidiasis *S. stercoralis*'in erişkin şeklinin insan ince barsak çeperinde, larvalarının ise çeşitli organlarda parazitliği ile ortaya çıkan bir enfeksiyondur. Deriden larvalar içeri girerken kaşıntı, eritem, papül, püstül ve vezikül yapar. Duyarlı kişilerde deride görülen çizgi halindeki ürtikere "larva currens" denir. Hastamızda uzun süredir kaşıntı şikayeti mevcut idi. Antihistaminik ve steroid kullanmasına rağmen şikayeti devam ediyordu. Yapılan cildiye konsultasyonunda cilt lezyonlarının büllöz pemfigoid ile uyumlu olmadığı söylendi. Antiparaziter tedavi sonrasında kaşıntı şikayetinde gerileme izlendi.

Akciğer tutulumu olduğunda bronşit, nadiren pnömoni, öksürük ve hemoptizi yapabilir. Tüberküloz hastalarında görülmesi tabloyu alevlendirebilir. Sindirim sistemindeki en tipik belirti inatçı ishaldir. Bunun yanında karın ağrısı, zayıflama, ateş, kas ağrısı, bayılma ve hatta sepsis görülebilir (7). Hastamızda günde 4-5 kez inatçı ishali, karın ağrısı, kilo kaybı vardı. Kilo kaybı nedeniyle malignite yönünden araştırılan hastanın akciğer tomografisinde saptanan lezyonun primer akciğer tümörü olabileceği düşünülmüş, göğüs hastalıkları kliniğince takibe alınmıştı. Hastanın hipotalbüminemisi ve buna sekonder ödemi mevcut idi. Albümin düşüklüğünü açıklayacak belirgin alım eksikliği, kalp veya karaciğer yetmezliği bulgusu yoktu. İdrar albümin negatif idi. Albümin kaçığının parazitini sindirim sisteminde yaptığı tahribat sonucu olabileceği düşünüldü.

Kortikosteroid ile strongiloides arasındaki ilişki yaygın olarak bildirilmiştir. Kortikosteroid tedavi bu nematodla enfekte olma riskini 2-3 kat artırır (7, 8). Kortikosteroidler eozinofiller gibi strongyloides stercoralise karşı immün cevapta başlıca rol oynayan mediatörler üzerindeki supresif etkileri sayesinde parazitik enfeksiyonlara duyarlılığı arttırdıkları düşünülmektedir. Hastamızın uzun süredir gınaşırı 4 mg kronik steroid alımı mevcuttu. Turhan ve ark. (9) kısa süreli (3 gün 1 mg/kg/gün) steroid tedavisi almış genç bir hastada strongyloidoz ve Loeffler sendromu tablosu oluşabildiğini bildirmişlerdir. Gerek uzun süreli gerekse pulse kısa süreli steroid kullanımının (romatoloji, göz, KBB, göğüs hastalıkları, hematoloji, cildiye vb.) birçok klinikte yaygın bir tedavi olduğunu düşünürsek parazit enfeksiyonlarının bildirilen oranlardan çok daha yüksek olabileceğini tahmin edebiliriz. Bu hastaların parazitöz yönünden tetkik ve takipleri çoğu zaman göz ardı edilmektedir. Bu olguyu sunmamızın bir amacı da bu vakalar açısından bir farkındalık sağlamaktır.

Strongyloidiasis'in patognognomik bir klinik tablosunun olmaması kortikosteroid tedavisi altındaki hastalarda tanıyı daha da zorlaştırmaktadır. Karın ağrısı, dışkı sayısında artma, zayıflama, anemi, öksürük gibi birçok hastalıkta görülebilen nonspesifik klinik semptomlar mevcuttur. Periferik yaymada eozinofili saptanması parazitöz açısından uyarıcı olabilir. Bizim hastamızda halsizlik, zayıflama, anemi, akciğerde kitle görüntüsü nedeniyle uzun süre malignite öntanısı ile çok yönlü tetkik edilmiş ancak malignite saptanmamıştı. Eozinofilisinin olması parazit incelemesi konusunda ısrarcı olmamıza yol açmıştır.



**Resim 1a, b.** Nativ-lugol yöntemi ile yapılan dışkı incelemesinde saptanan *S. stercoralis*

Tedavi edilmeyen strongyloidiasisli immunsuprese hastalarda yoğun larva göçü görülebilir. Bunun sonunda peritonit ve gram negatif septisemi gelişerek sıklıkla ölüme yolaçabilir. "Hiperenfeksiyon" olarak bilinen bu sendrom en önemli komplikasyondur (7). Hiperenfeksiyon en sık uzun süreli steroid tedavisi alan lenfoma, lösemi, lepramatöz lepra hastalarında ve son yıllarda AIDS hastalarında bildirilmektedir (10).

Geçici olarak immünyetmezlik yapan nedenler arasında immunsupresif ilaçlar, malnutrisyon, maligniteler, radyoterapi, kemoterapi, diyabetik ketoasidoz ve alkolizm yer almaktadır (11). Pulmoner infiltrasyonların, periferik eozinofili ile birlikteliği, Loeffler's sendromu (basit eozinofilik pnömoni) olarak adlandırılır (12). Spesifik olmamasına rağmen gastrointestinal ve pulmoner semptomlar yaygındır. Hastamızdaki büllöz pemfigoidle uyumlu olmayan döküntüler, kronik diyare ve Loeffler Sendromunu düşündüren akciğer bulguları ve hipereozinofili parazitoz olabileceğini aklımıza getirdi. Hastadan gönderilen gaita örneklerinin direk mikroskopisinde parazit negatif olarak bildirildi. Literatürde Meksika ve Guatemala'ya seyahat öyküsü olan yirmi yedi yaşında bir kadında hastanın dönüşünden itibaren diyare öyküsü olduğunu bildirilmiş. Hastada ayrıca ateş ve deri döküntüsü olduğu, başka bir fiziki bulgu olmadığı, laboratuvar bulgularının çoğunun normal olmasının yanı sıra eozinofili ve pulmoner infiltrasyon gözlemlendiği belirtilmiştir. Hastadan üç gün üst üste alınan dışkı örneğinin incelenmesinde de hiçbir parazite rastlanmadığı, Baermann metodu ile *Strongyloides stercoralis* larvalarının saptandığı, uygulanan albendazol tedavisinde (400 mg/gün) hastanın durumunun genel olarak düzeldiği ve tedavi sonrası yapılan dışkı incelemesinde parazite rastlanmadığı bildirilmiştir (4). İmmünkompetan hastalarda larvanın araştırılması için direkt yaymadan en az dört kat daha etkili olan agar plak kültürünün en yüksek sensitiviteye (%96) sahip olduğu gösterilmiştir (13, 14). Tanıdan şüphelenildiğinde dışkıda parazit incelemesi yapılabilir. Biz de gaita incelemesi sonucunda *S. stercoralis* saptadık (Resim 1a, b).

İmmunsuprese hastalarda tedavide ilk olarak parenteral ivermektin önerilmektedir (11). Ancak ülkemizde olmaması nedeniyle alternatifi olan albendazol tedavisinin 3 gün 400 mg oral olarak başlanıp, 200 mg'la 21 güne tamamlanması önerilmektedir.

## SONUÇ

Özellikle immün suprese hastalarda açıklanamayan anemi, hipotalbüminemi, diyare, kaşıntılı cilt lezyonları, pulmoner semptom ve bulgular, hipereozinofili saptanırsa parazitolojik mutlakla akla getirilmeli ve uygun metodlarla incelenmelidir. Tanınması gereken parazitlerden bir tanesi de *Strongyloides stercoralis*'tir.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Saito A. Strongyloidiasis: epidemiology, clinical manifestations and new methods for diagnosis and treatment. J Infect Chemother 1995; 1: 98-106. [CrossRef]
2. Adenusi AA. Cure by ivermectin of a chronic, persistent, intestinal strongyloidiasis. Acta Trop 1997; 66: 163-7. [CrossRef]
3. Özcan K, Koltaş S, Tanrıverdi S, Yiğit S. Hatay'daki bazı ilkokullarda barsak parazitleri araştırması. Türkiye Parazit Derg 1994; 18: 461-8.
4. Fardet L, Generau T, Cabane J, Kettaneh A. Severe strongyloidiasis in corticosteroid-treated patients. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 945-7. [CrossRef]
5. Özbilgin A, Atambay M. Strongyloidiasis. İmmün Yetmezlikte Önemi Artan Parazit Hastalıkları. (Ed. Özcel MA). Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No: 12, 1995.s.121-35.
6. OK ÜZ. İmmün Sistemi Baskılananlardaki Barsak Parazitolojisi. ANKEM Derg 2006; 20: 177-81.
7. Nucci M, Portugal R, Pulcheri W, Spector N, Ferreira SB, de Castro MB, et al. Strongyloidiasis in patients with hematologic malignancies. Clin Infect Dis 1995; 21: 675-7. [CrossRef]
8. Davidson RA, Fletcher RH, Chapman LE. Risk factors for strongyloidiasis. A case control study. Arch Intern Med 1984; 144: 321-4. [CrossRef]
9. Turhan V, Çoban M, Öncül O. Kısa süreli steroid kullanan bir hastada saptanan strongyloidoz ve Loeffler sendrom tablosu. Türk Parazit Derg 2008; 32: 48-50.
10. Mahmoud AAF. Intestinal nematodes (roundworms). Mandell GL, Bennett JE, and Dolin R.(editors) Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, Pa. 2000.p.2938-43.
11. Lewthwaite P, Gill GV, Hart CA, Beeching NJ. Gastrointestinal parasites in the immunocompromised. Curr Opin Infect Dis 2005; 18: 427-35. [CrossRef]
12. Celandroni A, Cinquanta L, Lagrasta UE, Caprai S. Loeffler syndrome and Mycoplasma Pneumonitis. A case report. Minerva Pediatr 2002; 54: 243-7.
13. de Kaminsky RG. Evaluation of three methods for laboratory diagnosis of Strongyloides stercoralis infection. J Parasitol 1993; 79: 277-80. [CrossRef]
14. Sato Y, Kobayashi J, Shiroma Y. Serodiagnosis of strongyloidiasis. The application and significance. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1995; 37: 35-41. [CrossRef]



# Visceral Larva Migrans Presenting with Hypereosinophilia

## Hipereosinofili ile Başvuran Bir Pediatrik Olgu: Viseral Larva Migrans

Çiğdem Ecevit, Özlem Bağ, Canan Vergin, Aysel Öztürk

Clinic of Pediatric, Behçet Uz Children's Diseases and Surgery Training and Research Hospital, İzmir, Turkey

### ABSTRACT

Toxocariasis is an infection caused by the ingestion of larvae of the dog *Toxocara canis* or the cat *Toxocara cati*. A 2.5 year old boy was admitted to our clinics with fever, abdominal pain and loss of appetite. His medical history included geophagia (pica) and amebiasis infection. On admission, the physical examination revealed hepatomegaly and pallor. There was marked eosinophilia with leukocytosis, anemia, hypergammaglobulinemia and elevated serum Ig E titers. Toxocariasis was confirmed by anti-Toxocara IgG and Western blot. After 7 days of albendazole therapy, leukocytosis persisted and a second course of albendazole combined with prednisolone was administered. After 3 weeks, the eosinophil count had decreased and the patient showed resolution of hepatomegaly, but Toxocara serology remained elevated. (*Turkiye Parazitolojisi Dergisi* 2013; 37: 58-60)

**Key Words:** Toxocariasis, hypereosinophilia, treatment

**Received:** 19.12.2011

**Accepted:** 21.12.2012

### ÖZET

*Toksokariyazis*, kedi ya da köpeklerden Toksokara larvalarının alınması ile ortaya çıkan bir enfeksiyondür. İki buçuk yaşında bir erkek olgu, ateş, karın ağrısı ve iştahsızlık ile başvurdu. Özgeçmişinde pika öyküsü olan ve bir kez de amebiazis geçirme öyküsü olan olgunun, başvuru sırasında hepatomegalisi ve solukluğu saptandı. Lökositoz ve anemiye ek olarak belirgin eosinifili, hiperimmunglobulinemisi ve artmış serum IgE düzeyleri tespit edildi. Serolojik olarak anti Toxocara IgG ve Western blot yöntemi ile *Toksokariyazis* tanısı kondu. Yedi günlük Albendazol tedavisini takiben lökositozu süren olguda, ikinci kür Albendazol tedavisi steroid ile birlikte verildi. Üç haftanın sonunda, eosinofil sayısı, hepatomegalisi gerileyen olgunun, serolojik yüksekliği devam etmektedir. (*Turkiye Parazitolojisi Dergisi* 2013; 37: 58-60)

**Anahtar Sözcükler:** Toksokariyazis, hipereosinofili, tedavi

**Geliş Tarihi:** 19.12.2011

**Kabul Tarihi:** 21.12.2012

### INTRODUCTION

Human Toxocariasis is a syndrome caused by *Toxocara canis* and *Toxocara cati*. Young children contract Toxocara infections by ingesting embryonated eggs due to unsanitary play habits. There are three clinical syndromes associated with human toxocariasis: visceral larva migrans (VLM), ocular larva migrans (OLM), and covert toxocariasis (1). The classical presentation of VLM includes fever, hepatomegaly, abdominal pain, and headaches. The major laboratory find-

ing is leucocytosis with marked eosinophilia and elevation of IgE levels (2).

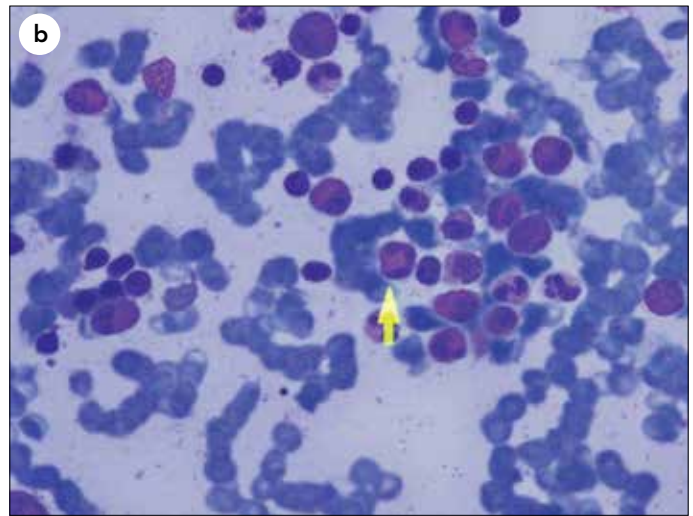
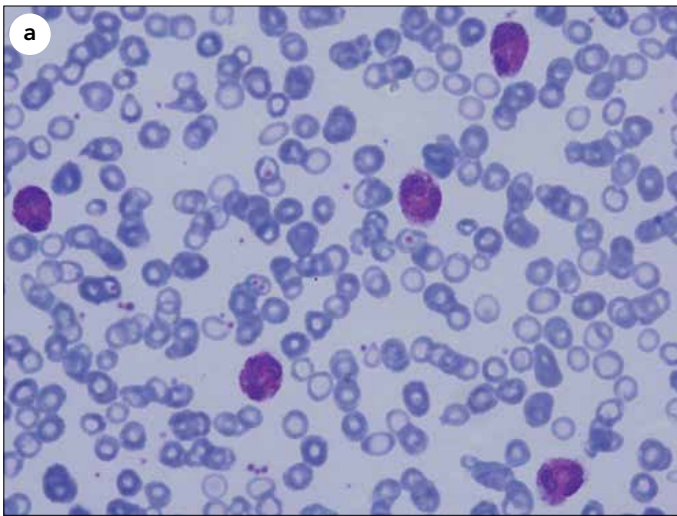
### CASE REPORT

A 2.5 year old boy was admitted to our clinics with fever, abdominal distention and abdominal pain. He was anorexic and had a history of pica. He was hospitalized because of amebiasis infection when he was two years old. On admission, he was febrile (38.5°C, axillary temperature) and he had hepatomegaly (liver edge 4-5cm below the right costal

**Address for Correspondence / Yazışma Adresi:** Dr. Özlem Bağ, Clinic of Pediatric, Behçet Uz Children's Diseases and Surgery Training and Research Hospital, İzmir, Turkey Phone: +90 232 489 56 56 E-mail: bagozlem78@yahoo.com

doi:10.5152/tpd.2013.15





**Figure 1a, b.** Morphological features in bone marrow

margin). Mild anemia (Hb: 9.4 g/dL) and marked leukocytosis (WBC:36200/mm<sup>3</sup>) with 83% eosinophils (absolute eosinophil count 32 300/μL) were present in laboratory findings. The peripheral blood smear showed marked eosinophilia without blasts. Liver function tests, serum glucose, and electrolytes were normal. Serum iron and ferritin were decreased (10 μgr/dL and 36 ngr/mL) confirming iron deficiency anemia. Serial stool examinations for ova and parasites were negative. His abdominal ultrasonography revealed hepatomegaly with hypoechoic areas. Serological testings for salmonella, brucella, and viral hepatitis were negative. Bone marrow aspiration revealed an abundance of mature eosinophils with no evidence of blast cells (Figure 1a, b). Total IgE count was 1307 kU/L (normal range: 0-100 kU/L) and IgG count was 1500 mg/dL. Serology for *Toxocara* revealed an elevated Ig G titer (+++++) by ELISA assay and Western blot (+). A diagnosis of VLM was established and albendazole (15 mg/kg/d) was administered for 7 days. After this therapy leukocytosis and eosinophilia persisted and a second course of albendazole combined with prednisolone (2 mg/kg/d) was administered for another 7 days. After 3 weeks of therapy with albendazole, the eosinophil count mildly decreased and hepatomegaly resolved. At the end of two months, the patient was well on physical examination but eosinophilia persisted.

## DISCUSSION

Toxocariasis is a multisystemic disease of parasitic zoonosis that occurs especially in young children (2). There are 3 major clinical syndromes associated with human toxocariasis; covert toxocariasis, ocular larva migrans and VLM (1). VLM is the most prevalent type of the disease and the classical presentation includes fever, hepatomegaly and eosinophilia (>500/mm<sup>3</sup>). The disease is common in toddlers with a history of pica and exposure to puppies (3, 4). Our patient, a 2.5 year old boy, was at a high risk because of the history of pica, unsanitary playing habits and tendency to place fingers in his mouth.

Eosinophilia commonly occurs in parasitic infestations and allergies. Parasitic infections are the most common causes of eosinophilia (5). A presumptive diagnosis was established in our patient

with leukocytosis, eosinophilia (>20%), fever and hepatomegaly, but the examination of stool samples for evidence of larvae was negative. Hypergammaglobulinemia, as a supportive laboratory finding, existed and serologic testing for *Toxocara* with high titers confirmed the diagnosis. The prevalence of positive toxocara serology in the general population establishes that most children and adults are asymptomatic, and physiological reactions to *Toxocara* infection probably depend on the host's immune response and the parasitic load (1, 6). When symptoms do occur, they are the result of migration of second stage *Toxocara* larvae through the body. In VLM, larvae migration incites inflammation of internal organs, and symptoms depend on the organ(s) affected (1). Hepatic involvement in VLM is common due to portal venous drainage of visceral organs. Gonzalez et al. (7) reported hypoechoic areas in the liver in 50% of their cases with Toxocariasis. Our patient had hepatomegaly, proved by ultrasound and accompanied by hypoechoic areas in the liver belonging associated with hepatic involvement. Some antihelminthic drugs are used but there is no consensus on the duration of the therapy. Adjunctive corticosteroids are recommended to limit inflammatory responses resulting from release of *Toxocara* antigens by dying parasites (8). Our patient showed symptomatic improvement after 14 days of Albendazole therapy, combined with corticosteroids in the second week, to suppress inflammation. He was in recovery at the end of two months but seropositivity for *T. canis* persisted. Glickman et al. (9) reported that periodic reinfection may cause repeated antigen stimulation and so antibodies may persist for long periods.

Several cases present with endocarditis, Henoch-Schonlein purpura or nephrotic syndrome (10-12). Although death is rare, long term morbidity is present with toxocariasis. Transmission can be minimized by public health measures.

## CONCLUSION

Visceral larva migrans (VLM) is usually suspected in a young child with geophagia and exposure to pets, with fever and hepatomegaly, with leukocytosis and marked eosinophilia. Infection with *Toxocara* species is probably far more common than is reported,

given the large stray dog population and areas of primitive sanitary conditions. Clinicians can avoid erroneous diagnosis and therapeutic interventions by considering this parasitic infection.

#### Conflict of Interest

No conflict of interest was declared by the authors.

#### REFERENCES

1. Kayes SG. Human toxocariasis and the visceral larva migrans syndrome. Correlative immunopathology. *Chem Immunol* 1997; 66: 92-124.
2. Arango CA. Visceral larva migrans and the hypereosinophilia syndrome. *South Med J* 1998; 91: 882-3. [\[CrossRef\]](#)
3. Figueiredo SD, Taddei JA, Menezes JJ, Novo NF, Silva EO, Cristovao HL, et al. Clinical epidemiological study of toxocariasis in a pediatric population. *J Pediatr* 2005; 81: 126-32. [\[CrossRef\]](#)
4. Fan CK, Hung CC, Du WY, Liao CW, Su KE. Seroepidemiology of *Toxocara canis* infection among mountain aboriginal school children living in contaminated districts in eastern Taiwan. *Trop Med Int Health* 2004; 9: 1312-8. [\[CrossRef\]](#)
5. Hayashi E, Tuda J, Imada M, Akao N, Fujita K. The high prevalence of asymptomatic *Toxocara* infection among schoolchildren in Manado, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005; 36: 1399-406.
6. Despommier D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular M aspects. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 265-72. [\[CrossRef\]](#)
7. González MT, Ibañez O, Balcarce N, Nanfita G, Kozubsky L, Radman N, et al. Toxocariasis with liver involvement. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2000; 30: 187-90.
8. Barisani-Asenbauer T, Maca SM, Hauff W, Kaminski SL, Domanovits H, Theyer I, et al. Treatment of ocular toxocariasis with albendazole. *J Ocul Pharmacol Ther* 2001; 17: 287-94. [\[CrossRef\]](#)
9. Glickman L, Schantz P. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiol Rev* 1981; 3: 230-50.
10. Abe K, Shimokawa H, Kubota T, Nawa Y, Takeshita A. Myocarditis associated with visceral larva migrans due to *Toxocara canis*. *Intern Med* 2002; 41: 706-8. [\[CrossRef\]](#)
11. Hamidou MA, Gueglio B, Cassagneau E, Trewick D, Grolleau JY. Henoch-Schonlein purpura associated with *Toxocara canis* infection. *J Rheumatol* 1999; 26: 443-5.
12. Shetty AK, Aviles DH. Nephrotic syndrome associated with *Toxocara canis* infection. *Ann Trop Paediatr* 1999; 19: 297-300. [\[CrossRef\]](#)



# Dev Böbrek Kistik Ekinokok Hastalığı: Olgu Sunumu

## Giant Renal Cystic Echinococcosis: Case Report

Cavit Ceylan<sup>1</sup>, Öner Odabaşı<sup>1</sup>, T. Ahmet Serel<sup>1</sup>, Özkan Baytok<sup>1</sup>, Tülay Temuçin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Türkiye Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Üroloji Kliniği, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Türkiye Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, Ankara, Türkiye

### ÖZET

Ekinokokkosis dünyanın pek çok yerinde endemiktir. Ekinokokkosis, insan vücudunun pek çok yerinde görülebilmese rağmen izole böbrek tutulumu nadir olup vakaların yalnızca %2-4'ünde görülebilir. Renal ekinokokkosis hastalığının tanısını koyduracak spesifik klinik semptom ya da bulgu yoktur. Rutin kan testleri eozinofili dışında normaldir ki bu bulgu vakaların %20'sinde bulunur. Radyolojik çalışmalar preoperatif tanıda önemli bir yer tutmaktadır. Ama intravenöz pyelografi ya da direkt ürografide spesifik bir bulgu yoktur. Ultrasonografi ve bilgisayarlı tomografide ekinokokkosis'e ait her zaman spesifik bir bulgu olmayabilir. Ekinokokkosis hastalığı özellikle endemik olan ülkelerde solid organlarda ya da diğer anatomik yerlerdeki kistik lezyonların ayırıcı tanısında düşünülmelidir. Biz bu vakada nefrektomi ile tedavisini yaptığımız, komplike kisti taklit eden izole dev renal kistik ekinokokkosisli bir hastayı sunduk. (*Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2013; 37: 61-3)

**Anahtar Sözcükler:** Dev kistik ekinokok, renal kist, nefrektomi

**Geliş Tarihi:** 03.07.2011

**Kabul Tarihi:** 28.11.2012

### ABSTRACT

Echinococcosis is endemic in many parts of the world. Although echinococcosis can be present in all parts of the human body, urinary tract involvement develops in only 2-4% of all cases, and isolated renal cysts are extremely rare. There are no specific clinical symptoms or signs that will reliably confirm the diagnosis of renal echinococcosis. Routine blood tests are generally normal except for eosinophilia, which is found in only 20% of the cases. Radiological studies have a more important place in the preoperative diagnosis of renal hydatid disease. However, there is no specific sign on plain urography or intravenous urography, and ultrasound or computed tomography cannot always show a echinococcosis as a specific lesion. Echinococcosis should be included in the differential diagnosis of cystic lesions in solid organs or other anatomic sites, especially in endemic countries. We presented a patient with isolated giant renal cystic echinococcosis mimicking a complicated cyst who was treated successfully with nephrectomy. (*Turk Parazitolojisi Dergisi* 2013; 37: 61-3)

**Key Words:** Giant cystic echinococcosis, renal cyts, nephrectomy

**Received:** 03.07.2011

**Accepted:** 28.11.2012

### GİRİŞ

Kistik ekinokokkosis (KE) paraziter bir hastalık olup dünyanın çeşitli bölgesinde endemik bir tablo oluşturmaktadır. Hastalık *Ekinokokus Granulosus* ve *Ekinokokus Multilokularis* parazitlerinin ara konakçı hayvanlardan insanlara geçişiyle meydana gelmektedir (1). KE hastalığı esas olarak karaciğer ve akciğerde görülmekle birlikte %2-4 oranında böbrekleri de tutabilmektedir (2, 3). Biz radyolojik olarak komplike kisti

taklit eden dev renal ekinokokkosis olgusunun, literatüre katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

### OLGU SUNUMU

Elli iki yaşında evli resmi bir kurumda çalışan erkek hasta, bir yıldır zaman zaman sol lomber bölgede müphem ağrı nedeniyle kliniğimize başvurdu. Fizik muayenede sol üst kadranda ele gelen immobil kitle tespit edildi. Laboratuvar tahlilinde kan ve idrar testlerinde özellik saptanmadı. Yapılan ultra-

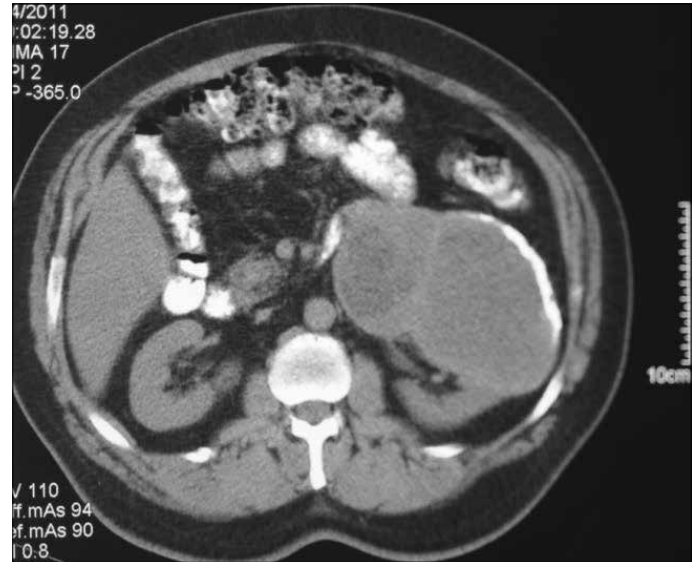


sonografide; sol böbrek üst polde yaklaşık 150x120 mm boyutlarında ufak kistik alanlar içeren solid kitle lezyonu izlendi. Abdomen Bilgisayarlı tomografide (BT) sol böbrek orta üst pol kesiminden kaynaklanan yaklaşık 15x12x12 cm boyutlarında ekzofitik, yer yer cidar ve santral kalsifikasyon içeren kistik nekrotik, kitle lezyonu izlendi. Kitle pankreas gövde ve kuyruğu, mide major kurvatur ve splenik hilus ile temas gösteriyordu. Abdomen Magnetik Resonans'da (MR) sol böbrek orta kesim renal pelvis düzeyinden orijin alan ekzofitik uzanımlı T1 ağırlıklı sekanslarda hipointens, T2 ağırlıklı sekanslarda hiperintens, kontrast madde enjeksiyon sonrası periferik kontrastlanması olan, yaklaşık 15x15 cm boyutlarında kitle lezyonu izlendi (Resim 1). Hastaya serolojik test yapılmadı. Hasta komplike kist ön tanısıyla operasyon için yatırıldı ve gerekli bilgilendirilmiş onam formu alındı. Genel anestezi altında chevron insizyonla işlem uygulandı. Kitle, böbreği posterior-inferiora itmiş, medialde kolon, pankreas başına ve üst posteriora dalağa yapışmıştı. Böbrek parankimi ve toplayıcı sistemi ile sınırı net ayırt edilemeyen yaklaşık 17 cm boyutunda olan kitle, böbrekle birlikte eksize edildi (Resim 2). Patoloji spesmeninde makroskopik olarak böbrek dokusu yanında, düzgün sınırlı tümöral kitle izlendi. Yapılan kesitlerde tümörün böbrek dokusu ile ilişkili olduğu, krem/pembe renkli membranöz yapılar ve nekrotik alanlar içerdiği görüldü (Resim 3). Mikroskopik incelemede, kesitler hematoksilen eozin ile boyandı ve ışık mikroskopisi ile incelendi. Kesitlerde granülasyon dokusunun çevrelediği, özellikle eozinofilik lamellerden oluşan kutikül tabakası görüldü (Resim 4a, b: ok başı ve ince ok). Histopatolojik bulgular eşliğinde olgu KE olarak değerlendirildi.

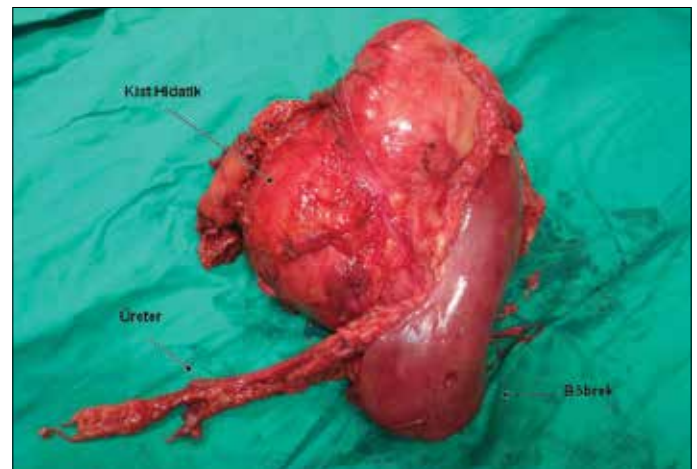
## TARTIŞMA

Kistik ekinokokkosis çoğunlukla karaciğer ve akciğeri tutmaktadır. Karaciğer tutulumu olmadan diğer organları tutması oldukça nadirdir. Böbrek KE'u genellikle nonspesifik abdominal ve lomber bölgede ele gelen büyük bir kitle ile birlikte (2, 3). Hastalık, karaciğer ve akciğer dışında %2-4 oranında böbrekleri de tutabilmektedir (4, 5). Böbrek tutulumu tek başına olabileceği gibi, diğer komşu organlar ile birlikte de olabilir. *Echinococcus granulosus* ve *multilocularis*'un sebep olduğu KE genitoüriner sistemdeki tutulum yeri, hemen hemen daima böbrek iken, çok nadir olarak prostat, mesane ve epididimal tutulumda gözlemlenebilir. *Echinococcus multilocularis*'in oluşturduğu KE diğer parazite göre, daha agresiftir. Komşu organlara invazyon göstermesi sebebiyle, cerrahi işlem sırasında çıkarılması da oldukça zordur (1). Bizim vakamızın cerrahi eksizyon sırasında çevre dokulara ileri derecede yapışıklık gösteren agresif ve böbrek dokusu ve çevre dokulara penetran bir özelliği olmakla birlikte histopatolojisi *Echinococcus Granulosus* olarak değerlendirilmiştir. Hastalık genellikle lomber bölgede müphem bir ağrıya neden olabilir. Bazen de hastaların idrarında "grape skin" olarak adlandırılan beyazımsı, üzüm benzeri skoleksler gözlemlendiği gibi lomber bölgede palpable kitle de görülebilir. Abdomen BT ile radyolojik tanı, ultrasonografiden daha iyi konur. Kist USG ve BT'de sıklıkla etrafı kalsifiye olarak tanımlanır (4). Öte yandan bizim olgumuzda sonografik incelemede kistin tariflemesinde çelişki gözlemlenmiştir. MR ise kistin anatomik konfigürasyonunu daha iyi tanımlayabilir. İntravenöz urogram, kistin renal toplayıcı sistem ile bağlantısını ekarte etmek için kullanılabilir (6). KE'nin serolojik tanısında Casoni Deri (intra dermal-ID) Testi, Komplement Birleşmesi

(Weinberg reaksiyonu), İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), İndirekt Hemagglütinasyon Testi (IHAT), Western Blot (WB) gibi pek çok test kullanılmışsa da bu testlerden tek bir testin kullanımı, bazen yetersiz kalabilmektedir. KE'de serolojik testlerin birlikte kullanılması, tanı koymada duyarlılığını artırmaktadır. Bu nedenle en az iki testin birlikte kullanılmasının daha güvenilir olacağı bildirilmiştir. Ayrıca uygulanması nispeten zor olan WB yönteminin IFAT ve IHAT yöntemleri ile birlikte kullanılmasının duyarlılığı çok daha arttıracığı ortaya konmuştur (5, 7). Kist tedavisinde; perkütan aspirasyon, enjeksiyon ve re-aspirasyon (PAIR-PD) ile perkütan drenaj yöntemi denebilir, ancak tecrübe gerektiren bir işlemdir. Ama bu yöntem unilokuler kist vakalarının sadece %70'de başarı sağlayabilmektedir (8). Bu yüzden renal KE vakalarında cerrahi kaçınılmaz ve başlıca tedavi yöntemidir. Cerrahi teknik, hekimin tecrübesine, kist hacmine ve lokalizasyonuna bağlı olarak değişmekle birlikte, son zamanlarda çok az vakada da kistin retroperitoneal eksizyonu ve laparosko-



Resim 1. Sol böbrek üst orta polde yerleşim gösteren komplike kistin kontrastlı bilgisayarlı tomografi (BT) görüntüsü



Resim 2. Sol böbrek rezeksiyon materyali. Böbrek üst polde 17 cm çapında kitle lezyon



**Resim 3.** Patolojik piyesin makroskopik görüntüsü

pik nefrektomi gündeme gelmiştir (9, 10). Ama bizim vakamızda, kistin unblok çıkarılmasının olanaksızlığı, çevre dokulara yapışıklık göstermesi, böbrek ve komşu organları komprese edecek düzeyde agresif yapısından dolayı; biz açık cerrahi operasyonu tercih ettik. Renal KE olgularında cerrahi yöntem olarak, kistin total veya wedge rezeksiyonunu takiben marsupializasyon, ya da peri kistik alanın kapitonaj yöntemi ile onarılması yapılabilir. Öte yandan vakaların %75'i renal koruyucu yöntem ile parsiyel nefrektomiden fayda görebilir. Parsiyel eksizyon işlemi, kistin içine skoleksidal ajan (%20 hipertonic saline, chlorhexidine, %80 ethanol, %0.5 cetrimide, %3 H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> veya %0.5 silver nitrate) uygulandıktan sonra yapılmalıdır (5). Eğer cerrahi sırasında kist rüptüre olursa operasyon antihistaminik ve steroid tedavisi altında yapılmalıdır (11). Biz olgumuzda antihelmintik tedaviyi cerrahi yayılım olmadığından ve karaciğer toksisitesi nedeni ile uygulamadık.

## SONUÇ

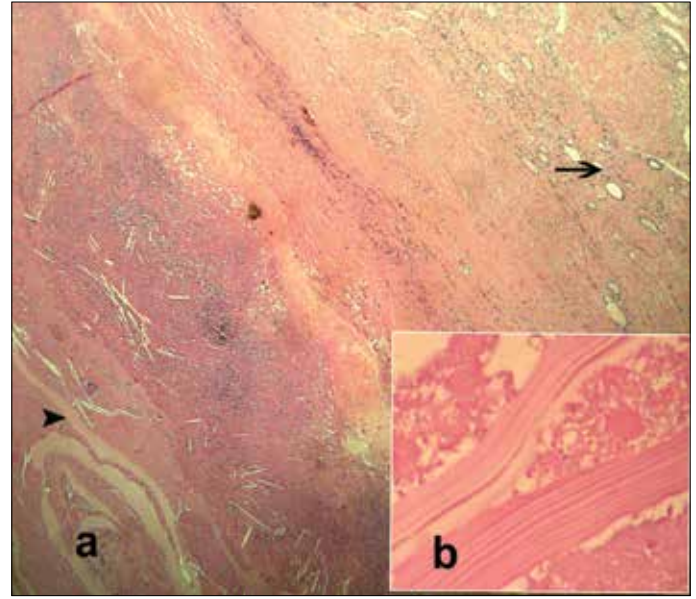
Üriner sistemin KE hastalığının genel klinik görünümü, bazen preoperatif tanı olarak konulması için yeterli olmamaktadır. Kesin tanı koymada çelişki yaşanan komplike septalı ve kalsifiye renal kistlerde, serolojik labratuvar testlerini göz ardı etmemek gerekir. Tanısı preoperatif konulan KE vakalarında eğer kistin natürü agresif değilse, mümkün olduğunca renal koruyucu cerrahi ile kistin komple çıkarılması düşünülmelidir.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir

## KAYNAKLAR

1. Buckley RJ, Smith S, Herschon S, Comisarow RH, Barkin M. Echinococcal disease of the kidney presenting as a renal filling defect. J Urol 1985; 133: 660-1.



**Resim 4 a, b.** Patolojik piyesin mikroskopik görüntüsü (İnce ok: böbrek tubuli ve kutikul tabaka)

2. Kaplan M, Aktöz T, Celik AD, Atakan IH, İnci O. Atypical renal and gluteal Hydatid cysts: Report of two cases. Fırat Tıp Dergisi 2009; 14: 297-9.
3. Kulacıoğlu IH, Oruç MT, Kocaerkek Z, Seckin S, Coşkun F. Hidatik kistlerin nadir yerleşimleri: 77 olgunun değerlendirilmesi. Turk J Gastroenterol 2001; 12: 299-302.
4. Gogus C, Safak M, Baltacı S, Turkozmez K. Isolated renal hydatidosis: Experience with 20 cases. J Urol 2003; 169: 186-9. [CrossRef]
5. Zmerli S, Ayed M, Horchani A, Chami I, El Ouakdi M, Ben Slama MR. Hydatid cyst of the kidney: diagnosis and treatment. World J Surg 2001; 25: 68-74. [CrossRef]
6. Vargas-Serrano B, Ferreiro-Arguelles C, Rodriguez-Romero R, Marcos del Rio N. Imaging findings in renal hydatid disease. Eur Radiol 1997; 7: 548-51. [CrossRef]
7. Çetinkaya Ü, Hamamcı B, Kaya M, Gücüyetmez S, Kuk S, Yazar S, et al. Kistik ekinokokkozis ön tanılı hastalarda anti-Echinococcus granulosus antikorlarının araştırılması Türkiye Parazitoloji Dergisi 2012; 36: 57-60. [CrossRef]
8. Cushieri SA, Steele RJ, Moosa AR. Treatment of Hydatid Cyst, Essential Surgical Practice, 4th ed. Arnold Publishers, Oxford. Butterworth-Heineann; 2000.p.350.
9. Shah K, Ganpule A, Desai M. Isolated renal hydatid cyst managed by laparoscopic transperitoneal nephrectomy. Indian J Urol 2009; 25: 531-3. [CrossRef]
10. Khan M, Sajjad Nazir S, Ahangar S, Farooq Qadri S, Ahmad Salroo N. Retroperitoneal laparoscopy for the management of renal hydatid cyst. Int J Surg 2010; 8: 266-8. [CrossRef]
11. Horchani A, Noura Y, Kbaier I, Attyaoui F, Zribi AS. Hydatid cyst of the kidney. A report of 147 controlled cases. Eur Urol 2000; 38: 461-7. [CrossRef]



# Hidatik Hastalıkta Atipik Prezantasyon: Hemoptizi

## Atypical Presentation in Hydatid Disease: Hemoptysis

Yasemin Özsüreççi<sup>1</sup>, Aslınur Özkaya Parlakay<sup>1</sup>, Ali Bülent Cengiz<sup>1</sup>, Melda Çelik<sup>1</sup>, Eda Karadağ Öncel<sup>1</sup>, Ateş Kara<sup>1</sup>, Nural Kiper<sup>2</sup>, Güzin Cinel<sup>2</sup>, Berna Oğuz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Göğüs Hastalıkları Ünitesi, Ankara, Türkiye

<sup>3</sup>Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Radyoloji Ünitesi, Ankara, Türkiye

### ÖZET

Hidatik hastalık *Echinococcus granulosus*'un larva evresinin yol açtığı enfeksiyon hastalığıdır. Bu hastalık tanıda zorluk yaratacak şekilde çeşitli atipik formlarla başlayabilmektedir. Bu makalede nadir bir başvuru komplikasyonu olan hemoptizi şikayeti olan hastada hidatik hastalık tanısının akılda tutulmasının gerekliliği vurgulanmak istenmiştir. (*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 64-8)

**Anahtar Sözcükler:** Hidatik hastalık, hemoptizi, çocuk

**Geliş Tarihi:** 03.04.2012

**Kabul Tarihi:** 28.11.2012

### ABSTRACT

Hydatid disease is an infectious disease caused by the larval stage of *Echinococcus granulosus*. It constitutes a major public health problem worldwide. This disease may present in several atypical forms, causing difficulty in diagnosis. In this article it is stressed that the diagnosis of hydatid disease should be kept in mind in patients presenting with hemoptysis, although this presentation is very rare. (*Turkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 64-8)

**Key Words:** Hydatid disease, hemoptysis, child

**Received:** 03.04.2012

**Accepted:** 28.11.2012

### GİRİŞ

Hidatik hastalık *Echinococcus granulosus*'un neden olduğu parazitik bir enfeksiyondur. Akdeniz bölgesi ülkelerinde hala endemiktir (1). En sıklıkla tutulan organlar akciğer ve karaciğerdir (2). Hastalığın klinik belirtileri kistin lokalizasyonu ve büyüklüğüne bağlı olup küçük ve/veya kalsifiye kistler ömür boyu asemptomatik kalabilmektedirler (3). Hatta akciğer hidatik kistleri çok büyük çaplarda bile özellikle de çocuklarda asemptomatik seyredebilmektedir (4). Çok büyük kistler ise semptomatik seyredebilmekte ve öksürük, hemoptizi ve göğüs ağrısına neden olabilmektedir.

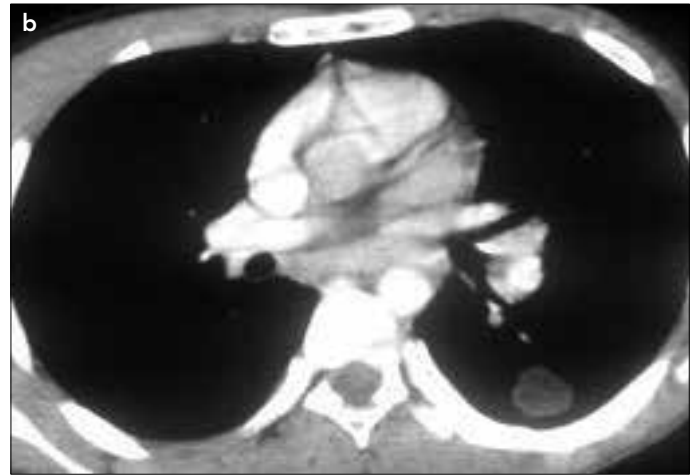
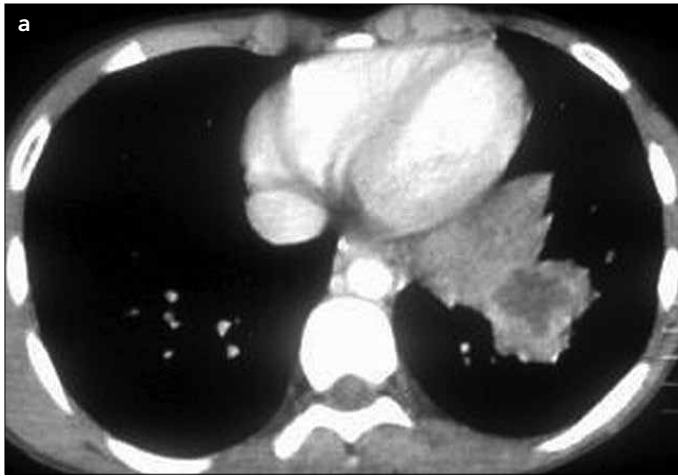
Sunulan olguların bir kısmı direk hemoptizi şikayetiyle izlendikleri dış merkezlerden Hacettepe Üniversitesi Çocuk

Enfeksiyon Polikliniği'ne tüberküloz, pnömoni ve apse ön tanılarıyla yollanıp izlemlerinde akciğerde lokalize kist hidatik tanısı almış, bir kısmı ise kist hidatik tanısıyla merkezimize sevk edildikten sonraki izlemlerinde hemoptizi şikayeti gelişmiştir. Bu olgular, özellikle ülkemiz gibi bu hastalığın yaygın olduğu toplumlarda hemoptizi ile başvuran hastalarda ayırıcı tanıda hidatik kistin mutlaka göz önünde bulundurulması gerektiğine dikkat çekmek amacıyla sunulmuştur.

### OLGU SUNUMLARI

#### Olgu 1

On dört yaşında erkek hasta 1 aydır olan öksürük şikayetiyle dış merkeze başvurmuş oral antibiyotik tedavisine rağmen şikayetinin düzelmemesi nedeniyle çekilen toraks tomogra-



**Resim 1.** Kontrastlı aksiyel toraks BT tetkikinde mediasten penceresinde sol akciğer alt lobda ortası hipodens kistik veya nekrotik özellikle konsolidasyon alanı izlenmektedir (a). Ayrıca sol akciğer alt lob süperior segment posteriorda da yuvarlak kistik lezyon izlenmektedir (b)

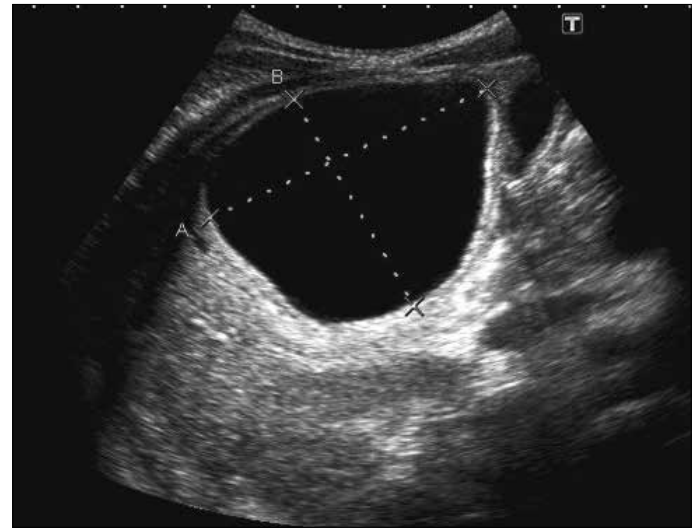
fisinde tüberküloz, *S. aureus* pnömonisi veya abse şüphesi saptanması nedeniyle Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'ne sevk edilen hastanın, son 10 günde iki kez hemoptizi olması nedeniyle hastaneye yatırıldı. Bilgisayarlı tomografide (BT) sol akciğer alt lob süperior segmentte kistik lezyon ve ayrıca daha inferior kesitte enfekte kist hidatik veya nekrotizan pnömoniyle uyumlu olduğu düşünülen başka bir konsolide alan saptandı (Resim 1). Abdominal ultrasonografide (US) tip 1 kist hidatik lezyonu olması (Resim 2), ppd negatifliğinin, total IgE 196 IU/mL (0-52), spesifik Ekinokok antikorunu 19.5 Ku/L (class 4) olması nedeniyle hastaya sulbaktam-ampisilin, teikoplanin ve albendazol başlandı, 10 günlük tedavinin ardından kist hidatik eksizyonu yapıldıktan sonra hasta albendazol tedavisiyle taburcu edildi.

### Olgu 2

Sekiz yaşında kız hasta 1 aydır aralıklı olan ateş, öksürük şikayetiyle dış merkeze başvurmuş, oral antibiyotik tedavisini 3. gündeyken hemoptizi olması nedeniyle, yatırılarak çekilen BT'de sol akciğer üst lob posterior segmentte ve sol alt lob anterior bazal segmentte iki adet düzgün konturlu lezyonu saptanmış (Resim 3), intravenöz antibiyotik tedavisi verilmiş, kanlı balgam şikayetinin tekrarlaması nedeniyle merkezimize sevk edilmişti. Antibiyotik tedavisinden sonra çekilen kontrol akciğer grafisinde sol akciğer üst zon lateralde ve alt zonda düzgün konturlu radyopasiteleri sebat etmekte idi (Resim 4). Yapılan tetkiklerinde *E. granulosus* mikro ELISA sonucu 1/1280 (0-1/160), ekinokok spesifik antijeni 16.3 Ku/L (class 3), IgE düzeyi 412 IU/mL (0-52), abdominal US'si normal olan hastaya enfekte kist hidatik tanısıyla 10 günlük sulbaktam-ampisilin, vankomisin tedavisinden sonra kist eksizyonu yapıldı.

### Olgu 3

Altı yaşında kız hasta 1 yıl önce olan 2-3 hafta süren kuru öksürük nedeniyle dış merkeze başvurmuş orada yapılan tetkiklerinde sağ akciğerde nodül şüphesi olması nedeniyle sevk edilmiş. Toraks BT'sinin değerlendirilmesiyle hastada sağ akciğer alt lobda kistik lezyon, sağ lat lob süperior segmentte ise kaviter lezyon saptanmış ve lezyonun enfekte olduğu düşünülmüştür (Resim 5). Abdominal US'si normal olan hastanın total IgE düzeyi



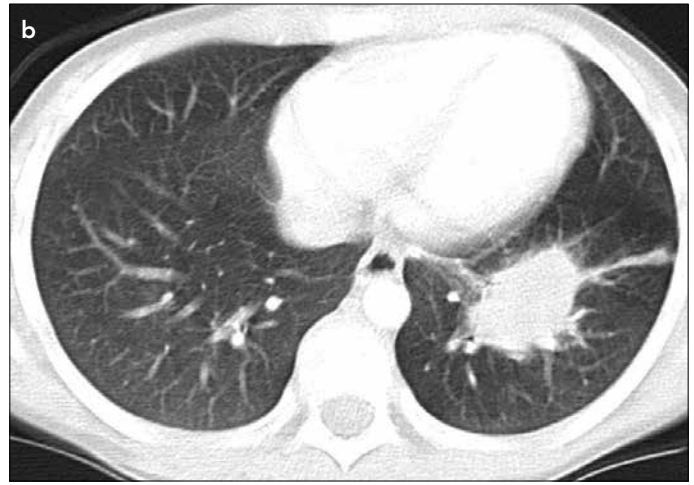
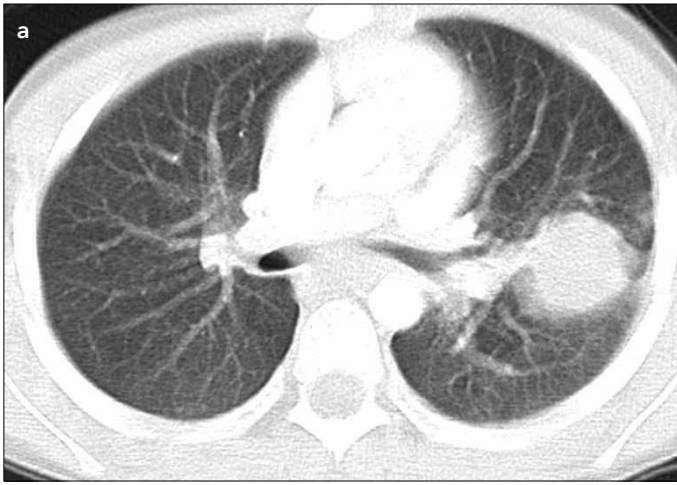
**Resim 2.** Karaciğer parankimi içerisinde tip 1 kist hidatik ile uyumlu lezyon izlenmektedir

193 IU/mL (0-52), ekinokok indirekt hemaglütinasyon testi negatif olarak saptanmış, hastaya kist hidatik tanısıyla prazikuantel, albendazol tedavisi 6 ay süreyle verilmiş, daha sonra albendazolle tedaviye devam edilmiştir. Hasta 2 gün önce 3 kez olan hemoptizi şikayetiyle başvurusunda yatırılmış, abdominal US'si tekrarlanmış, normal olduğu görülmüş, 10 gün sulbaktam-ampisilin, teikoplanin tedavisini takiben hastaya kist eksizyonu uygulanmıştır.

### Olgu 4

Dokuz yaşında kız hasta 1 ay önce başlayan öksürük şikayetiyle dış merkeze başvurmuş, sol akciğerde opasite saptanması nedeniyle pnömoni tanısıyla antibiyotik tedavisi başlanmış, Toraks BT'de sol akciğerde iki adet büyük kistik lezyon ve inceleme alanına giren karaciğer içerisinde de hipodens, kist ile uyumlu lezyon saptanmış (Resim 6). Abdominal US'de karaciğer sol lobda ondulan konturlu tip 1 kist hidatik saptanması nedeniyle cerrahi girişim amacıyla merkezimize albendazol başlanarak sevk edilmiş. İndirekt hemaglütinasyon testi 1/1280 saptanan hasta





**Resim 3.** Kontrastlı aksiyel toraks BT tetkikinde parankim penceresindeki kesitlerde sol akciğer üst lobda (a) ve sol akciğer alt lobda (b) nodüler tarzda konsolidasyon alanları izlenmektedir. Sol alt lobdaki lezyondan plevraya doğru uzanan lineer atelektazi görülmektedir



**Resim 4.** Antibiyotik tedavisinden sonra çekilen kontrol PA akciğer grafisinde sol üst zon lateralde ve sol alt zonda kalp üzerine süperpoze düzgün konturlu radyoopasiteler sebat etmektedir

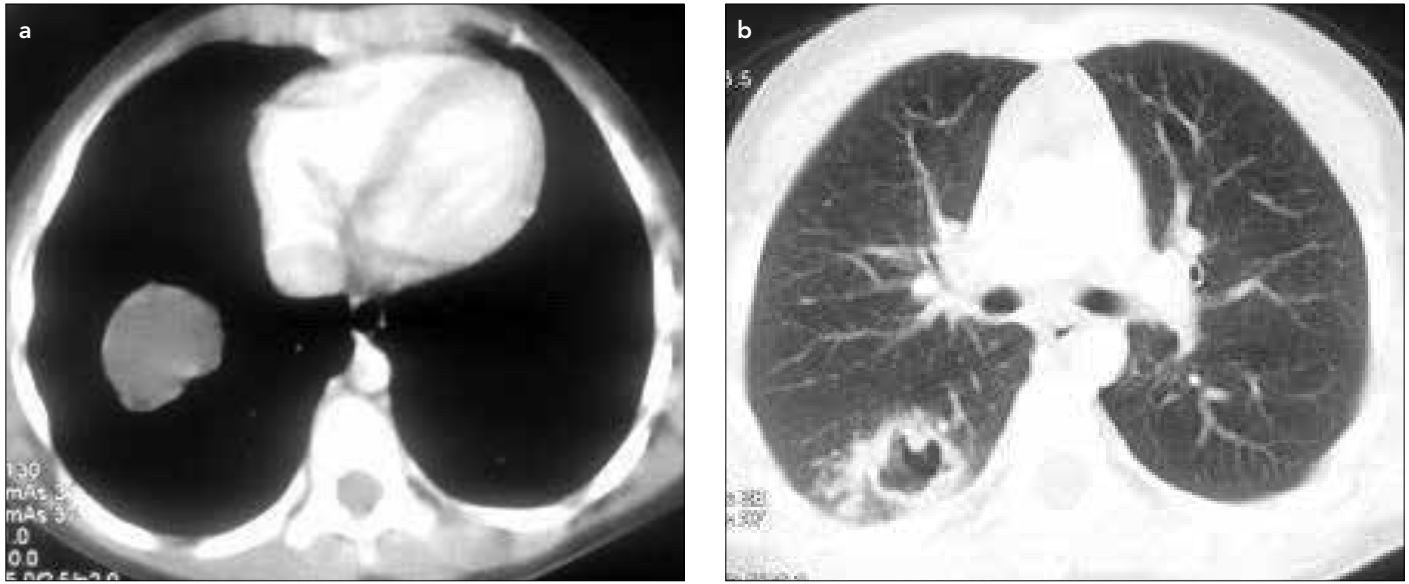
operasyon planıyla takip edilirken hemoptizi şikayetiyle yeniden merkezimize başvurdu, çekilen akciğer grafisinde daha önceki grafiye göre belirgin fark saptanmadı (Resim 6), hastaya intravenöz antibiyotik tedavisi sonrası (sulbaktam-ampisilin, amikasin) kistektomi planlandı.

## TARTIŞMA

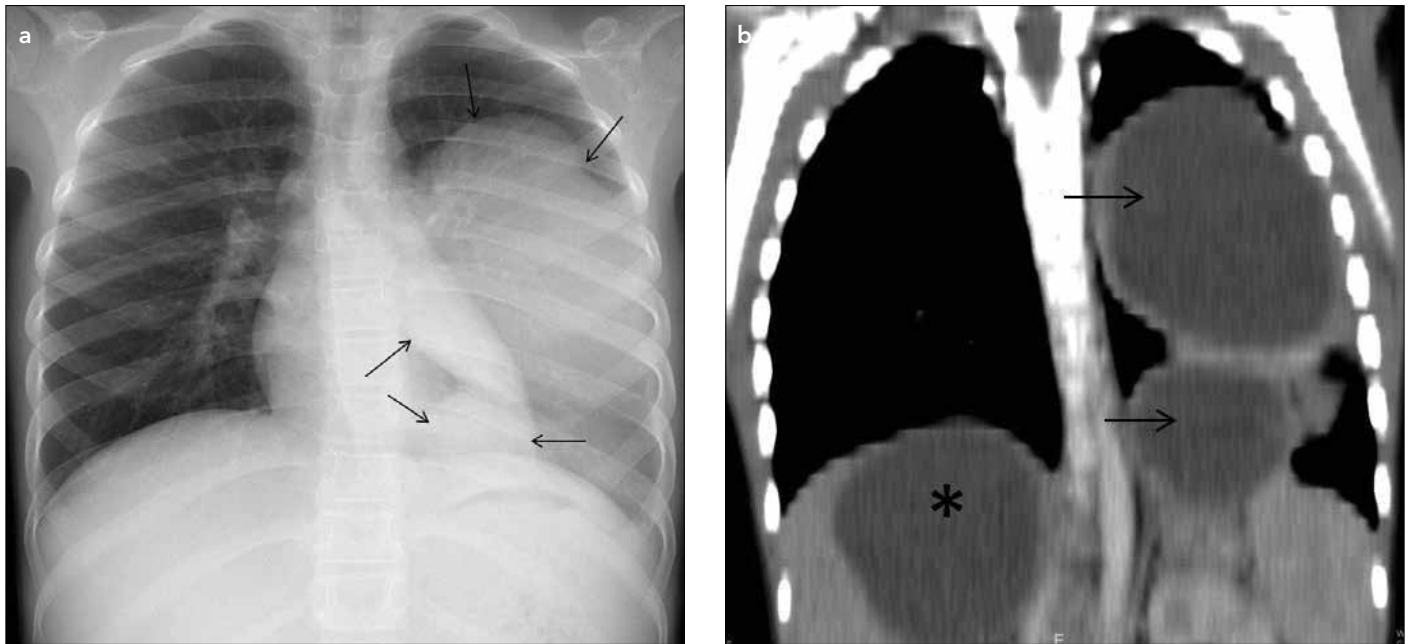
Ekinokokkozis tüm dünya çapında önemli bir halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir (1). Akciğerdeki kistler çevre akciğer parankiminde kronik konjesyon, hemoraji, bronkopnömoni, organize pnömoni ve obstrüktif pnömoniyeye neden olabilmekte beraber genellikle kistler çok büyük boyutlara ulaşana kadar

asemptomatik seyretmekte ve akciğer grafilerinde insidental olarak saptanmaktadırlar (5). Arroud ve ark.'ları (2) yaptıkları çalışmada dev hidatik kistlerin dev olmayanlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde semptomatik seyretiltiklerini belirtmişlerdir. Kistin boyutuna ve bası etkisine bağlı olarak sıklıkla öksürük, hemoptizi ve göğüs ağrısı görülebilmekte, dispne, malazi, bulantı ve kusma ile toraks deformitesi de bu şikayetlere eşlik edebilmektedir (6). Ancak genellikle semptomlar kistin travmatik veya spontan rüptürüne bağlıdır. Bronşial sisteme açılan ya da gerileyen kistlerde sekonder enfeksiyonlar da görülebilmektedir (7). Kayhan ve ark.'larının (8) ülkemizden yaptığı bir çalışmada olguların %93.3'ünde öksürük görülürken sadece %6.6'sında hemoptizi şikayeti mevcuttur. Santivanez ve ark.'ları (9) ise %12-21 arasında değişen hemoptizi oranı bildirmişler ancak hemoptizi daha çok rüptüre kistlerle ilişkilendirmişlerdir. Bizim olgularımızın tamamında da ana semptomlar öksürük ve hemoptiziydi. Ancak hiçbir hastanın rüptüre kisti yoktu. Bu nedenle çocukluk çağı hemoptizi olgularında ayırıcı tanıda kist hidatik mutlaka düşünülmesi gereken bir hastalıktır.

Akciğer kist hidatiğinde fizik muayenenin tanıda yeri çok kısıtlıdır. En önemli tanı araçlarından biri direkt akciğer grafisidir. Kist intakt (rüptüre olmamış) ise toraksın bir yarısında yuvarlak opasite şeklinde görülmektedir. Bizim tüm hastalarımızda da direkt grafide benzer görünümeler mevcuttu. Komplike (rüptüre olmuş) kistlerde ise hava ile dolan kavite nedeniyle hava-sıvı seviyesi ve bununla ilişkili olarak 'nilüfer veya menisküs görünümü' tanıya yardımcı olabilmektedir (10-13). Bilgisayarlı tomografi rutin kullanılmamakla beraber kist ve çevre yapılar hakkında daha iyi bilgi edinmek ve ayırıcı tanıda değerlendirilmesi gereken pulmoner apse, pulmoner tümör ve mediastinal lenfadenopatileri dışlamak için kullanışlı bir tetkiktir. Yine eşlik edebilecek diğer organ tutulumları nedeniyle hastalara US veya manyetik rezonans görüntüleme (MRG) yapılması gerekebilmektedir (2, 14). Bizim hastalarımız da sık görülmeyen bir şekilde prezente oldukları için hepsine ayırıcı tanılar açısından BT çekilip ve tanılar bu şekilde de doğrulanmıştır. Sadece iki hastamızın eşlik eden karaciğer kist hidatiği de mevcut olup izlemde kistin rüptüre olması nedeniyle acil cerrahi girişim yapılmış ve hasta tamamen düzelmiştir.



**Resim 5.** Kontrastlı aksiyel toraks BT tetkikinde mediasten penceresindeki kesitte (a) sağ akciğer alt lob santral parankim içerisinde hipodens, kist hidatik ile uyumlu lezyon izlenmektedir. Parankim penceresindeki kesitte ise (b) sağ akciğer alt lob süperior segment posteriorda içinde kavitasyon bulunan, hava yoluna açılmış ve çevresinde enfeksiyonla uyumlu dansite artışı izlenen, kalın duvarlı kist hidatik ile uyumlu lezyon görülmektedir



**Resim 6.** Aksiyel toraks BT kesitinden oluşturulan koronal reformat görüntüde (a) sol akciğerde iki adet hipodens kist hidatik ile uyumlu lezyon (oklar) ve inceleme dahilindeki karaciğer sol lob parankimi içerisinde de benzer karakterde kist hidatik lezyonu (\*) izlenmektedir. PA akciğer grafisinde (b) sol akciğer üst zondan başlayıp diyafragma kadar uzanan dev boyutlarda düzgün konturlu radyoopasiteler izlenmektedir (oklar)

Biz ayrıca hastalarımızda karar vermemizi kolaylaştırabilecek serolojik testlerden, ELISA, İHA ve EİA testlerinden de faydalandık ve hastalarda ekinokok enfeksiyonu sonuçlarını doğruladık. Hastalarımızda kist hidatik tanısı asıl olarak klinik ve radyolojik bulgularla konmuş olduğundan tanıda farklı serolojik testlerin kullanılmış olması sonucu etkilememektedir. Serolojik testlerden akciğer hidatik kistin serolojik tanısında Ig G ELISA ve İHA sıklıkla kullanılmakta ancak testlerin duyarlılığı %50-60 arasında değişe-

bilmektedir. Her iki testin birlikte kullanımı tanı olasılığını daha da arttırmaktadır (15). Ülkemizden yapılan bir çalışmada İHA ve ELISA testlerinin duyarlılığı sırasıyla %96.7 ve %87.1 bulunmuştur (16). Wattal ve ark.'larının (17) yaptığı bir çalışmada akciğer kist hidatigi olduğu ispatlanmış 22 hastanın %59'unda İHA ve tamamında EİA'in pozitif olduğu saptanmış, ülkemizde yapılan bir çalışmada ise cerrahi olarak kist hidatik olduğu ispatlanmış 35 hastanın %85.7'sinde İHA ve tamamında EİA pozitif olarak bulunmuştur (18).

Akciğer kist hidatiklerinde tercih edilen tedavi seçeneği cerrahi tedavidir. Böylece paraziti eradike etmek, intraoperatif disseminasyondan korunmak ve rezidü kavitenin kapatılması amaçlanmaktadır (19). Henüz etkilenen akciğer parankimin rezeke edilmesi veya parankim koruyucu prosedürlerle tedavi edilmesi konusunda fikir birliği olmamakla beraber uygulanan cerrahi işlemlerin bir kaçı lobektomi, kama rezeksiyon, perikistektomi ve endokistektomidir (6). Bizim hastalarımızın 3'üne kistektomi yapılmış, 1 tanesine kistektomi yapılması planlanmıştır.

Albendazol dev kist hidatiklerde cevap oranı düşük olmakla beraber cerrahi tedaviye alternatif olarak akciğer kist hidatiğinin tedavisinde kullanılmaktadır. Yayınlarda inoperabl olgularda ve yüksek rekürrens riski olan olgularda cerrahi tedaviyle kombine kullanılması gerektiği belirtilmiştir (2, 20). Biz de tüm hastalarımızda cerrahi tedaviyle kombine olarak albendazol kullandık.

## SONUÇ

Ülkemiz gibi bu hastalığın yaygın olduğu toplumlarda hemoptizi ile başvuran çocuk olgularda ayırıcı tanıda hidatik kistin mutlaka düşünölmelidir.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Doğan R, Yüksel M, Cetin G. Surgical treatment of hydatid cysts of the lung: report on 1055 patients. *Thorax* 1989; 44: 192-9. [CrossRef]
2. Arroud M, Afifi My A, El Ghazi K, Nejari C, Bouabdallah Y. Lung hydatid cysts in children: comparison study between giant and non-giant cysts. *Pediatr Surg Int* 2009; 25: 37-40. [CrossRef]
3. Beytur A, Karaman U, Samdanci ET, Yakupoğullari Y, Tatar Y. [Case report: primary renal hydatid cyst]. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2009; 33: 236-8.
4. Karaoglanoglu N, Kurkcuoglu NC, Gorguner M, Eroglu A, Turkyılmaz A. Giant hydatid lung cysts. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001; 19: 914-7. [CrossRef]
5. Gürel D, Kargı A, Ünlü M, Şanlı A, Yılmaz E. Ekinokok kisti kavitesinde *Aspergillus* kolonizasyonu: Olgu sunumu. *Türk Patoloji Dergisi* 2011; 27: 263-5.
6. Halezeroglu S, Celik M, Uysal A, Senol C, Keles M, Arman B. Giant hydatid cysts of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 113: 712-7. [CrossRef]
7. Sakamoto T, Gutierrez C. Pulmonary complications of cystic echinococcosis in children in Uruguay. *Pathol Int* 2005; 55: 497-503. [CrossRef]
8. Kayhan S, Akgüneş A. Histopatolojik Olarak Tanı Konulan Komplike Akciğer Kist Hidatik Olgular. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2011; 35: 189-93. [CrossRef]
9. Santivanez S, Garcia HH. Pulmonary cystic echinococcosis. *Curr Opin Pulm Med* 2010; 16: 257-61.
10. Anadol D, Gocmen A, Kiper N. Hydatid disease in childhood: a retrospective analysis of 376 cases. *Pediatr Pulmonol* 1998; 26: 190-6. [CrossRef]
11. Celik M, Senol C, Keles M, Halezeroglu S, Urek S, Hacıbrahimoglu G, et al. Surgical treatment of pulmonary hydatid disease in children: report of 122 cases. *J Pediatr Surg* 2000; 35: 1710-3. [CrossRef]
12. Özçelik C, İnci I, Toprak M. Surgical treatment of pulmonary hydatidosis in children: experience in 92 patients. *J Pediatr Surg* 1994; 29: 392-5. [CrossRef]
13. Solak H, Yeniterzi M, Yüksek T. The hydatid cysts of the lung in children and results of surgical treatment. *Thorac Cardiovasc Surg* 1990; 38: 45-7. [CrossRef]
14. Savas L, Onlen Y, Akcali C, Aslan B, Pourbagher A, Tunc T, et al. Hydatid disease with atypical localization: 4 cases report. *Scand J Infect Dis* 2004; 36: 613-5. [CrossRef]
15. Biava MF, Dao A, Fortier B. Laboratory diagnosis of cystic hydatid disease. *World J Surg* 2001; 25: 10-4. [CrossRef]
16. Akisu C, Bayram Delibaş S, Yuncu G, Aksoy U, Ozkoç S, Biçmen C, et al. [Evaluation of IHA, ELISA and Western Blot tests in diagnosis of pulmonary cystic hidatidosis]. *Tüberk Toraks* 2005; 53: 156-60.
17. Wattal C, Malla N, Khan IA, Agarwal SC. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of pulmonary echinococcosis. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 41-6.
18. Altaş K. İnsanda hidatidoz tanısında ELISA çalışmaları. *Cerrahpaşa Tıp Fak Derg* 1984; 15: 92-112.
19. Hasdiraz L, Oguzkaya F, Bilgin M. Is lobectomy necessary in the treatment of pulmonary hydatid cysts? *ANZ J Surg* 2006; 76: 488-90. [CrossRef]
20. Morris DL, Marriner S, Bogan J, Burrows F, Skeene-Smith H, Clarkson MJ. Albendazole: objective evidence of response in human hydatid disease. *JAMA* 1985; 253: 2053-7. [CrossRef]



