



EISSN 2146-3077

Indexed in  
PubMed,  
Web of Science  
and Scopus

# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## Özgün Araştırmalar / Original Investigations

Picogreen ve Sytox Orange

Picogreen and Sytox Orange

Perçem Atan ve Kader Yıldız.; Sinop, Kırıkkale, Türkiye

Checking *Leishmania* Promastigotes Viability

*Leishmania* Promastigotes Canlılık Kontrolü

Sajad Rashidi et al.; Shiraz, Tabriz, Iran

*T. cruzi*'nin Üreme Yoğunluğu ve Kriyoprezervasyonu

Reproduction Densities and Cryopreservation of *T. cruzi*

Ahmet Özbilgin ve ark.; Manisa, Sivas, Türkiye

*Blastocystis* Parazit Yüğü ve Semptomlar

*Blastocystis* Parasite Burden and Symptoms

Varol Tunali ve ark.; İzmir, Türkiye

Güvercinlerde Kan Protozoonları

Haemoprotozoans in Pigeons

Bilge Karatepe ve Mustafa Karatepe.; Niğde, Türkiye

Bovine anthelmintic effects of *M. vulgare*

*M. vulgare*'nin sığır antelmintik etkileri

Lotfi Moussouni et al.; Bejaia, Mascara, Algeria

Dört Protozoon İçin Yaklaşık Beş Dakika

Approximately Five Minutes for Four Protozoon

Koray Öncel.; Şanlıurfa, Türkiye

Antalya'da Evcil Hayvanlarda Pire Araştırması

Flea Survey on Pets in Antalya

Gökçe Coşkun ve Hüseyin Çetin.; Antalya, Türkiye

Entomological Remains Collected From Soil

Topraktan Toplanan Entomolojik Kalıntılar

Halide Nihal Açıköz et al.; Ankara, Turkey; Blida, Algeria

Citation Abbreviation: Türkiye Parazitol Derg

Cilt / Volume: 42 Sayı / Issue: 4 Aralık / December 2018

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

turkiyeparazitolderg.org





# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY


**Türkiye Parazitoloji Derneği adına sahibi**  
**Owner on behalf of Turkish Society for Parasitology**

Yusuf Özbel   
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Ege University, İzmir, Turkey*


**Baş Editör / Editor-in-Chief**


Yusuf Özbel   
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Ege University, İzmir, Turkey*


**Biyoistatistik Editörü / Biostatistical Consultant**

Aliye Mandıracıoğlu   
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Public Health Care, Faculty of  
Medicine, Ege University, İzmir, Turkey*

**Yayın Kurulu / Editorial Board**  
**Tıbbi Parazitoloji / Medical Parasitology**

M. Ziya Alkan   
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı,  
İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Ege  
University, İzmir, Turkey*

Nermin Şakru   
Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye  
*Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine,  
Trakya University, Edirne, Turkey*

Seray Töz   
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı,  
İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Ege  
University, İzmir, Turkey*

Nevin Turgay   
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Ege University, İzmir, Turkey*

Özlem Miman   
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey*



**Publisher**  
İbrahim KARA

**Publication Director**  
Ali ŞAHİN

**Finance and Administration**  
Zeynep YAKIŞIRER

**Deputy Publication Director**  
Gökhan ÇİMEN

**Editorial Development**  
Gizem KAYAN

**Publication Coordinators**

Betül Çimen  
Özlem ÇAKMAK  
Okan AYDOĞAN  
İrem DELİÇAY  
Büşra PARMAKSIZ  
Nergis KALKAN  
Arzu YILDIRIM

**Project Assistants**  
Ecenur ASLİM  
Neslihan KÖKSAL  
Cansu ASLAN

**Graphics Department**

Ünal ÖZER  
Deniz DURAN  
Beyzanur KARABULUT

**Contact**

Address: Büyükdere Cad. 105/9 34394  
Mecidiyeköy, Şişli, İstanbul, TURKEY  
Phone: +90 212 217 17 00  
Fax: +90 212 217 22 92  
E-mail : info@avesyayincilik.com



# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## İ. Cüneyt Balcıoğlu

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye  
*Department of Parasitology, School of Medicine,  
Celal Bayar University, Manisa, Turkey*

## Songül Delibaş

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, School of Medicine,  
Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey*

## Mert Döşkaya

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, School of Medicine,  
Ege University, İzmir, Turkey*

## Özgür Kuru

Gülhane Tıp Fakültesi Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye  
*Department of Parasitology, Gülhane Medical School  
Academy, Ankara, Turkey*

## Özgür Kurt

Acıbadem Üniversitesi Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye  
*Department of Microbiology, School of  
Medicine, Acıbadem Üniversitesi, İstanbul, Turkey*

## Veteriner Parazitoloji / Veterinary Parasitology

### Ahmet Doğanay

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye  
*Department of Parasitology, School of Veterinary  
Medicine, Ankara, Turkey*

### Bayram Şenlik

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye  
*Department of Parasitology, School of Veterinary  
Medicine, Uludağ University, Bursa, Turkey*

## Sami Şimşek

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye  
*Department of Parasitology, School of Veterinary Medicine,  
Fırat University, Elazığ, Turkey*

## Tülin Karagenc

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye  
*Department of Parasitology, School of Veterinary Medicine,  
Adnan Menderes University, Aydın, Turkey*

## Ayşen Gargılı

Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi,  
Temel Sağlık Bilimleri Bölümü Kartal, İstanbul, Türkiye  
*Department of Nursery, School of Health Sciences,  
Marmara University, İstanbul Turkey*

## Veli Yılgör Çırak

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye  
*Department of Parasitology, School of Veterinary Medicine,  
Uludağ University, Bursa, Turkey*

## Atila Akça

Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim  
Dalı, Kars, Türkiye  
*Department of Parasitology, School of Veterinary Medicine,  
Kafkas University, Kars, Turkey*

## Biyoloji / Biology

### Bayram Göçmen

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Zoology, Clinic of Biology, Ege University  
School of Science, İzmir, Turkey*



# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## Uluslararası Danışma Kurulu / International Advisory Board

### A. Tümay Gürler

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary,  
Ondokuz Mayıs University, Samsun, Turkey*

### Abdullah İnci

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Erciyes University, Kayseri, Turkey*

### Adil Allahverdiyev

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü,  
İstanbul, Türkiye  
*Department of Bioengineering, Yıldız Teknik  
University, Istanbul, Turkey*

### Ahmet Gökçen

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Burdur, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Mehmet Akif Ersoy University, Burdur, Turkey*

### Ahmet Özbilgin

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine  
Celal Bayar University, Manisa, Turkey*

### Ahmet Üner

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Ege University, İzmir, Turkey*

### Ali Ahmet Kilimcioğlu

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Celal Bayar University, Manisa, Turkey*

### Ali Aydoğdu

Uludağ Üniversitesi Mustafakemalpaşa MYO,  
Bursa, Türkiye  
*Mustafa Kemal Paşa Vocational School, Uludağ  
University, Bursa, Turkey*

### Alparslan Yıldırım

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Erciyes University, Kayseri, Turkey*

### André-Denis G. Wright

University of Vermont Department of Animal  
Science, Burlington, USA  
*Vermont Üniversitesi, Hayvan Bilimi  
Anabilim Dalı, Burlington, ABD*

### Anıl İça

Dumlupınar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı, Kütahya, Türkiye  
*Department of Biology, Faculty of Science-  
Letters, Dumlupınar University, Kütahya, Turkey*

### Aykut Özkul

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji  
Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye  
*Department of Virology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey*

### Aynur Gülanber

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Istanbul University, Istanbul, Turkey*

### Aysu Değirmenci Döşkaya

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Ege University  
School of Medicine, İzmir, Turkey*

### Ayşe Caner

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Ege University, İzmir, Turkey*

### Ayşe Çakmak

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey*

### Ayşegül Taylan Özkan

Hitit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı, Çorum, Türkiye  
*Department of Microbiology, Faculty of Medicine  
Hitit University, Çorum, Turkey*

### Ayşegül Ünver

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Ege University, İzmir, Turkey*

### Aytül Önal

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Pharmacology, Faculty of  
Medicine, Ege University, İzmir, Turkey*

### Bahadır Gönenç

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey*

### Banış Sarı

Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Kars, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Kafkas University, Kars, Turkey*

### Bayram Ali Yukan

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Burdur, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Mehmet Akif Ersoy University, Burdur, Turkey*

### Bayram Şenlik

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Uludağ University, Bursa, Turkey*

### Bekir Keskin

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Zooloji  
Anabilim Dalı, Bornova, Türkiye  
*Department of Zoology, Faculty of Science,  
Ege University, Bornova, Turkey*

### Bijen Kıvçak

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, İzmir, Türkiye  
*Faculty of Pharmacy, Ege University, İzmir, Turkey*

### Bilal Dik

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Selçuk University, Konya, Turkey*

### Bilge Karatepe

Niğde Üniversitesi Bor Meslek Yüksek Okulu,  
Niğde, Türkiye  
*Nigde University Bor Vocational School, Niğde, Turkey*

### Burk A. Dehority

Ohio Üniversitesi, Ohio, ABD  
*Ohio State University, Ohio, USA*

### Cem Ecmel Şaki

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Fırat University, Elazığ, Turkey*

### Cem Vuruşaner

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Istanbul University, Istanbul, Turkey*

### Chizu Sanjoba

Tokyo Üniversitesi Moleküler İmmunoloji  
Bölümü, Tokyo, Japonya  
*Department of Molecular Immunology, Tokyo  
University, Tokyo, Japan*

### Çağrı Büke

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon  
Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Infectious Diseases, Faculty of  
Medicine, Ege University, İzmir, Turkey*



# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## Çiğdem Banu Çetin

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye  
*Department of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Celal Bayar University, Manisa, Turkey*

## Çiler Akisü

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey*

## Daniela Pilarska Kirilova

Bulgaristan Bilimler Akademisi Zooloji Enstitüsü, Sofia, Bulgaristan  
*Institute of Zoology, Bulgaria Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria*

## Davut Alptekin

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye  
*Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Çukurova University, Adana, Turkey*

## Derya Dirim Erdoğan

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Ege University, İzmir, Turkey*

## M. Emin Limoncu

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek YO, Manisa, Türkiye  
*Vocational school of Health Care Services, Celal Bayar University, Manisa, Turkey*

## Engin Araz

Gülhane Tıp Fakültesi, Parazitoloji Bilim Dalı, Ankara, Türkiye  
*Department of Parasitology, Gülhane Military Medical Academy, Ankara, Turkey*

## Ergün Köroğlu

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Fırat University, Elazığ, Turkey*

## Erol Ayaz

İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYOS, Bolu, Türkiye  
*Vocational School of Health Care Services, İzzet Baysal University, Bolu, Turkey*

## Erol Tokşen

Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, İzmir, Türkiye  
*Faculty of Aquaculture, Ege University, İzmir, Turkey*

## Esin Güven

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey*

## Esmâ Kozan

Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Afyon, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Kocatepe University, Afyon, Turkey*

## Fadile Yıldız Zeyrek

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye  
*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Harran University, Şanlıurfa, Turkey*

## Ferda Şevinc

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Selçuk University, Konya, Turkey*

## Feride Kırçalı

Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Afyon, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Kocatepe University, Afyon, Turkey*

## Feyzullah Güçlü

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Selçuk University, Konya, Turkey*

## Funda Doğruman Al

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye  
*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Gazi University, Ankara, Turkey*

## Gönül Dinç

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye  
*Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Celal Bayar University, Manisa, Turkey*

## Gülây Vural

Namık Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Namık Kemal University, Tekirdağ, Turkey*

## Gülnaz Çulha

Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Mustafa Kemal University, Hatay, Turkey*

## Gürol Cantürk

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adli Tıp Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye  
*Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey*

## Hamdi Öğüt

Karadeniz Teknik Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Trabzon, Türkiye  
*Faculty of Aquaculture, Karadeniz Technical University, Trabzon, Turkey*

## Hamza Avcıoğlu

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Atatürk University, Erzurum, Turkey*

## Handan Çetinkaya

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, İstanbul University, İstanbul, Turkey*

## Hande Dağcı

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Ege University, İzmir, Turkey*

## Hasan Eren

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Adnan Menderes University, Aydın, Turkey*

## Hasan Yılmaz

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Yüzüncü Yıl University, Van, Turkey*

## Hatice Çiçek

Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Afyon, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Kocatepe University, Afyon, Turkey*

## Hatice Ertabaklar

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Adnan Menderes University, Aydın, Turkey*

## Hatice Öge

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey*

## Hayrettin Akkaya

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, İstanbul University, İstanbul, Turkey*

## Hüseyin Arkan

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İzmir, Türkiye  
*Department of Biology, Faculty of Science and Letters, Ege University, İzmir, Turkey*

## Hüseyin Bilgin Bilgiç

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Adnan Menderes University, Aydın, Turkey*





# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## Hüseyin Can

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü,  
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Molecular Biology, Division of Biology,  
Ege University Faculty of Science, Izmir, Turkey*

## İ. Soner Koltaş

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Adana, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Çukurova University, Adana, Turkey*

## İhsan Yaşa

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Microbiology, Division of Biology,  
Faculty of Science, Ege University, Izmir, Turkey*

## İsmet Özel

Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, İzmir, Türkiye  
*Faculty of Aquaculture, Ege University, Izmir, Turkey*

## İzzet Şahin

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Erciyes University, Kayseri, Turkey*

## Jerome Depaquit

Reims Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Reims, Fransa  
*Faculty of Pharmacy, Reims University, Reims, France*

## Kader Yıldız

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Kırıkkale University, Kırıkkale, Turkey*

## Kamile Biçek

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Yüzüncü Yıl University, Van Turkey*

## Khosrow Hazrati Tappeh

Urmia Tıp Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Parazitoloji ve Mikoloji Anabilim Dalı, Urmia, İran  
*Department of Parasitology and Mycology, Urmia  
Medical Sciences University, Faculty of Medicine,  
Urmia, Iran*

## Kırami Ölgen

Ege Üniversitesi Edebiyat Fakültesi, Coğrafya  
Bölümü, İzmir, Türkiye  
*Department of Geography, Faculty of Letters,  
Ege University, Izmir, Turkey*

## Kor Yereli

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Celal Bayar University, Manisa, Turkey*

## Kosta Mumcuoğlu

Hebrew Üniversitesi Hadassah Tıp Fakültesi,  
Mikrobiyoloji ve Moleküler Genetik Bölümü, Kudüs, İsrail  
*Department of Microbiology and Molecular Genetics,  
Faculty of Medicine, Hebrew University, Jerusalem, Israel*

## Kwang-Poo Chang

Rosalind Franklin Üniversitesi Mikrobiyoloji  
Bölümü, Şikago, ABD  
*Department of Microbiology, Rosalind Franklin  
University, Chicago, USA*

## Levent Aydın

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Uludağ University, Bursa, Turkey*

## M. Cemal Oğuz

Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi, Erzurum, Türkiye  
*Faculty of Science, Atatürk University, Erzurum, Turkey*

## M. Fatih Şimşek

Adnan Menderes Üniversitesi Fen Fakültesi,  
Ekoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye  
*Department of Ecology, Science and Letters,  
Adnan Menderes University, Aydın, Turkey*

## M. Özkan Arslan

Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Kars, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Kafkas University, Kars, Turkey*

## M. Ziya Alkan

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Ege University, Izmir, Turkey*

## Mehmet Harman

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deri ve Zührevi  
Hastalıklar Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye  
*Department of Dermatology, Dicle University  
School of Medicine, Diyarbakır, Turkey*

## Mehmet Karakuş

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,  
Biyoteknoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye  
*Department of Biotechnology, Health of Sciences  
University Health of Sciences Institute, Istanbul, Turkey*

## Mehmet Yaman

Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Mustafa Kemal University, Hatay, Turkey*

## Mehtap Gül Altaş

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Harran University, Şanlıurfa, Turkey*

## Meral Aydenizöz

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Kırıkkale University, Kırıkkale, Turkey*

## Meral Türk

Denizli Devlet Hastanesi, Parazitoloji Laboratuvarı,  
Denizli, Türkiye  
*Denizli State Hospital, Parasitology, Denizli, Turkey*

## Metin Atambay

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
İnönü University, Malatya, Turkey*

## Metin Korkmaz

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Ege University, Izmir, Turkey*

## Mucide Ak

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Ege University, Izmir, Turkey*

## Murat Kara

Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Kars, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Kafkas University, Kars, Turkey*

## Murat Sevgili

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Harran University, Şanlıurfa, Turkey*

## Mustafa Açıç

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary,  
Ondokuz Mayıs University, Samsun, Turkey*

## Mustafa Kaplan

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Firat University, Elazığ, Turkey*

## Mustafa Karatepe

Niğde Üniversitesi Bor Meslek Yüksek Okulu,  
Niğde, Türkiye  
*Nigde University Bor Vocational School, Niğde, Turkey*

## Mustafa Köse

Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Afyon, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, University, Afyon, Turkey*

## Mustafa Necati Muz

Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Mustafa Kemal University, Hatay, Turkey*

## Mustafa Yaman

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi,  
Trabzon, Türkiye  
*Faculty of Science Karadeniz Technical University,  
Trabzon, Turkey*



# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

**Mustafa Yılmaz**

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Firat University, Elazığ, Turkey*

**Münir Aktaş**

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Firat University, Elazığ, Turkey*

**Naciye Gülkız Şenler**

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Yüzüncü Yıl University, Van, Turkey*

**Nalan Özdal**

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine Yüzüncü Yıl University, Van, Turkey*

**Nazif Elaldı**

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Firat University, Sivas, Turkey*

**Nazir Dumanlı**

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Firat University, Elazığ, Turkey*

**Nazmiye Altıntaş**

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Ege University, İzmir, Turkey*

**Nermin Şakur**

Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye  
*Department of Microbiology, Faculty of  
Medicine, Trakya University, Edirne, Turkey*

**Nevin Turgay**

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Bilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Ege University, İzmir, Turkey*

**Nihal Doğan**

Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Bilim Dalı, Eskişehir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Osmangazi University, Eskişehir, Turkey*

**Nilgün Daldal**

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
İnönü University, Malatya, Turkey*

**Nogay Girginkardeşler**

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Celal Bayar University, Manisa, Turkey*

**Nuran Aysul**

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Adnan Menderes University, Aydın, Turkey*

**Nurşen Alpagut-Keskin**

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü  
Zooloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Zoology, Division of Biology,  
Faculty of Science, Ege University, İzmir, Turkey*

**Oğuz Sarımehtemioğlu**

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey*

**Oktay Alver**

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye  
*Department of Microbiology, Faculty of Medicine,  
Uludağ University, Bursa, Turkey*

**Osman Selçuk Aldemir**

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Adnan Menderes University, Aydın, Turkey*

**Önder Düzlü**

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Erciyes University, Kayseri, Turkey*

**Özgür Kurt**

Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye  
*Department of Microbiology, Faculty of Medicine,  
Acıbadem University, İstanbul, Turkey*

**Özlem Mıman**

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine  
Dokuz Eylül University İzmir, Turkey*

**Özlem Tünger**

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye  
*Department of Microbiology, Faculty of Medicine,  
Celal Bayar University, Manisa, Turkey*

**Petr Volf**

Charles Üniversitesi Fen Fakültesi, Prag, Çek  
Cumhuriyeti  
*Faculty of Science, Charles University, Prague,  
Czech Republic*

**Probir K. Bandyopadhyay**

Kalyani Üniversitesi Zooloji Bölümü, West Bengal, Hindistan  
*Department of Zoology, Kalyani University, West  
Bengal, India*

**Ramazan Adanır**

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner  
Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Mehmet Akif Ersoy University, Hatay, Turkey*

**Ramazan İnci**

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Microbiology, Cerrahpaşa Faculty  
of Medicine, Ege University, İzmir, Turkey*

**Renate Radek**

Berlin Serbest Üniversitesi Biyoloji/Zooloji  
Enstitüsü, Berlin, Almanya  
*Institute of Biology/Zoology, Berlin University,  
Berlin, Germany*

**S. Bülent Alten**

Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Ekoloji  
Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye  
*Department of Ecology, Faculty of Science and  
Letters, Hacettepe University, Ankara, Turkey*

**Sabri Ünal**

Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi,  
Kastamonu, Türkiye  
*Faculty of Forestry, Kastamonu University,  
Kastamonu, Turkey*

**Salih Gürel**

Samatya Devlet Hastanesi, Dermatoloji Kliniği,  
İstanbul, Türkiye  
*Clinic of Dermatology, Samatya State Hospital,  
İstanbul, Turkey*

**Sami Şimşek**

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Firat University, Elazığ, Turkey*

**Selim S. Çağlar**

Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Ekoloji  
Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye  
*Department of Ecology, Faculty of Science and  
Letters, Hacettepe University, Ankara, Turkey*

**Sema Ertuğ**

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Adnan Menderes University, Aydın, Turkey*

**Semih Öge**

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey*

**Semra Özçelık**

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Cumhuriyet University, Sivas, Turkey*



# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## Seray Töz

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Ege University, İzmir, Turkey*

## Serdar Değer

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Van, Turkey*

## Serdar Düşen

Pamukkale Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji  
Bölümü, Denizli, Türkiye  
*Department of Biology, Faculty of Science and  
Letters, Pamukkale University, Denizli, Turkey*

## Serdar Paşa

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Adnan Menderes University, Aydın, Turkey*

## Serkan Bakırcı

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of  
Veterinary Medicine, Adnan Menderes University,  
Aydın, Turkey*

## Serpil Değerli

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Cumhuriyet University, Sivas, Turkey*

## Serpil Nalbantoğlu

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey*

## Sibel Ergüven

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Bilim Dalı, Ankara, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Hacettepe University, Ankara, Turkey*

## Soner Uzun

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji  
Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye  
*Department of Dermatology, Faculty of Medicine,  
Akdeniz University, Antalya, Turkey*

## Songül Delibaş

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey*

## Stefano Cecchini

Della Basilicata Üniversitesi, Potenza, İtalya  
*Della Basilicata University, Potenza, Italy*

## Suna Gedikoğlu

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon  
Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye  
*Department of Infectious Diseases, Faculty of  
Medicine, Uludağ University, Bursa, Turkey*

## Süleyman Aypak

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Adnan Menderes University, Aydın, Turkey*

## Süphan Karaytuğ

Mersin Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü,  
Mersin, Türkiye  
*Department of Biology, Faculty of Science and  
Letters, Mersin University, Mersin, Turkey*

## Şebnem Üstün

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji  
Bilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Gastroenterology, Faculty of  
Medicine, Ege University, İzmir, Turkey*

## Şevki Ziya Coşkun

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Uludağ University, Bursa, Turkey*

## Şinasi Umur

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Ondokuz Mayıs University, Samsun, Turkey*

## Şükran Yağcı Yücel

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey*

## Tonay İnceboz

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey*

## Tuğrul Dereli

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Dermatology, Faculty of Medicine,  
Ege University, İzmir, Turkey*

## Uğur Uslu

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Selçuk University, Konya, Turkey*

## Ulus Salih Akarca

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji  
Bilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Gastroenterology, Faculty of  
Medicine, Ege University, İzmir, Turkey*

## Ülgen Z. Ok

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Celal Bayar University, Manisa, Turkey*

## Ümit Çimli Aksoy

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey*

## Veli Yılmaz Çırak

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Uludağ University, Bursa, Turkey*

## Volkan Akyol

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Uludağ University, Bursa, Turkey*

## Yaşar Ali Öner

İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi,  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye  
*Department of Microbiology, Çapa Faculty of  
Medicine, Istanbul University, Istanbul, Turkey*

## Yunus Kılıç

Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Kars, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Kafkas University, Kars, Turkey*

## Yüksel Gürüz

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Ege University, İzmir, Turkey*

## Zafer Karaer

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey*

## Zati Vatansver

Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Kars, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Kafkas University, Kars, Turkey*

## Zeynep Sümer

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Cumhuriyet University, Sivas, Turkey*

## Zeynep Taş

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, Van, Türkiye  
*Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Yüzüncü Yıl University, Van, Turkey*





# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## AMAÇ VE KAPSAM

Türkiye Parazitoloji Dergisi (Türkiye Parazitoloj Derg), Türk Parazitoloji Derneği'nin çift-kör hakemli, açık erişimli bilimsel yayın organıdır. Dergi Mart, Haziran, Eylül ve Aralık aylarında olmak üzere üç ayda bir yayınlanır ve dört sayıda bir cildi tamamlanır. Yayın dili Türkçe ve İngilizce'dir.

Türkiye Parazitoloji Dergisi; tıp, veterinerlik ve biyoloji alanlarında parazitoloji konulu klinik ve deneysel araştırma makaleleri, olgu sunumları, derleme ve editöre mektup türünde yayınladığı yüksek bilimsel standartlara sahip makalelerle uluslararası literatüre katkı sunmaktadır.

Derginin hedef kitlesi, tıbbi ve veteriner parazitoloji alanlarında ve biyoloji bilim dalının ilgili birimlerinde çalışan tüm bilim insanları ve bu alanlardaki yüksek lisans öğrencileridir.

Derginin editöryel ve yayın süreçleri International "Committee of Medical Journal Editors (ICMJE)", "World Association of Medical Editors (WAME)", "Council of Science Editors (CSE)", "Committee on Publication Ethics (COPE)", "European Association of Science Editors (EASE)" ve "National Information Standards Organization (NISO)" organizasyonlarının kılavuzlarına uygun olarak biçimlendirilir. Türkiye Parazitoloji Dergisi, "Principles of Transparency and Best Practice in Scholarly Publishing (doaj.org/bestpractice)" ilkelerini benimsemiştir.

Türkiye Parazitoloji Dergisi, PubMed/MEDLINE, BIOSIS-Zoological Record, BIOSIS Previews Biological Abstracts, CABI Abstracts and Bibliographic Databases, SCOPUS, Embase ve TÜBİTAK ULAKBİM TR Dizin tarafından indekslenmektedir.

Makale değerlendirme ve yayın işlemleri için yazarlardan ücret talep edilmemektedir. Tüm makaleler <http://turkiyeparazitolderg.org/tr/Anasayfa> sayfasındaki online makale değerlendirme sistemi kullanılarak dergiyeye gönderilmelidir. Derginin yazım kurallarına, gerekli

formlara ve dergiyle ilgili diğer bilgilere web sayfasından erişilebilir.

Derginin tüm masrafları Türkiye Parazitoloji Derneği tarafından karşılanmaktadır. Basılı kopyalarda tıbbi ilaç, malzeme ve cihaz üreticilerinin reklamları yayınlanabilir. Reklam vermek isteyenlerin Editöryel Ofis ile iletişime geçmeleri gerekmektedir. Reklam görselleri sadece Baş Editör onayı ile yayınlanmaktadır.

Dergide yayınlanan makalelerde ifade edilen bilgi, fikir ve görüşler Türkiye Parazitoloji Derneği, Baş Editör, Editörler, Yayın Kurulu ve Yayıncı'nın değil, yazar(lar)ın bilgi ve görüşlerini yansıtır. Baş Editör, Editörler, Yayın Kurulu ve Yayıncı, bu gibi yazarlara ait bilgi ve görüşler için hiçbir sorumluluk ya da yükümlülük kabul etmemektedir.

Yayınlanan tüm içeriğe <http://turkiyeparazitolderg.org/tr/Anasayfa> adresinden ücretsiz olarak erişilebilir. Basılı kopyalar Türkiye Parazitoloji Derneği üyelerine ücretsiz olarak dağıtılır.

Dergide yayınlanan içeriğin tüm telif hakları Türkiye Parazitoloji Derneği'ne aittir.

**Baş Editör:** Prof. Dr. Yusuf Özbel

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

Tel: +90 232 390 47 24 / +90 232 373 00 08

Faks: +90 232 388 13 47

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

**Yayıncı:** AVES

Adres: Büyükdere Cad., 105/9 34394 Mecidiyeköy, Şişli, İstanbul, Türkiye

Tel: +90 212 217 17 00

Faks: +90 212 217 22 92

E-mail: [info@avesyayincilik.com](mailto:info@avesyayincilik.com)

Web page: [avesyayincilik.com](http://avesyayincilik.com)



# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## AIMS AND SCOPE

Turkish Journal of Parasitology (Türkiye Parazitolojisi Dergisi) is the double-blind peer-reviewed, open access, international publication organ of Turkish Society for Parasitology. The journal is a quarterly publication, published on March, June, September and December and its publication languages are Turkish and English.

Turkish Journal of Parasitology aims to contribute to the international literature by publishing original clinical and experimental research articles, case reports, review articles, and letters to the editor biological, medical and veterinary parasitology.

The journal's target audience includes researchers, physicians and healthcare professionals who are interested or working on medical and veterinary parasitology, and relevant disciplines of biology, as well as PhD and MSc students studying on these topics.

The editorial and publication processes of the journal are shaped in accordance with the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), World Association of Medical Editors (WAME), Council of Science Editors (CSE), Committee on Publication Ethics (COPE), European Association of Science Editors (EASE), and National Information Standards Organization (NISO). The journal is in conformity with the Principles of Transparency and Best Practice in Scholarly Publishing (doaj.org/bestpractice).

Turkish Journal of Parasitology is currently indexed in PubMed/MEDLINE, BIOSIS-Zoological Record, BIOSIS Previews Biological Abstracts, CABI Abstracts and Bibliographic Databases, SCOPUS, Embase, and TUBITAK ULAKBIM TR Index.

Processing and publication are free of charge with the journal. No fees are requested from the authors at any point throughout the evaluation and publication process. All manuscripts must be submitted via the online submission

system, which is available at <http://turkiyeparazitolojidergisi.org/eng/Anasayfa>. The journal guidelines, technical information, and the required forms are available on the journal's web page.

All expenses of the journal are covered by the Turkish Society for Parasitology. Potential advertisers should contact the Editorial Office. Advertisement images are published only upon the Editor-in-Chief's approval.

Statements or opinions expressed in the manuscripts published in the journal reflect the views of the author(s) and not the opinions of the Turkish Society for Parasitology, editors, editorial board, and/or publisher; the editors, editorial board, and publisher disclaim any responsibility or liability for such materials.

All published content is available online, free of charge at <http://turkiyeparazitolojidergisi.org/eng/Anasayfa>. Printed copies of the journal are distributed to the members of the Turkish Society for Parasitology, free of charge.

Turkish Society for Parasitology holds the international copyright of all the content published in the journal.

**Editor in Chief:** Yusuf Özbek, MD, Prof

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

Phone: +90 232 390 47 24 / +90 232 373 00 08

Fax: +90 232 388 13 47

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

**Publisher:** AVES

Address: Büyükdere Cad., 105/9 34394 Mecidiyeköy, Şişli, İstanbul, Turkey

Phone: +90 212 217 17 00

Fax: +90 212 217 22 92

E-mail: [info@avesyayincilik.com](mailto:info@avesyayincilik.com)

Web page: [avesyayincilik.com](http://avesyayincilik.com)



# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## YAZARLARA BİLGİ

Türkiye Parazitoloji Dergisi (Türkiye Parazitolojisi Dergisi), Türk Parazitoloji Derneği'nin çift-kör hakemli, açık erişimli bilimsel yayın organıdır. Dergi Mart, Haziran, Eylül ve Aralık aylarında olmak üzere üç ayda bir yayınlanır ve dört sayıda bir cildi tamamlar. Yayın dili Türkçe ve İngilizce'dir.

Türkiye Parazitoloji Dergisi; tıp, veterinerlik ve biyoloji alanlarında parazitoloji konulu klinik ve deneysel araştırma makaleleri, olgu sunumları, derleme ve editörel mektup türünde yayınladığı yüksek bilimsel standartlara sahip makalelerle uluslararası literatüre katkı sunmaktadır.

Derginin editörel ve yayın süreçleri, "International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE)", "World Association of Medical Editors (WAME)", "Council of Science Editors (CSE)", "Committee on Publication Ethics (COPE)", "European Association of Science Editors (EASE)" ve "National Information Standards Organization (NISO)" organizasyonlarının kılavuzlarına uygun olarak biçimlendirilmiştir. Türkiye Parazitoloji Dergisi'nin editörel ve yayın süreçleri, "Principles of Transparency and Best Practice in Scholarly Publishing (doaj.org/bestpractice)" ilkelerine uygun olarak yürütülmektedir.

Özgünlük, yüksek bilimsel kalite ve atf potansiyeli bir makalenin yayına kabulü için en önemli kriterlerdir. Gönderilen yazıların daha önce başka bir elektronik ya da basılı dergide, kitapta veya farklı bir ortamda sunulmamış ya da yayınlanmamış olması gerekir. Daha önce başka bir dergiye gönderilen ancak yayına kabul edilmeyen yazılar hakkında dergi önceden bilgilendirilmelidir. Bu yazıların eski hakem raporlarının Yayın Kuruluna gönderilmesi değerlendirme süresinin hızlanmasını sağlayacaktır. Toplantılarda sunulan çalışmalar için, sunum yapılan organizasyonun tam adı, tarihi, şehri ve ülkesi belirtilmelidir.

Türkiye Parazitoloji Dergisi'ne gönderilen tüm makaleler çift-kör hakem değerlendirme sürecinden geçmektedir. Tarafsız değerlendirme sürecini sağlamak için her makale alanlarında uzman en az iki dış-bağımsız hakem tarafından değerlendirilir. Dergi Yayın Kurulu üyeleri tarafından gönderilecek makalelerin değerlendirme süreçleri, davet edilecek dış bağımsız editörler tarafından yönetilecektir. Bütün makalelerin karar verme süreçlerinde nihai karar yetkisi Baş Editör'dedir.

Araştırmaların kabul edilen etik kurallar çerçevesinde yapıldığını temin etmek için yazarların etik uygunluk konusunda bilgi vermeleri gerekmektedir. İnsanlar üzerinde yapılan klinik ve deneysel çalışmalar, ilaç araştırmaları ve bazı olgu sunumları için "World Medical Association Declaration of Helsinki, Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects", (amended in October 2013, www.wma.net) çerçevesinde hazırlanmış Etik Komisyon raporu gerekmektedir. Gerekli görülmesi halinde Etik Komisyon raporu veya eşdeğeri olan resmi bir yazı yazarlardan talep edilebilir. İnsanlar üzerinde yapılmış deneysel çalışmaların sonuçlarını bildiren yazılarda, çalışmanın yapıldığı kişilere uygulanan prosedürlerin niteliği tümüyle açıklandıktan sonra, onaylarının alındığına ilişkin bir açıklama ile onay alınan etik kurul adı ve onay numarasına makalenin Yöntemler bölümünde yer verilmelidir. Hastaların kimliklerinin gizliliğini korumak yazarların sorumluluğundadır. Hastaların kimliğini açığa çıkarabilecek fotoğraflar için hastadan ya da yasal temsilcilerinden alınan imzalı izinlerin de gönderilmesi gereklidir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar için de uluslararası etik kurallara uygunluğu gösteren komite onayı ilgili hayvan etik kurulundan alınmalıdır. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda etik kurul onayının yanı sıra, hayvanlara ağrı, acı ve rahatsızlık verilmesi için yapılmış olanlar açık olarak makalede belirtilmelidir.

Bütün makalelerin benzerlik tespiti denetimi, iThenticate yazılımı aracılığıyla yapılmaktadır.

Yayın Kurulu, dergimize gönderilen çalışmalar hakkındaki intihal, atf manipülasyonu ve veri sahteciliği iddia ve şüpheleri karşısında COPE kurallarına uygun olarak hareket edecektir.

Yazar olarak listelenen herkesin ICMJE (www.icmje.org) tarafından önerilen yazarlık kriterlerini karşılaması gerekmektedir. ICMJE, yazarların aşağıdaki 4 kriteri karşılamasını önermektedir:

1. Çalışmanın konseptine/tasarımına; ya da çalışma için verilerin toplanmasına, analiz edilmesine ve yorumlanmasına önemli katkı sağlamış olmak; **VE**
2. Yazı taslağını hazırlamış ya da önemli fikrinsel içeriğin eleştirel incelemelerini yapmış olmak; **VE**
3. Yazının yayından önceki son halini gözden geçirmiş ve onaylamış olmak; **VE**
4. Çalışmanın herhangi bir bölümünün geçerliliği ve doğruluğuna ilişkin soruların uygun şekilde soruşturulduğunun ve çözümlendiğinin garantisini vermek amacıyla çalışmanın her yönünden sorumlu olmayı kabul etmek.

Bir yazar, çalışmada katkı sağladığı kısımların sorumluluğunu almasına ek olarak, diğer yazarların çalışmanın hangi kısımlarından sorumlu olduğunu da teşhis edebilmelidir. Ayrıca, yazarlar birbirlerinin katkıların bütünlüğüne güven duymalıdır.

Yazar olarak belirtilen her kişi yazarlığın dört kriterini karşılamalıdır ve bu dört kriteri karşılayan her kişi yazar olarak tanımlanmalıdır. Dört kriterin hepsini karşılamayan kişilere makalenin başlık sayfasında teşekkür edilmelidir.

Yazarlık haklarına uygun hareket etmek ve hayalet ya da lütf yazarlığının önlenmesini sağlamak amacıyla sorumlu yazarlar makale yükleme sürecinde www.turkiyeparazitolog.org adresinden erişilebilen Yazar Katkı Formu'nu imzalamalı ve taranmış versiyonunu yazıyla birlikte göndermelidir. Yayın Kurulu'nun gönderilen bir makalede "lütuf yazarlık" olduğundan şüphelenmesi durumunda söz konusu makale değerlendirme yapılmaksızın reddedilecektir. Makale gönderimi kapsamında; sorumlu yazar makale gönderim ve değerlendirme süreçleri boyunca yazarlık ile ilgili tüm sorumluluğu kabul ettiğini bildiren kısa bir ön yazı göndermelidir.

Türkiye Parazitoloji Dergisi; gönderilen makalelerin değerlendirme sürecine dahil olan yazarların ve bireylerin, potansiyel çıkar çatışmasına ya da önyargıya yol açabilecek finansal, kurumsal ve diğer ilişkiler dahil mevcut ya da potansiyel çıkar çatışmalarını beyan etmelerini talep ve teşvik eder.

Bir çalışma için bir birey ya da kurumdan alınan her türlü finansal destek ya da diğer destekler Yayın Kurulu'na beyan edilmeli ve potansiyel çıkar çatışmalarını beyan etmek amacıyla ICMJE Potansiyel Çıkar Çatışmaları Formu katkı sağlayan tüm yazarlar tarafından ayrı ayrı doldurulmalıdır. Editörler, yazarlar ve hakemler ile ilgili potansiyel çıkar çatışması vakaları derginin Yayın Kurulu tarafından COPE ve ICMJE rehberleri kapsamında çözülmektedir.

Derginin Yayın Kurulu, itiraz ve şikayet vakalarını, COPE rehberleri kapsamında işleme almaktadır. Yazarlar, itiraz ve şikayetleri için doğrudan Editörel Ofis ile temasa geçebilirler. İhtiyaç duyulduğunda Yayın Kurulu'nun kendi içinde çözemediği konular için tarafsız bir temsilci atanmaktadır. İtiraz ve şikayetler için karar verme süreçlerinde nihai kararın Baş Editör verecektir.

Türkiye Parazitoloji Dergisi 'ne makale gönderen yazarlar makalelerinin telif haklarını Türkiye Parazitoloji Derneği'ne devretmeyi kabul ederler. Reddedilen makalelerin telif hakları yazarlarına geri iade edilir. Türkiye Parazitoloji Dergisi her makalenin www.turkiyeparazitolog.org adresinden erişilebileceğinin Yayın Hakkı Devir Formu ile beraber gönderilmesini talep eder. Yazarlar, basılı ya da elektronik formatta yer alan resimler, tablolar ya da diğer her türlü içerik dahil daha önce yayınlanmamış içeriği kullanırken telif hakkı sahibinden izin almalıdırlar. Bu konudaki yasal, mali ve cezai sorumluluk yazarlara aittir.

Dergide yayınlanan makalelerde ifade edilen görüşler ve fikirler Türkiye Parazitoloji Dergisi, Baş Editör, Editörler, Yayın Kurulu ve Yayıncı'nın değil, yazar(lar)ın bakış



# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

açılarını yansıtır. Baş Editör, Editörler, Yayın Kurulu ve Yayıncı bu gibi durumlar için hiçbir sorumluluk ya da yükümlülük kabul etmemektedir. Yayınlanan içerik ile ilgili tüm sorumluluk yazarlara aittir.

## MAKALE HAZIRLAMA

Makaleler, ICMJE-Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals (updated in December 2017 - <http://www.icmje.org/icmje-recommendations.pdf>) ile uyumlu olarak hazırlanmalıdır. Randomize çalışmalar CONSORT, gözlemsel çalışmalar STROBE, tanılabilir değerli çalışmalar STARD, sistematik derleme ve meta-analizler PRISMA, hayvan deneyli çalışmalar ARRIVE ve randomize olmayan davranış ve halk sağlığıyla ilgili çalışmalar TREND kılavuzlarına uyumlu olmalıdır.

Makaleler sadece [www.turkiyeparazitolog.org](http://www.turkiyeparazitolog.org) adresinde yer alan derginin online makale yükleme ve değerlendirme sistemi üzerinden gönderilebilir. Diğer ortamlardan gönderilen makaleler değerlendirilmeye alınmayacaktır.

Gönderilen makalelerin dergi yazım kurallarına uygunluğu ilk olarak Editöryel Ofis tarafından kontrol edilecek, dergi yazım kurallarına uygun hazırlanmış makaleler teknik düzeltme talepleri ile birlikte yazarlarına geri gönderilecektir.

Yazarların; Yayın Hakkı Devir Formu, Yazar Katkı Formu ve ICMJE Potansiyel Çıkar Çatışmaları Formu'nu (bu form, tüm yazarlar tarafından doldurulmalıdır) ilk gönderim sırasında online makale sistemine yüklemeleri gerekmektedir. Bu formlara [www.turkiyeparazitolog.org](http://www.turkiyeparazitolog.org) adresinden erişilebilmektedir.

**Başlık sayfası:** Gönderilen tüm makalelerle birlikte ayrı bir başlık sayfası da gönderilmelidir. Bu sayfa;

- Makalenin Türkçe ve İngilizce başlıkları ile 50 karakteri geçmeyen kısa başlıklarını,
- Yazarların isimlerini, kurumlarını, eğitim derecelerini ve ORCID ID numaralarını,
- Finansal destek bilgisi ve diğer destek kaynakları hakkında detaylı bilgiyi,
- Sorumlu yazarın ismi, adresi, telefonu (cep telefonu dahil), faks numarası ve e-posta adresini,
- Makale hazırlama sürecine katkıda bulunan ama yazarlık kriterlerini karşılamayan bireylerle ilgili bilgileri içermelidir.

**Özet:** Editöre Mektup türündeki yazılar dışında kalan tüm makalelerin Türkçe ve İngilizce özetleri olmalıdır. Özgün Araştırma makalelerinin özetleri "Amaç", "Yöntemler", "Bulgular" ve "Sonuç" alt başlıklarını içerecek biçimde hazırlanmalıdır.

**Anahtar Sözcükler:** Tüm makaleler en az 3 en fazla 5 anahtar kelimeyle birlikte gönderilmeli, anahtar sözcükler özetin hemen altına yazılmalıdır. Kısaltmalar anahtar sözcük olarak kullanılmamalıdır. Anahtar sözcükler "National Library of Medicine (NLM)" tarafından hazırlanan "Medical Subject Headings (MeSH)" veritabanından seçilmelidir.

## Makale Türleri

**Özgün Araştırma:** Ana metin "Giriş", "Yöntemler", "Bulgular", "Tartışma" ve "Sonuç" alt başlıklarını içermelidir. Özgün Araştırmalarla ilgili kısıtlamalar için lütfen Tablo 1'i inceleyiniz.

Sonucu desteklemek için istatistiksel analiz genellikle gereklidir. İstatistiksel analiz, tıbbi dergilerdeki istatistik verilerini bildirme kurallarına göre yapılmalıdır (Altman DG, Gore SM, Gardner MJ, Pocock SJ. *Statistical guidelines for contributors to medical journals*. Br Med J 1983; 7; 1489-93). İstatistiksel analiz ile ilgili bilgi, Yöntemler bölümü içinde ayrı bir alt başlık olarak yazılmalı ve kullanılan yazılım kesinlikle tanımlanmalıdır.

Birimler, uluslararası birim sistemi olan International System of Units (SI)'a uygun olarak hazırlanmalıdır.

**Editöryel Yorum:** Dergide yayınlanan bir araştırmanın, o konunun uzmanı olan veya üst düzeyde değerlendirme yapan bir hakemi tarafından kısaca yorumlanması amacıyla taşımaktadır. Yazarları, dergi tarafından seçilip davet edilir. Özet, anahtar sözcük, tablo, şekil, resim ve diğer görseller kullanılmaz.

**Derleme:** Yazının konusunda birikimi olan ve bu birikimleri uluslararası literatüre yaygın ve atıf sayısı olarak yansımış uzmanlar tarafından hazırlanmış yazılar değerlendirmeye alınır. Yazarları dergi tarafından da davet edilebilir. Bir bilgi ya da konunun klinikte kullanılması için vardığı son düzeyi anlatan, tartışan, değerlendiren ve gelecekte yapılacak olan çalışmalara yön veren bir formatta hazırlanmalıdır. Ana metin "Giriş", "Klinik ve Araştırma Etkileri" ve "Sonuç" bölümlerini içermelidir. Derleme türündeki yazılarla ilgili kısıtlamalar için lütfen Tablo 1'i inceleyiniz.

**Olgu Sunumu:** Olgu sunumları için sınırlı sayıda yer ayrılmakta ve sadece ender görülen, tanı ve tedavisi güç olan hastalıklarla ilgili, yeni bir yöntem öneren, kitaplarda yer verilmeyen bilgileri yansıtan, ilgi çekici ve öğretici özelliği olan olgular yayına kabul edilmektedir. Ana metin; "Giriş", "Olgu Sunumu", "Tartışma" ve "Sonuç" alt başlıklarını içermelidir. Olgu Sunumlarıyla ilgili kısıtlamalar için lütfen Tablo 1'i inceleyiniz.

**Editöre Mektup:** Dergide daha önce yayınlanan bir yazının önemini, gözden kaçan bir ayrıntısını ya da eksik kısımlarını tartışabilir. Ayrıca derginin kapsamına giren alanlarda okurların ilgisini çekebilecek konular ve özellikle eğitici olgular hakkında da Editöre Mektup formatında yazılar yayınlanabilir. Okuyucular da yayınlanan yazılar hakkında yorum içeren Editöre Mektup formatında yazılarını sunabilirler. Özet, anahtar sözcük, tablo, şekil, resim ve diğer görseller kullanılmaz. Ana metin alt başlıksız olmalıdır. Hakkında mektup yazılan yayına ait cilt, yıl, sayı, sayfa numaraları, yazı başlığı ve yazarların adları açık bir şekilde belirtilmeli, kaynak listesinde yazılmalı ve metin içinde atıfta bulunulmalıdır.

Tablo 1: Makale türleri için kısıtlamalar

Makale türü	Sözcük limiti	Özet sözcük limiti	Kaynak limiti	Tablo limiti	Resim limiti
Özgün Araştırma	3500	250 (Alt başlıklı)	30	6	7 ya da toplamda 15 resim
Derleme	5000	250	50	6	10 ya da toplamda 20 resim
Olgu Sunumu	1000	200	15	Tablo yok	10 ya da toplamda 20 resim
Editöre Mektup	500	Uygulanamaz	5	Tablo yok	Resim yok

## Tablolar

Tablolar ana dosyaya eklenmeli, kaynak listesi sonrasında sunulmalı, ana metin içerisindeki geçiş sıralarına uygun olarak numaralandırılmaz. Tabloların üzerinde tanımlayıcı bir başlık yer almalı ve tablo içerisinde geçen kısaltmaların açıkları tablo altına tanımlanmalıdır. Tablolar Microsoft Office Word dosyası içinde "Tablo Ekle" komutu kullanılarak hazırlanmalı ve kolay okunabilir şekilde düzenlenmelidir. Tablolarda sunulan veriler ana metinde sunulan verilerin tekrarı olmamalı; ana metindeki verileri destekleyici nitelikte olmalıdır.

## Resim ve Resim Altyazıları

Resimler, grafikler ve fotoğraflar (TIFF ya da JPEG formatında) ayrı dosyalar halinde sisteme yüklenmelidir. Görseller bir Word dosyası dokümanı ya da ana





# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

doküman içerisinde sunulmamalıdır. Alt birimlere ayrılan görseller olduğunda, alt birimler tek bir görsel içerisinde verilmemelidir. Her bir alt birim sisteme ayrı bir dosya olarak yüklenmelidir. Resimler alt birimleri belli etme amacıyla etiketlenmemelidir (a, b, c vb.). Resimlerde altyazıları desteklemek için kalın ve ince oklar, ok başları, yıldızlar, asteriksler ve benzer işaretler kullanılabilir. Makalenin geri kalanında olduğu gibi resimler de kör olmalıdır. Bu sebeple, resimlerde yer alan kişi ve kurum bilgileri de körleştirilmelidir. Görsellerin minimum çözünürlüğü 300DPI olmalıdır. Değerlendirme sürecindeki aksaklıkları önlemek için gönderilen bütün görsellerin çözünürlüğü net ve boyutu büyük (minimum boyutlar 100x100 mm) olmalıdır. Resim altyazıları ana metnin sonunda yer almalıdır.

Makale içerisinde geçen tüm kısaltmalar, ana metin ve özetle ayrı ayrı olmak üzere ilk kez kullanıldıkları yerde tanımlanarak, **kısaltma tanımının ardından parantez içerisinde** verilmelidir.

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

Ana metin içerisinde cihaz, yazılım, ilaç vb. ürünlerden bahsedildiğinde ürünün ismi, üreticisi, üretildiği şehir ve ülke bilgisini içeren ürün bilgisi parantez içinde verilmelidir; "Discovery St PET/CT scanner (General Electric, Milwaukee, WI, USA)".

Tüm kaynaklar, tablolar ve resimlere ana metin içinde uygun olan yerlerde **sırayla** numara verilerek atıf yapılmalıdır.

**Özgün araştırmaların kısıtlamaları, engelleri ve yetersizliklerinden** Sonuç paragrafı öncesi "Tartışma" bölümünde bahsedilmelidir.

#### Kaynaklar

Atıf yapılırken en son ve en güncel yayınlar tercih edilmelidir. Atıf yapılan erken çevrimiçi makalelerin DOI numaraları mutlaka sağlanmalıdır. Kaynakların doğruluğundan yazarlar sorumludur. Dergi isimleri Index Medicus/Medline/PubMed'de yer alan dergi kısaltmaları ile uyumlu olarak kısaltılmalıdır. Altı ya da daha az yazar olduğunda tüm yazar isimleri listelenmelidir. Eğer 7 ya da daha fazla yazar varsa ilk 6 yazar yazıldıktan sonra "et al" konulmalıdır. Ana metinde kaynaklara atıf yapılırken parantez içinde Arabik numaralar kullanılmalıdır. Farklı yayın türleri için kaynak stilleri aşağıdaki örneklerde sunulmuştur:

**Dergi makalesi:** Blasco V, Colavolpe JC, Antonini F, Zieleskiewicz L, Nafati C, Albanese J, et al. Long-term outcome in kidney recipients from donors treated with hydroxyethylstarch 130/0.4 and hydroxyethylstarch 200/0.6. *Br J Anaesth* 2015; 115: 797-8.

**Kitap bölümü:** Sherry S. Detection of thrombi. In: Strauss HE, Pitt B, James AE, editors. *Cardiovascular Medicine*. St Louis: Mosby; 1974.p.273-85.

**Tek yazarlı kitap:** Cohn PF. *Silent myocardial ischemia and infarction*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; 1993.

**Yazar olarak editör(ler):** Norman IJ, Redfern SJ, editors. *Mental health care for elderly people*. New York: Churchill Livingstone; 1996.

**Toplantıda sunulan yazı:** Bengissson S, Sothemin BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. *MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on*

*Medical Informatics*; 1992 Sept 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992.p.1561-5.

**Bilimsel veya teknik rapor:** Smith P, Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report. Dallas (TX) Dept. of Health and Human Services (US). Office of Evaluation and Inspections: 1994 Oct. Report No: HHSIGOE 169200860.

**Tez:** Kaplan SI. Post-hospital home health care: the elderly access and utilization (dissertation). St. Louis (MO): Washington Univ. 1995.

**Yayına kabul edilmiş ancak henüz basılmamış yazılar:** Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. *N Engl J Med* In press 1997.

**Erken Çevrimiçi Yayın:** Aksu HU, Ertürk M, Gül M, Uslu N. Successful treatment of a patient with pulmonary embolism and biatrial thrombus. *Anadolu Kardiyol Derg* 2012 Dec 26. doi: 10.5152/akd.2013.062. [Epub ahead of print]

**Elektronik formatta yayınlanan yazı:** 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>.

#### REVİZYONLAR

Yazarlar makalelerinin revizyon dosyalarını gönderirken, ana metin üzerinde yaptıkları değişiklikleri işaretlemeli, ek olarak, hakemler tarafından öne sürülen önerilerle ilgili notlarını "Hakemlere Cevap" dosyasında göndermelidir. Hakemlere Cevap dosyasında her hakemin yorumunun ardından yazarın cevabı gelmeli ve değişikliklerin yapıldığı satır numaraları da ayrıca belirtilmelidir. Revize makaleler karar mektubunu takip eden 30 gün içerisinde dergiye gönderilmelidir. Makalenin revize versiyonu belirtilen süre içerisinde yüklenmezse, revizyon seçeneği iptal olabilir. Yazarların revizyon için ek süreye ihtiyaç duymaları durumunda uzatma taleplerini ilk 30 gün sona ermeden dergiye iletmeleri gerekmektedir.

Yayına kabul edilen makaleler dil bilgisi, noktalama ve biçim açısından kontrol edilir. Yayın süreci tamamlanan makaleler, yayın planına dahil edildikleri sayıyla birlikte yayınlanmadan önce erken çevrimiçi formatında dergi web sitesinde yayına alınır. Kabul edilen makalelerin baskıya hazır PDF dosyaları sorumlu yazarlara iletilir ve yayın onaylarının 2 gün içerisinde dergiye iletilmesi istenir.

Baş Editör: Prof. Dr. Yusuf Özbek

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

Tel: +90 232 390 47 24 / +90 232 373 00 08

Faks: +90 232 388 13 47

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

Yayıncı: AVES

Address: Büyükdere Cad., 105/9 34394 Mecidiyeköy, Şişli, İstanbul, Türkiye

Tel: +90 212 217 17 00

Faks: +90 212 217 22 92

E-mail: [info@avesyayincilik.com](mailto:info@avesyayincilik.com)

Web page: [avesyayincilik.com](http://avesyayincilik.com)



# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Turkish Journal of Parasitology (Türkiye Parazit Derg) is the double-blind peer-reviewed, open access, international publication organ of Turkish Society for Parasitology. The journal is a quarterly publication, published on March, June, September and December and its publication languages are Turkish and English.

Turkish Journal of Parasitology aims to contribute to the international literature by publishing original clinical and experimental research articles, case reports, review articles, and letters to the editor biological, medical and veterinary parasitology.

The editorial and publication processes of the journal are shaped in accordance with the guidelines of the International Council of Medical Journal Editors (ICMJE), the World Association of Medical Editors (WAME), the Council of Science Editors (CSE), the Committee on Publication Ethics (COPE), the European Association of Science Editors (EASE), and National Information Standards Organization (NISO). The journal conforms to the Principles of Transparency and Best Practice in Scholarly Publishing ([doaj.org/bestpractice](http://doaj.org/bestpractice)).

Originality, high scientific quality, and citation potential are the most important criteria for a manuscript to be accepted for publication. Manuscripts submitted for evaluation should not have been previously presented or already published in an electronic or printed medium. The journal should be informed of manuscripts that have been submitted to another journal for evaluation and rejected for publication. The submission of previous reviewer reports will expedite the evaluation process. Manuscripts that have been presented in a meeting should be submitted with detailed information on the organization, including the name, date, and location of the organization.

Manuscripts submitted to Turkish Journal of Parasitology will go through a double-blind peer-review process. Each submission will be reviewed by at least two external, independent peer reviewers who are experts in their fields in order to ensure an unbiased evaluation process. The editorial board will invite an external and independent editor to manage the evaluation processes of manuscripts submitted by editors or by the editorial board members of the journal. The Editor in Chief is the final authority in the decision-making process for all submissions.

To ensure that the research has been conducted according to accepted ethical principles, authors should declare information on ethical compliance. For studies involving human participants, an approval of research protocols by the Ethics Committee in accordance with international agreements (World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects," amended in October 2013, [www.wma.net](http://www.wma.net)) is required for experimental, clinical, and drug studies and for some case reports. Information on patient consent, the name of the ethics committee, and the ethics committee approval number should also be stated in the Methods section of the manuscript. For manuscripts concerning experimental research on animals, an approval of research protocols by an Animal Ethics Committee in accordance with international principles is required. If required, ethics committee reports or an equivalent official document will be requested from the authors. For studies carried out on animals, the measures taken to prevent pain and suffering of the animals should be stated clearly.

All submissions are screened by a similarity detection software (iThenticate by CrossCheck).

In the event of alleged or suspected research misconduct, e.g., plagiarism, citation manipulation, and data falsification/fabrication, the Editorial Board will follow and act in accordance with COPE guidelines.

Each individual listed as an author should fulfill the authorship criteria recommended by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE - [www.icmje.org](http://www.icmje.org)). The ICMJE recommends that authorship be based on the following 4 criteria:

- 1 Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; AND
- 2 Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; AND
- 3 Final approval of the version to be published; AND
- 4 Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

In addition to being accountable for the parts of the work he/she has done, an author should be able to identify which co-authors are responsible for specific other parts of the work. In addition, authors should have confidence in the integrity of the contributions of their co-authors.

All those designated as authors should meet all four criteria for authorship, and all who meet the four criteria should be identified as authors. Those who do not meet all four criteria should be acknowledged in the title page of the manuscript.

Turkish Journal of Parasitology requires corresponding authors to submit a signed and scanned version of the authorship contribution form (available for download through <http://turkiyeparazitolog.org/eng/Anasayfa>) during the initial submission process in order to act appropriately on authorship rights and to prevent ghost or honorary authorship. If the editorial board suspects a case of "gift authorship," the submission will be rejected without further review. As part of the submission of the manuscript, the corresponding author should also send a short statement declaring that he/she accepts to undertake all the responsibility for authorship during the submission and review stages of the manuscript.

Turkish Journal of Parasitology requires and encourages the authors and the individuals involved in the evaluation process of submitted manuscripts to disclose any existing or potential conflicts of interests, including financial, consultant, and institutional, that might lead to potential bias or a conflict of interest. Any financial grants or other support received for a submitted study from individuals or institutions should be disclosed to the Editorial Board. To disclose a potential conflict of interest, the ICMJE Potential Conflict of Interest Disclosure Form should be filled in and submitted by all contributing authors. Cases of a potential conflict of interest of the editors, authors, or reviewers are resolved by the journal's Editorial Board within the scope of COPE and ICMJE guidelines.

The Editorial Board of the journal handles all appeal and complaint cases within the scope of COPE guidelines. In such cases, authors should get in direct contact with the editorial office regarding their appeals and complaints. When needed, an ombudsperson may be assigned to resolve cases that cannot be resolved internally. The Editor in Chief is the final authority in the decision-making process for all appeals and complaints.

When submitting a manuscript to Turkish Journal of Parasitology, authors accept to assign the copyright of their manuscript to Turkish Society for Parasitology. If rejected for publication, the copyright of the manuscript will be assigned back to the authors. Turkish Journal of Parasitology requires each submission to be accompanied by a Copyright Transfer Form (available for download at <http://turkiyeparazitolog.org/eng/Anasayfa>). When using previously published content, including figures, tables, or any other material in both print and electronic formats, authors must obtain permission from the copyright holder. Legal, financial and criminal liabilities in this regard belong to the author(s).

Statements or opinions expressed in the manuscripts published in Turkish Journal of Parasitology reflect the views of the author(s) and not the opinions of the editors, the editorial board, or the publisher; the editors, the editorial board, and the publisher disclaim any responsibility or liability for such materials. The final responsibility in regard to the published content rests with the authors.



# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## MANUSCRIPT PREPARATION

The manuscripts should be prepared in accordance with ICMJE-Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals (updated in December 2017 - <http://www.icmje.org/icmje-recommendations.pdf>). Authors are required to prepare manuscripts in accordance with the CONSORT guidelines for randomized research studies, STROBE guidelines for observational original research studies, STARD guidelines for studies on diagnostic accuracy, PRISMA guidelines for systematic reviews and meta-analysis, ARRIVE guidelines for experimental animal studies, and TREND guidelines for non-randomized public behavior.

Manuscripts can only be submitted through the journal's online manuscript submission and evaluation system, available at <http://turkiyeparazitolog.org/eng/Anasayfa>. Manuscripts submitted via any other medium will not be evaluated.

Manuscripts submitted to the journal will first go through a technical evaluation process where the editorial office staff will ensure that the manuscript has been prepared and submitted in accordance with the journal's guidelines. Submissions that do not conform to the journal's guidelines will be returned to the submitting author with technical correction requests.

Authors are required to submit the following:

- Copyright Transfer Form,
- Author Contributions Form, and
- ICMJE Potential Conflict of Interest Disclosure Form (should be filled in by all contributing authors)

during the initial submission. These forms are available for download at <http://turkiyeparazitolog.org/eng/Anasayfa>.

## Preparation of the Manuscript

**Title page:** A separate title page should be submitted with all submissions and this page should include:

- The Turkish and English full title of the manuscript as well as a short title (running head) of no more than 50 characters,
- Name(s), affiliations, highest academic degree(s) and ORCID ID's of the author(s),
- Grant information and detailed information on the other sources of support,
- Name, address, telephone (including the mobile phone number) and fax numbers, and email address of the corresponding author,
- Acknowledgment of the individuals who contributed to the preparation of the manuscript but who do not fulfill the authorship criteria.

**Abstract:** A Turkish and an English abstract should be submitted with all submissions except for Letters to the Editor. Submitting a Turkish abstract is not compulsory for international authors. The abstract of Original Articles should be structured with subheadings (Objective, Methods, Results, and Conclusion). Please check Table 1 below for word count specifications.

**Keywords:** Each submission must be accompanied by a minimum of three to a maximum of five keywords for subject indexing at the end of the abstract. The keywords should be listed in full without abbreviations. The keywords should be selected from the National Library of Medicine, Medical Subject Headings database (<https://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>).

## Manuscript Types

**Original Articles:** This is the most important type of article since it provides new information based on original research. The main text of original articles should

be structured with Introduction, Methods, Results, Discussion, and Conclusion subheadings. Please check Table 1 for the limitations for Original Articles.

Statistical analysis to support conclusions is usually necessary. Statistical analyses must be conducted in accordance with international statistical reporting standards (Altman DG, Gore SM, Gardner MJ, Pocock SJ. Statistical guidelines for contributors to medical journals. *Br Med J* 1983; 7; 1489-93). Information on statistical analyses should be provided with a separate subheading under the Materials and Methods section and the statistical software that was used during the process must be specified.

Units should be prepared in accordance with the International System of Units (SI).

**Editorial Comments:** Editorial comments aim to provide a brief critical commentary by reviewers with expertise or with high reputation in the topic of the research article published in the journal. Authors are selected and invited by the journal to provide such comments. Abstract, Keywords, and Tables, Figures, Images, and other media are not included.

**Review Articles:** Reviews prepared by authors who have extensive knowledge on a particular field and whose scientific background has been translated into a high volume of publications with a high citation potential are welcomed. These authors may even be invited by the journal. Reviews should describe, discuss, and evaluate the current level of knowledge of a topic in clinical practice and should guide future studies. The main text should contain Introduction, Clinical and Research Consequences, and Conclusion sections. Please check Table 1 for the limitations for Review Articles.

**Case Reports:** There is limited space for case reports in the journal and reports on rare cases or conditions that constitute challenges in diagnosis and treatment, those offering new therapies or revealing knowledge not included in the literature, and interesting and educative case reports are accepted for publication. The text should include Introduction, Case Report, Discussion, and Conclusion subheadings. Please check Table 1 for the limitations for Case Reports.

**Letters to the Editor:** This type of manuscript discusses important parts, overlooked aspects, or lacking parts of a previously published article. Articles on subjects within the scope of the journal that might attract the readers' attention, particularly educative cases, may also be submitted in the form of a "Letter to the Editor." Readers can also present their comments on the published manuscripts in the form of a "Letter to the Editor." Abstract, Keywords, and Tables, Figures, Images, and other media should not be included. The text should be unstructured. The manuscript that is being commented on must be properly cited within this manuscript.

**Table 1.** Limitations for each manuscript type

Type of manuscript	Word limit	Abstract word limit	Reference limit	Table limit	Figure limit
Original Article	3500	250 (Structured)	30	6	7 or total of 15 images
Review Article	5000	250	50	6	10 or total of 20 images
Case Report	1000	200	15	No tables	10 or total of 20 images
Technical Note	1500	No abstract	15	No tables	10 or total of 20 images
Letter to the Editor	500	No abstract	5	No tables	No media



# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## Tables

Tables should be included in the main document, presented after the reference list, and they should be numbered consecutively in the order they are referred to within the main text. A descriptive title must be placed above the tables. Abbreviations used in the tables should be defined below the tables by footnotes (even if they are defined within the main text). Tables should be created using the "insert table" command of the word processing software and they should be arranged clearly to provide easy reading. Data presented in the tables should not be a repetition of the data presented within the main text but should be supporting the main text.

## Figures and Figure Legends

Figures, graphics, and photographs should be submitted as separate files (in TIFF or JPEG format) through the submission system. The files should not be embedded in a Word document or the main document. When there are figure subunits, the subunits should not be merged to form a single image. Each subunit should be submitted separately through the submission system. Images should not be labeled (a, b, c, etc.) to indicate figure subunits. Thick and thin arrows, arrowheads, stars, asterisks, and similar marks can be used on the images to support figure legends. Like the rest of the submission, the figures too should be blind. Any information within the images that may indicate an individual or institution should be blinded. The minimum resolution of each submitted figure should be 300 DPI. To prevent delays in the evaluation process, all submitted figures should be clear in resolution and large in size (minimum dimensions: 100 × 100 mm). Figure legends should be listed at the end of the main document.

All acronyms and abbreviations used in the manuscript should be defined at first use, both in the abstract and in the main text. The abbreviation should be provided in parentheses following the definition.

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.

When a drug, product, hardware, or software program is mentioned within the main text, product information, including the name of the product, the producer of the product, and city and the country of the company (including the state if in USA), should be provided in parentheses in the following format: "Discovery St PET/CT scanner (General Electric, Milwaukee, WI, USA)"

All references, tables, and figures should be referred to within the main text, and they should be numbered consecutively in the order they are referred to within the main text.

Limitations, drawbacks, and the shortcomings of original articles should be mentioned in the Discussion section before the conclusion paragraph.

## References

While citing publications, preference should be given to the latest, most up-to-date publications. If an ahead-of-print publication is cited, the DOI number should be provided. Authors are responsible for the accuracy of references. Journal titles should be abbreviated in accordance with the journal abbreviations in Index Medicus/ MEDLINE/PubMed. When there are six or fewer authors, all authors should be listed. If there are seven or more authors, the first six authors should be listed followed by "et al." In the main text of the manuscript, references should be cited using Arabic numbers in parentheses. The reference styles for different types of publications are presented in the following examples.

**Journal Article:** Rankovic A, Rancic N, Jovanovic M, Ivanović M, Gajović O, Lazić Z, et al. Impact of imaging diagnostics on the budget – Are we spending too much? *Vojnosanit Pregl* 2013; 70: 709-11.

**Book Section:** Suh KN, Keystone JS. Malaria and babesiosis. Gorbach SL, Barlett JG, Blacklow NR, editors. *Infectious Diseases*. Philadelphia: Lippincott Williams; 2004.p.2290-308.

**Books with a Single Author:** Sweetman SC. *Martindale the Complete Drug Reference*. 34<sup>th</sup> ed. London: Pharmaceutical Press; 2005.

**Editor(s) as Author:** Huizing EH, de Groot JAM, editors. *Functional reconstructive nasal surgery*. Stuttgart-New York: Thieme; 2003.

**Conference Proceedings:** Bengissson S, Sothemin BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. *MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics*; 1992 Sept 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. pp.1561-5.

**Scientific or Technical Report:** Cusick M, Chew EY, Hoogwerf B, Agrón E, Wu L, Lindley A, et al. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Risk factors for renal replacement therapy in the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS), Early Treatment Diabetic Retinopathy Study. *Kidney Int*; 2004. Report No: 26.

**Thesis:** Yılmaz B. Ankara Üniversitesindeki Öğrencilerin Beslenme Durumları, Fiziksel Aktiviteleri ve Beden Kitle İndeksleri Kan Lipidleri Arasındaki İlişkiler. H.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. 2007.

**Manuscripts Accepted for Publication, Not Published Yet:** Slots J. The microflora of black stain on human primary teeth. *Scand J Dent Res*. 1974.

**Epub Ahead of Print Articles:** Cai L, Yeh BM, Westphalen AC, Roberts JP, Wang ZJ. Adult living donor liver imaging. *Diagn Interv Radiol*. 2016 Feb 24. doi: 10.5152/dir.2016.15323. [Epub ahead of print].

**Manuscripts Published 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](http://www.cdc.gov/ncidod/EID/cid.htm).

## REVISIONS

When submitting a revised version of a paper, the author must submit a detailed "Response to the reviewers" that states point by point how each issue raised by the reviewers has been covered and where it can be found (each reviewer's comment, followed by the author's reply and line numbers where the changes have been made) as well as an annotated copy of the main document. Revised manuscripts must be submitted within 30 days from the date of the decision letter. If the revised version of the manuscript is not submitted within the allocated time, the revision option may be canceled. If the submitting author(s) believe that additional time is required, they should request this extension before the initial 30-day period is over.

Accepted manuscripts are copy-edited for grammar, punctuation, and format. Once the publication process of a manuscript is completed, it is published online on the journal's webpage as an ahead-of-print publication before it is included in its scheduled issue. A PDF proof of the accepted manuscript is sent to the corresponding author and their publication approval is requested within 2 days of their receipt of the proof.

Editor in Chief: Yusuf Özbek, MD, Prof

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

Phone: +90 232 390 47 24 / +90 232 373 00 08

Fax: +90 232 388 13 47

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

Publisher: AVES

Address: Büyükdere Cad. 105/9 34394 Mecidiyeköy, Şişli, İstanbul, Turkey

Phone: +90 212 217 17 00

Fax: +90 212 217 22 92

E-mail: [info@avesyayincilik.com](mailto:info@avesyayincilik.com)

[avesyayincilik.com](http://avesyayincilik.com)





# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## İÇİNDEKİLER / CONTENTS

### ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / ORIGINAL INVESTIGATIONS

- 240 Koyun Orijinli Polimorf Nükleer Lökositlerde *Toxoplasma gondii*'ye Karşı Şekillenen Hücre Dışı Tuzağın Kantitatif Analizinde Picogreen ve Sytox Orange Boyalarının Karşılaştırılması  
*Comparison of Picogreen and Sytox Orange Stains in Quantitative Analysis of Extracellular Trap Formed against Toxoplasma Gondii in Polymorphonuclear Leukocytes from Sheep*  
Perçem Atan, Kader Yıldız
- 245 The Importance of Checking *Leishmania* Promastigotes Viability in the Proteomic analysis of Secretions  
*Sekresyonların Proteomiks Analizinde Leishmania Promastigotların Canlılıklarının Kontrol Edilmesinin Önemi*  
Sajad Rashidi, Kurosh Kalantar, Davood Rostamzadeh, Gholamreza Hatam
- 249 Farklı Sıvı Besiyerlerinde *Trypanosoma cruzi*'nin Üreme Yoğunluklarının Karşılaştırılması ve Kriyoprezervasyonu  
*Comparıson of Reproduction Densities in Different Liquid Media of Trypanosoma cruzi and Cryopreservation*  
Ahmet Özbilgin, Tuğba Kaya, İbrahim Çavuş, Ahmet Yıldırım, Necati Özpınar
- 254 Gastrointestinal Sistem ve Dermatolojik Yakınmaları Olan Hastalarda *Blastocystosis* Prevalansı ve *Blastocystis* Spp. Yoğunluğunun Semptomatolojiye Etkisi  
*The Prevalance of Blastocystosis among Patients with Gastrointestinal and Dermatologic Complaints and Effects of Blastocystis Spp. Density on Symptomatology*  
Varol Tunalı, Eylem Akdur Öztürk, Ayşegül Ünver, Nevin Turgay
- 258 Niğde Yöresi Güvercinlerinde (*Columba livia*) Kan Protozoonlarının Yaygınlığı  
*Prevalence of Haemoprotozoans in Pigeons (Columba livia) in Niğde Province*  
Bilge Karatepe, Mustafa Karatepe
- 262 *In-vitro* anthelmintic effects of aqueous and ethanolic extracts of *Marrubium vulgare* leaves against bovine digestive strongyles  
*Marrubium vulgare (karaderme) yapraklarının sulu ve etanolik ekstraktlarının sığır sindirim strongilozuna karşı in-vitro antelmintik etkileri*  
Lotfi Moussouni, Mokhtar Benhanifia, Abdelhanine Ayad
- 268 Direkt Bakıda Tanımlama Zorluğu Yaşanılan Dört Parazit için Alternatif Bir Yaklaşım  
*Alternative Staining Method for Four Parasites that are Difficult to Identify through Direct Inspection*  
Koray Öncel
- 277 Kış Aylarında Evcil Kedi ve Köpeklerdeki Pire (Siphonaptera: Pulicidae) Enfestasyonları ile İlgili Antalya, Türkiye'den Bir Araştırma  
*A Research about Flea (Siphonaptera: Pulicidae) Infestation on Domestic Cats and Dogs in Winter Months, from Antalya, Turkey*  
Gökçe Coşkun, Hüseyin Çetin
- 281 Assessment of Entomological Remains From Soil Samples Collected From a Pig (*Sus scrofa domestica*) Carcass Decomposition Site After 13 Years  
*On Üç Yıl Sonra Domuz Leşinin (Sus scrofa domestica) Dekompozisyon Bölgesinden Toplanan Toprak Örneklerindeki Entomolojik Kalıntıların Değerlendirilmesi*  
Halide Nihal Açıkgöz, Eser Ethem Ilgıt, Meriem Taleb

### OLGU SUNUMLARI / CASE REPORTS

- 286 Molecular Identification and Clinicopathological Findings of Hepatozoon sp. Infection in a Cat: First Report from Turkey  
*Bir Kedide Hepatozoon sp. Enfeksiyonunun Moleküler İdentifikasyonu ve Klinikopatolojisi: Türkiye'den İlk Rapor*  
Gülten Emek Tuna, Serkan Bakırcı, Ceren Dinler, Gizem Battal, Bülent Ulutaş
- 290 Bir Mongolian Gerbilde (*Meriones Unguiculatus*) *Dentostomella translucida* Schulz ve *Krepkorgorskaja*, 1932  
*Dentostomella translucida (Gerbil Pinworm) Infection in Mongolian Gerbil (Meriones Unguiculatus) Schulz and Krepkorgorskaja, 1932*  
Adnan Ayan, Metin Pekağırbaş, Süleyman Aypak, Tülin Karagenc

### 294 HAKEM LİSTESİ - REVIEWER LIST



# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## EDİTÖRDEN

2018 yılının son sayısını iki tanesi yurtdışından gelen çalışmaları içerecek şekilde 9 özgün araştırma makalesi ve 2 olgu sunumu olmak üzere 11 makale ile çıkarmaktayız.

Özgün araştırmalarda, dokularda yerleşen protozoon parazitlerden *Toxoplasma*, *Leishmania* ve *Trypanosoma* ile üç ilginç çalışma bulabilirsiniz. Ülkemizde de önemi giderek artmaya başlayan blastocystis prevalansı ile ilgili bir çalışma, güvercinlerdeki kan protozoonlarının durumunu inceleyen Niğde ilimizden bir araştırma da bu sayıda yer almaktadır. Direkt bakıda tanınma zorluğu bulunan dört parazit ile ilgili detaylı bir araştırma ile özellikle kedi ve köpeklerde sorunlar yaratan pire enfestasyonları ile ilgili nadir rastlanabilecek bir çalışmaya, ayrıca yine ilginç bir konu olan toprak örneklerindeki entomolojik kalıntıları inceleyen bir araştırma bu sayımızda yayınlanmaktadır.

HIV ile toxoplasmosis, sıtma ve bağırsak protozoonlarının ilişkisini inceleyen üç ayrı makale, Mersin ilindeki kutanöz leishmaniasis modellemesi ile ilgili bir makale, doğu illerimizde kistik ekinokokkozis durumunu vurgulayan bir makale yer almaktadır. Entomoloji alanında baş bitleri, kuş biti ve *Culex pipiens* ile ilgili makaleler yer almaktadır. Ayrıca güve sineklerinin moleküler karakterizasyonunu içeren detaylı bir araştırmaya da yer verilmiştir.

Olgu sunumlarında ise yine ilginç bulacağınızı düşündüğümüz iki farklı konuda olguya detaylı olarak yer verilmiştir.

Dergimizin yazım kuralları daha da detaylandırılarak yenilenmiştir. Makalelerin hazırlanması sırasında bu kurallara uyulması, makalelerin sisteme yüklenmesi sırasındaki süreci hızlandırmak için yazarlara önemli kolaylık sağlayacağını belirtmek isterim. Yazım kuralları ve gerekli formların tamamı dergimizin web sayfasında "Yazım Kuralları" sekmesinde yer almaktadır.

Dergimize gönderilen yazılarda SCI/SCI-Expanded kapsamında olan dergilerde yapacağınız yayınlarda dergimizde yer alan makalelere atıf yapılmasının, dergimizin bu endekse başvuru sürecinde büyük önem taşıdığını yeniden belirtmek isterim. Bilim alanımızın en önemli unsurlarından ve bizleri güçlendiren araçlarından biri olan "Türkiye Parazitoloji Dergisi"nin bu sayısının da bilimsel çalışmalarınıza ve birikimlerinize yararlı olmasını umuyorum.

**Prof. Dr. Yusuf Özbel**  
Baş Editör



# Türkiye Parazitoloji Dergisi

TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY

## EDITORIAL

We present you the last issue of 2018 with a total of 11 studies, including 9 original research articles, two of which are from abroad, and 2 case reports.

In the original research articles, you can find three interesting studies about *Toxoplasma*, *Leishmania* and *Trypanosoma*, which are among protozoan parasites located in tissues. A study on the prevalence of blastocystis, which is becoming more and more important in our country, and another study from the province of Niğde, which examines the status of blood protozoans in pigeons, are also included in this issue. A detailed study on four parasites which are difficultly identified in direct examination, a rare study on flea infestations that cause problems particularly in cats and dogs, and an interesting study on the entomological remains in soil samples are also published in this issue.

This issue also includes three different articles examining the relationship between HIV and toxoplasmosis, malaria and intestinal protozoa, one article about the modeling of cutaneous Leishmaniasis in the province of Mersin, and one article focusing on cystic Echinococcosis in our eastern cities. In the area of entomology, there are articles on *Pediculus capitis*, bird louse, and *Culex pipiens*. Moreover, this issue includes a detailed study examining the molecular characterization of moth flies.

In the case reports, two cases on different subjects, which we think you will find interesting, are presented in detail.


The writing rules of our journal have been renewed and detailed. I would like to point out that it would be of great help to the authors in order to speed up the process during the preparation of the articles and the process of uploading the articles to the system. The manuscript rules and all of the required forms can be reached on the web page of our journal under the tab of "Instruction for Authors".

I would like to re-emphasize that making citations from the articles in our journal for the studies that will be published in the journals included in the SCI/SCI-Expanded is very important during the application process of our journal to this index. I hope that this issue of the "Turkish Parasitology Journal", which is one of the most important components of our scientific field and one of tools that strengthen us, will contribute to your scientific works and knowledge.

**Prof. Dr. Yusuf Özbel**  
Chief Editor

# Koyun Orijinli Polimorf Nükleer Lökositlerde *Toxoplasma gondii*'ye Karşı Şekillenen Hücre Dışı Tuzağın Kantitatif Analizinde Picogreen ve Sytox Orange Boyalarının Karşılaştırılması

Comparison of Picogreen and Sytox Orange Stains in Quantitative Analysis of Extracellular Trap Formed against *Toxoplasma gondii* in Polymorphonuclear Leukocytes from Sheep

Perçem Atan<sup>1</sup>, Kader Yıldız<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Sinop İl Sağlık Müdürlüğü Erfelek İlçe Devlet Hastanesi, Sinop, Türkiye

<sup>2</sup>Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye

**Cite this article as:** Atan P, Yıldız K. Comparison of Picogreen and Sytox Orange stains in quantitative analysis of extracellular trap formed against *Toxoplasma gondii* in polymorphonuclear leukocytes from sheep. Türkiye Parazit Derg 2018; 42(4): 240-4.

## ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmada *in vitro* şekillenen hücre dışı tuzak yapılarının omurgasını oluşturan DNA'nın kantitatif ölçümünde iki ekstrasellüler DNA boyasının (Sytox orange ve Picogreen) etkinliğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla koyun polimorf nükleer lökosit (PMN)-*Toxoplasma gondii* takizoit kültürü model olarak alınmıştır.

**Yöntemler:** Çalışma kapsamında koyunlardan izole edilen PMN ve *T. gondii* takizoitleri farklı sürelerde (30, 60, 90 ve 120 dakika) inkübe edilmiş ve reaksiyon sonucunda açığa çıkan ekstrasellüler DNA iki farklı boyaya ile boyanarak ölçülmüştür.

**Bulgular:** Çalışma sonucunda 30 dakikalık inkubasyon dışındaki ( $p=0,014$ ) inkubasyon sürelerinde açığa çıkan DNA'nın ölçümü bakımından iki boya arasında istatistiksel fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

**Sonuç:** İki boya arasında 30. dakikadaki boyanma farklılığı önemli bulunmuştur. Bu durumun sebebinin kullanılan boyaya ait boyama özelliği ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. *In vitro* netosis çalışan araştırmacıların kısa süreli inkubasyon sonucunda şekillenen ekstrasellüler DNA'nın kantitatif analizinde iki farklı boya kullanmaları önerilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Hücre dışı tuzak oluşumu, nötrofil lökosit, Picogreen, Sytox Orange

**Geliş Tarihi:** 20.03.2018

**Kabul Tarihi:** 17.05.2018

## ABSTRACT

**Objective:** The present study aimed to compare the effectiveness of two extracellular DNA dyes (Sytox Orange and PicoGreen) in quantitative measurement of the DNA that forms the backbone of the extracellular trap structures *in vitro*. Toward this aim, the co-culture of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) and *Toxoplasma gondii* tachyzoites isolated from sheep was selected as model.

**Methods:** *T. gondii* tachyzoites and PMNs isolated from the sheep were incubated for varied durations (30, 60, 90 and 120 min); the extracellular DNA released following this incubation was stained using two different dyes.

**Results:** In the present study, no statistical significant difference was observed between the two extracellular DNA dyes with regard to the measurement of extracellular DNA released for all the incubation durations ( $p>0.05$ ), except for the 30-min incubation ( $p=0.014$ ).

**Conclusion:** There was a statistically significant difference at 30 min incubation time. This difference may be attributed to the staining properties of the dye. Researchers studying *in vitro* netosis are recommended to use two different extracellular DNA dyes for the quantitative analysis of extracellular DNA formed during short-term incubation.

**Keywords:** Extracellular traps formation, neutrophil leucocytes, PicoGreen, Sytox Orange

**Received:** 20.03.2018

**Accepted:** 17.05.2018

## GİRİŞ

Zorunlu hücre içi yaşayan parazitik protozoon olan *Toxoplasma gondii*; takizoit, bradizoit (doku kisti içinde) ve sporozoit

(ookist içinde) olmak üzere üç farklı enfektif yaşam formuna sahiptir (1). Heteroksen gelişme gösteren *T. gondii*'nin yaşam çemberinde Felidae ailesi son konak, son konağı da kapsayan pek çok omurgalı canlı arakonaktır (1, 2).

**Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** Kader Yıldız E.mail: kaderyildiz@hotmail.com

DOI: 10.5152/tpd.2018.5952

©Telif hakkı 2018 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.turkiyeparazitolderg.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2018 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.turkiyeparazitolderg.org



Çok hücreli canlılar evrimleri sürecinde, mikroorganizmaların yol açtığı enfeksiyonlardan korunmak, vücutlarında çeşitli sebeplere bağlı hasar görmüş ya da nekroze olmuş hücrelerden arınmak için çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmiştir (3, 4). Bunlardan birisi ilk koruyucu tepkiyi oluşturan, hızla gelişen ancak patojene özgüllüğü olmayan doğal bağışıklık, diğeri ise olaya daha geç katılan ancak, etken özgüllüğü olan ve etkin savunma sağlayan kazanılmış bağışıklıktır (5).

Vücuda mikroorganizmaların girmesini engelleyen doğal bağışıklık sisteminin fiziksel bariyerleri organizmanın ilk savunma hattını oluşturur (3). Burunda yer alan kıllar, dış ortama açık solunum ve üreme sisteminden salgılanan mukus, dış kulak kanalında üretilen salgı ile epitel hücreler arasında teşkil etmiş sıkı bağlantılar patojenin vücuda girmesini engellemek için fiziksel bir bariyer görevi görür (3, 6). Bu fiziksel bariyerlere ek olarak ter, tükürük ve gözyaşında bulunan enzimler, mide ve vaginadaki asit ortam, sindirim kanalındaki hidrolitik enzimler patojenlerle savaşta ilk savunma hattının kimyasal bileşenlerini oluşturur (6). Patojenler bu ilk savunma hattını atlatmayı başardığında devreye giren ikinci savunma hattı olan hücreli savunma, fagositoz ve antimikrobiyal proteinlerinin aktivitesiyle patojenle mücadele eder (6).

Granülositler olarak da adlandırılan ve parçalı çekirdeğe sahip olan polimorf nükleer lökositler (PMN) üç farklı hücre grubunu barındırır; nötrofil, eozinofil ve bazofil. İnsan ve diğer memelilerin kan dolaşımında en fazla oranda bulunan nötrofiller (%60-70) yangı bölgesine ilk ulaşan hücrelerdir. Bu hücreler akut enfeksiyon esnasında patojene karşı konakta şekillenen ilk yanıtta önemli rol oynar (7-9). Nötrofillerde patojene karşı üç farklı yanıt şekillenir; fagositoz, degranülasyon ve hücre dışı tuzak gelişimi (10, 11).

Hücre dışı tuzak oluşumu, organizmaya giren patojenlere karşı ve otoyangısal durumlarda gelişmekte ve hücreye ait DNA, histonlar, granüler proteazlar, diğer sitoplazmik ve nükleer proteinleri katıldığı doğal bağışıklık mekanizmasıdır (10, 12). Nötrofiller dolaşımında en bol bulunan lökositler olduğundan bu aktivite daha çok nötrofillerle özleştirilmiş olsa da, mast hücreleri, eozinofil ve makrofaj gibi bağışıklık sistemi hücrelerinde de hücre dışı tuzak oluşumu gözlenmiştir (13-15). Hücre dışı tuzak gelişimi yönünde aktive olan nötrofillerde çekirdek, granüler içerik ve sitoplazma birbirleriyle karışır (10). Daha sonra hücre membranı parçalanarak bulutumsu bir görünüme sahip hücre dışı tuzak yapıları şekillenir (12, 16, 17). Granüler içerikler taşıyan hücre dışı tuzak yapıları, enfeksiyon bölgesindeki patojenlerin vücutta yayılmasını engellemekte ve antimikrobiyal etki göstermektedir (12, 15).

DeneySEL olarak *in vitro* ortamda şekillenen hücre dışı tuzaklar taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve floresans mikroskobu ile görülebilmektedir (10, 18). Ancak hücre dışı tuzakların elektron mikroskobu ile incelenmesinde bunların fibrin iplikçiklerinden ayırt edilmesi oldukça güçtür. Bunun yanı sıra histonlar, myeloperoksidaz ve kromatin iplikçikleri gibi hücre dışı tuzak yapılarına özgü unsurları bu mikroskopla ayırt etmek de mümkün olmamaktadır. Floresans mikroskop hücre dışı tuzakların kantitatif analizinde başarıyla kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan floresans boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatinini dolayısıyla çekirdeğini görünür hale getirirler (3). Aynı zamanda histonlar, MPO ve elastaz gibi unsurlar ilgili floresans işaretli antikolar ile boyanarak tespit edilebilir. *In vitro* ortamda şekillenen hücre dışı

tuzakların kantitatif analizinde ise florometre ve flow sitometre kullanılabilir. Bu cihazlar özel floresans boya ile boyanmış protein, RNA ve DNA konsantrasyonundaki floresans ışımaya ölçer.

Hücre dışı tuzak gelişimi üzerine çalışan araştırmacıların *in vitro* deneylerde şekillenen netosis esnasında gelişen tuzakların kantitatif analizinde farklı DNA boyaları kullandıkları görülmektedir (19-32). Konuyla ilişkin literatürde hücre dışı tuzakların kantitatif analizinde kullanılan bu boyaların etkinliğinin karşılaştırıldığı yayına rastlanmamıştır. Bu çalışmada model olarak *in vitro* ortamda *T. gondii* takizoitleri ile inkube edilen koyun PMN'inde gelişen hücre dışı tuzak yapıları seçilmiştir. Bu modelde ekstrasellüler DNA'nın kantitatif analizi için kullanılan iki farklı floresans boyanın (Sytox Orange ve Picogreen) boyama etkinliğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## YÖNTEMLER

### Polimorf nükleer lökositlerin izolasyonu

Çalışma esnasında koyunlara yapılan uygulamalar için Kırıkale Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'ndan gerekli izin alınmıştır (02.02.2016 tarih ve 16/07 sayı). PMN'in izolasyonu amacıyla klinik olarak sağlıklı görünen 1 yaş üzeri koyunların (n=5) *Vena jugularis*'inden usülüne uygun şekilde EDTA'lı kan tüplerine kan örnekleri alınmış, % 0,2'lik PBS-EDTA solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra Biocoll solüsyonu kullanılarak tabakalandırılmıştır. 22 °C'de 800×g hızda 35 dk süreyle santrifüj sonrası elde edilen PMN arasındaki eritrositler hemolize edilmiş, ozmotik dengeyi düzenleyebilmek için 3 mL HBSS (10x) ilave edilerek santrifüj edilmiştir (4 °C, 400×g, 10 dk). Neubauer hücre sayım kamarası ile elde edilen hücreler sayılmış ve RPMI-1640 kullanılarak 1 ml'lik hacimde 10<sup>6</sup> PMN olacak şekilde sulandırmıştır. Elde edilen PMN'in canlılığı trypan blue solüsyonu ile izole edilen PMN içinde nötrofil oranı ise Diff Quick boya solüsyonu ile tespit edilmiştir.

### *Toxoplasma gondii* takizoitleri

*T. gondii* Rh suşuna ait takizoitler Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'ndan elde edilmiştir. Solüsyonundaki takizoit sayısını belirlemek için Neubauer sayım kamarası kullanılmış ve mL'de 10<sup>6</sup> takizoit olacak şekilde RPMI-1640 kullanılarak sulandırmıştır.

### PMN ve takizoitlerin *in vitro* kültürünün yapılması

PMN ile takizoit süspansiyonu 1:1 oranında steril reaksiyon tüpü içinde alınmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak Zymosan ile aktive edilen PMN, negatif kontrol olarak da herhangi bir kimyasalla karşılaşmamış PMN kullanılmıştır. Çalışmada deney grupları reaksiyon tüpleri ile negatif ve pozitif kontrol örnekleri 37°C sıcaklıkta %5 CO<sub>2</sub> içeren steril inkübatore alınmış ve 30, 60, 90 ve 120 dk süreyle inkube edilmiştir.

### Ekstrasellüler DNA'nın boyanması ve kantitatif ölçümü

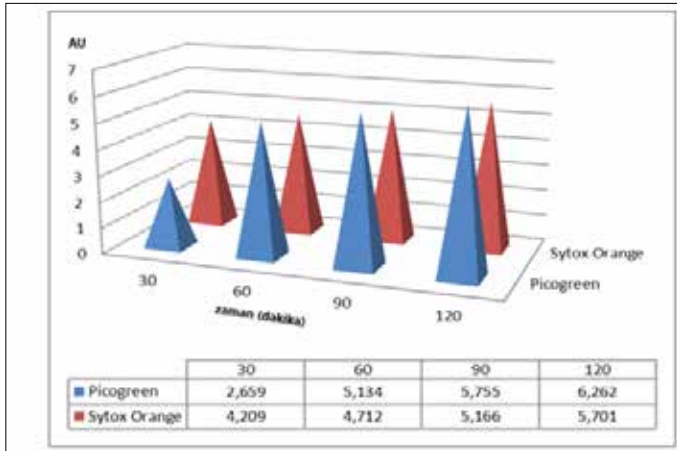
Koyun PMN'i ve takizoit kültürlerinin (1:1 oranda) her bir inkübasyon süresinin bitiminde reaksiyon tüplerine MNase (5 U) eklenmiş ve 15 dk süreyle aynı koşullarda inkübatörde tutulmuştur. Bu süre sonunda reaksiyon tüpleri santrifüj edilmiştir (4 °C, 300×g, 7 dk). Santrifüj sonrasında her bir reaksiyon tüpündeki süpernatant 96'lık immunpleyitin kuyucuklarına aktarılmıştır. Her bir reaksiyon tüpünden çift kuyucuk çalışılmıştır

İnkübasyon esnasında açığa çıkan ekstrasellüler DNA'nın kantitatif ölçümü için kuyucuklardan birine Sytox orange boya solü-

yonu, diğer kuyucuğa ise Picogreen boya solüsyonu eklenmiştir. Pleyt 10 dk süreyle ışık görmeyecek ortamda inkübe edildikten sonra florometreye yerleştirilmiş ve 355/460-485/538 excitation/emmission aralığında okutulmuştur. Bu çalışma farklı zamanda beş kez tekrarlanmıştır.

### İstatistiksel Analiz

Çalışma sonucunda elde edilen veriler tanımlayıcı istatistiksel metodlar (ortalama, standart sapma, medyan, frekans, oran, minimum, maksimum) ile değerlendirilmiştir. Hesaplamalar için The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows, version 21 (IBM Corp.; Armonk, NY, ABD) istatistik paket programı ve NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 (Kaysville, Utah, USA) programı kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen parametrelerin iki grup karşılaştırmalarında Mann Whitney U test, üç ve üzeri grup karşılaştırmalarında ise Kruskal Wallis test kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen parametrelerin takiplerinin incelenmesinde de Friedman test ve ikili karşılaştırmalarında Wilcoxon Signed Ranks test kullanılmıştır. P değerinin <0,05 olduğu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



**Şekil 1.** Koyun PMN'i-*T. gondii* takizoit kültürünün çeşitli sürelerde inkubasyonu esnasında açığa çıkan ekstrasellüler DNA'nın Picogreen ve Sytox Orange boya solüsyonu ile boyanması takinde florometre ile kantitatif ölçümü (AU: Arbitrary Unit).

**Tablo 1.** Deney gruplarında Picogreen ve Sytox Orange boya solüsyonu ile boyanan ekstrasellüler DNA miktarının florometre ölçümlerinden elde edilen sonuçlar

İnkubasyon süresi		Picogreen	Sytox Orange	çp
30.dk	Min-Mak (Medyan)	1,509-3,942 (2,592)	4,036-4,512 (4,251)	0,014
	Ort±Ss	2,659±1,032	4,290±0,193	
60.dk	Min-Mak (Medyan)	3,969-6,363 (5,101)	4,140-6,586 (4,340)	0,624
	Ort±Ss	5,134±1,332	4,712±1,052	
90.dk	Min-Mak (Medyan)	4,868-6,338(5,908)	4,215-6,379 (4,817)	0,327
	Ort±Ss	5,755±0,702	5,166±1,030	
120.dk	Min-Mak (Medyan)	4,534-7,706 (6,403)	4,555-6,873 (5,455)	0,624
	Ort±Ss	6,262±1,566	5,701±0,962	

çMann Whitney U Test

### BULGULAR

Koyunlara ait kan örneklerinden izole edilen PMN'in %95 oranında canlı olduğu ışık mikroskopik muayene ile tespit edilmiştir. Koyu mavi renkte boyanmış parçalı çekirdeğe sahip nötrofillerin izole edilen PMN stoğunda yoğun olduğu (%97) belirlenmiştir.

İki farklı ekstrasellüler DNA boyasının etkinliğini belirlemek amacıyla model olarak seçilen koyun PMN'i ile *T. gondii* takizoit kültüründe farklı inkubasyon sürelerinde (30, 60, 90 ve 120 dk) şekillenen ekstrasellüler DNA miktarı Şekil 1'de görülmektedir. Çalışma sonucunda inkubasyon süresine bağlı (30. dk periyot hariç) açığa çıkan ekstrasellüler DNA'nın kantitatif ölçümünde iki boyanın etkinliği bakımından istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ) (Tablo 1). Deneyde PMN: takizoit kültürünün 30. dakikasında açığa çıkan DNA miktarının Sytox orange boya solüsyonu kullanılarak ölçüldüğünde aynı deney sonuçlarının Picogreen boya solüsyonu ile ölçümüne göre daha yüksek veriler elde edilmiş, sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p=0,014$ ).

### TARTIŞMA

Floresans mikroskopi *in vitro* gelişen hücre dışı tuzakların izlenmesinde başarı ile kullanılmasına rağmen bu tuzak yapılarının kantitatif analizinin de yapılması gerekmektedir. Bu amaçla yapılan florometrik analiz *in vitro* hazırlanan enfeksiyöz etken: PMN kültürlerinin inkubasyonunda şekillenen netosis reaksiyonu esnasında hücre dışı alana çıkan DNA'nın kantitatif ölçülmesine dayanır. Bu reaksiyonda Picogreen, Sytox orange ve Sytox green gibi çeşitli ekstrasellüler DNA boyaları kullanılmaktadır (21, 26, 30). Bunlar hücre dışı alana çıkmış DNA'ya yüksek affiniteyle bağlanabilen, buna karşılık bütünlüğü bozulmamış hücrede yer alan DNA'ya bağlanamayan nitelikteki boyalardır (33).

Çeşitli araştırmacılar tarafından *in vitro* dizayn edilen deneysel netosis çalışmalarda şekillenen ekstrasellüler DNA miktarının kantitatif ölçümü amacıyla farklı boyalar kullanılmış ve ekstrasellüler boya tercihi de herhangi bir kriter ya da özellik belirtilmemiştir (19-32). Bu boyalardan birisi Picogreen'dir (20, 22, 24, 26, 29). Guimaraes-Costa ve ark. (20), insandan elde ettikleri PMN'i *Leishmania amazonensis* promastigotları ile *in vitro* kültüre etmeleri sonucunda ortamda açığa çıkan DNA miktarını Picogreen kullanarak tespit etmiştir. Benzer şekilde *Leishmania donovani*

6. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 173-82. [\[CrossRef\]](#)
7. Appelberg R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends Microbiol* 2007; 15: 87-92. [\[CrossRef\]](#)
8. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801. [\[CrossRef\]](#)
9. Phillipson M, Kuberski P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med* 2011; 17: 1381-90. [\[CrossRef\]](#)
10. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss D.S, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303: 1532-35. [\[CrossRef\]](#)
11. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged sword of innate immunity. *J Immunol* 2012; 189: 2689-95. [\[CrossRef\]](#)
12. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin. *J Cell Biol* 2012; 198: 773-83. [\[CrossRef\]](#)
13. Goldmann O, Medina E. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. *Front Immunol* 2012; 3: 420.
14. Je S, Quan H, Yoon Y, Na Yirang, Kim BJ, Seok SH. Mycobacterium massiliense induces macrophage extracellular traps with facilitating bacterial growth. *PLoS One* 2016; 11: e0155685. [\[CrossRef\]](#)
15. Yıldız K. Netosis: Nötrofilin patojenle savaşta kullandığı alternatif savunma yöntemi. *Türkiye Parazit Derg* 2016; 40: 158-62. [\[CrossRef\]](#)
16. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 577-82. [\[CrossRef\]](#)
17. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; 176: 231-41. [\[CrossRef\]](#)
18. Puralı N. Fonksiyonel hücre görüntüleme teknikleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004; 35: 107-13.
19. Baker VS, Imade GE, Molta NB. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in Plasmodium falciparum infected children under six years of age. *Malar J* 2008; 7: 41. [\[CrossRef\]](#)
20. Guimarães-Costa AB1, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceição-Silva F, et al. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Send to Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 6748-53. [\[CrossRef\]](#)
21. Behrendt JH, Ruiz A, Zahner H, Taubert A, Hermosilla C. Neutrophil extracellular trap formation as innate immune reactions against the apicomplexan parasite Eimeria bovis. *Vet Immun Immunopathol* 2010; 133: 1-8. [\[CrossRef\]](#)
22. Gabriel C, McMaster WR, Girard D, Descoteaux A. Leishmania donovani promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *J Immunol* 2010; 185: 4319-27. [\[CrossRef\]](#)
23. Abi Abdallah DS, Lin C, Ball CJ, King MR, Duhamel GE, Denkers EY. Toxoplasma gondii triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infect Immun* 2012; 80: 768-77. [\[CrossRef\]](#)
24. Munoz Caro T, Hermosilla C, Silva LMR, Cortes H, Taubert A. Neutrophil extracellular traps as innate immune reaction against the emerging apicomplexan parasite Besnoitia besnoiti. *PLoS One* 2014; 9: e91415. [\[CrossRef\]](#)
25. Munoz Caro T, Silva LM, Ritter C, Taubert A, Hermosilla C. Besnoitia besnoiti tachyzoites induce monocyte extracellular trap formation. *Parasitol Res* 2014; 113: 4189-97. [\[CrossRef\]](#)
26. Silva LMR, Munoz Caro T, Gerstberger R, Vila-Vicosa MJM, Cortes HC, Hermosilla C, et al. The apicomplexan parasite Eimeria arloingi induces caprine neutrophil extracellular traps. *Parasitol Res* 2014; 113: 2797-807. [\[CrossRef\]](#)
27. Morgado FN, Nascimento MT, Saraiva EM, de Oliveira-Ribeiro C, Madeira Mde F, da Costa-Santos M, et al. Are neutrophil extracellular traps playing a role in the parasite control in active American tegumentary leishmaniasis lesions. *PLoS One* 2015; 10: e0133063. [\[CrossRef\]](#)
28. Reichel M, Munoz Caro T, Sanchez Contreras G. Harbour seal (Phoca vitulina) PMN and monocytes release extracellular traps to capture the apicomplexan parasite Toxoplasma gondii. *Dev Comp Immunol* 2015; 50: 106-15. [\[CrossRef\]](#)
29. Munoz Caro T, Lendner M, Dausgschies A, Hermosilla C, Taubert A. NADPH oxidase, MPO, NE, ERK1/2, p38 MAPK and Ca2+ influx are essential for Cryptosporidium parvum induced NET formation. *Dev Comp Immunol* 2015; 52: 245-54. [\[CrossRef\]](#)
30. Wei Z, Hermosilla C, Taubert A, He X, Wang X, Gong P, et al. Canine neutrophil extracellular traps release induced by the apicomplexan parasite Neospora caninum in vitro. *Front Immunol* 2016; 7: 436. [\[CrossRef\]](#)
31. Avila EE, Salaiza N, Pulido J, Rodriguez MC, Diaz-Godinez C, Lacleite JP et al. Entamoeba histolytica trophozoites and lipopeptidophosphoglycan trigger human neutrophil extracellular traps. *PLoS One* 2016; 11: e0158979. [\[CrossRef\]](#)
32. Yıldız K, Gokpınar S, Gazyağcı AN, Babur C, Sursal N, Azkur AK. Role of NETs in the difference in host susceptibility to Toxoplasma gondii between sheep and cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 2017; 189: 1-10. [\[CrossRef\]](#)

promastigotları ile inkube edilen PMN'de şekillenen netosis reaksiyonunda ekstrasellüler DNA Picogreen ile belirlenmiştir (22). Keçi PMN'i ile inkube edilen *Eimeria arloingi* sporozoitleri ve ookistlerine karşı gelişen hücre dışı tuzak yapıları Picogreen ile boyanarak florometrik olarak ölçülmüştür (26). *Besnoitia besnoiti* takizoitleri ile inkube edilen sığır orijinli PMN'de gelişen tuzak yapılarındaki hücre dışı DNA da Picogreen boya ile analiz edilmiştir (24). Benzer şekilde *Cryptosporidium parvum* ookistleri ve sporozoitleri ile *in vitro* kültüre edilen sığır PMN'inde şekillenen hücre dışı tuzakları oluşturan temel unsur olan DNA, Picogreen boya ile boyanarak kantitatif olarak değerlendirilmiştir (29).

Diğer ekstrasellüler DNA boyalarından olan Sytox orange ve Sytox green de *in vitro* netosis çalışmalarında hücre dışı tuzakların ana bileşeni olan DNA'nın kantitatif belirlenmesinde kullanılmaktadır (21, 30). Bu iki DNA boyası nükleik asitlere oldukça affinite göstermekte, sadece plazma membranı yırtılmış hücreleri boyamaktadır. *Eimeria bovis*'e ait sporozoitler, sığırdan izole edilen PMN ile *in vitro* ortamda karşılaştırılmış ve şekillenen ekstrasellüler DNA, Sytox orange kullanılarak florometrik olarak ölçülmüştür (21). *In vitro* inkube edilen köpek orijinli PMN'de *Neospora caninum* takizoitlerin tetiklediği hücre dışı tuzak yapılarındaki ekstrasellüler DNA miktarının kantitatif analizi Sytox green ile yapılmıştır (30).

*Toxoplasma gondii*'nin *in vitro* inkube edilen farklı canlılara ait PMN'lerde hücre dışı tuzak gelişimini tetiklemektedir (23, 28, 32). Fare, insan ve foktan izole edilen PMN'de *T. gondii*'ye karşı şekillenen hücre dışı tuzak yapısının öğelerinden birisi olan ekstrasellüler DNA miktarı Picogreen ile kantitatif ölçülmüştür (23, 28). *T. gondii* ile inkube edilen koyun ve sığır PMN'inde gelişen netosis reaksiyonunda şekillenen hücre dışı tuzak yapılarının omurgasını teşkil eden DNA, Sytox green kullanılarak florometrik olarak analiz edilmiştir (32). Bu çalışmada, Picogreen ve Sytox orange'ın ekstrasellüler DNA'nın kantitatif analizinde etkinliğinin ortaya konulması amaçlanmış ve model olarak seçilen koyun PMN'in-*T. gondii* takizoitleri kültüründe açığa çıkan ekstrasellüler DNA'nın kantitatif analizine ait florometrik ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde (30 dakikalık inkubasyon süresi haricinde) iki boya arasında istatistiksel bir fark tespit edilmemiştir ( $p>0,05$ ). Çalışmada PMN: takizoit kültürünün 30. dakikasında açığa çıkan DNA miktarının Sytox orange boya solusyonu kullanılarak daha yüksek ölçüldüğü ve bu sonucu istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p<0,5$ ). Bu durumun sebebinin kullanılan boyaya ait boyama özelliği ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada seçilen her iki boya ölü hücrelerden açığa çıkan DNA'ya affinite gösteren floresans boyalardır. PMN'de hücre dışı tuzaklar patojenle karşılaşmayı takiben yaklaşık 10 dakika içinde şekillenmeye başlamaktadır (15). Bu aşamada patojenle reaksiyona girerek tuzak oluşturmaya başlayan PMN aktive olmaktadır. Çalışmada kullanılan Sytox Orange'ın inkubasyonun başlangıcında patojenle karşılaşmasını takiben hücre dışı tuzak oluşturma yönünde ilerleyen ve böylelikle ölüm sürecine giren hücreleri boyamada Picogreen'den daha etkin olduğu kanaatine varılmıştır.

## SONUÇ

Canlının vücuduna giren patojen ajanlara mücadele ettiği yollarından birisi olan netosis ve bu esnada şekillenen hücre dışı tuzak yapılarının mekanizmasının anlaşılması güncel ve araştırmacıların üzerinde durduğu önemli giderek artan bir konudur. Farklı pa-

razitlerin çeşitli canlı türlerine ait PMN'de şekillendirdiği hücre dışı tuzaklara ilişkin bazı kantitatif sonuçlar verilmektedir. Çalışmalarda kullanılan ekstrasellüler DNA boyasının sonuçlar üzerine etkisi olup olmadığı hakkında bilgi literatürde mevcut değildir. Parazitlerle ilişkili *in vitro* netosis çalışmalarında yaygın kullanılan floresans özellikte DNA boyalarından ikisinin (Sytox orange ve Picogreen) etkinliğinin araştırıldığı bu çalışma sonucunda deneyin 30 dakikalık inkubasyon periyodu dışındaki sürelerde istatistiksel yönden önemli bir farklılığa rastlanmamıştır.

**Etik Komite Onayı:** Çalışma esnasında koyunlara yapılan uygulamalar için Kırıkkale Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'ndan gerekli izin alınmıştır (02.02.2016 tarih ve 16/07 sayı).

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir – K.Y., P.A.; Tasarım – K.Y., P.A.; Denetleme – K.Y.; Kaynaklar – P.A.; Malzemeler – K.Y., P.A.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – P.A.; Analiz ve/veya Yorum – P.A., K.Y.; Literatür Taraması – P.A.; Yazıyı Yazan – P.A., K.Y.; Eleştirel İnceleme – K.Y.

**Teşekkür:** T. gondii takizoitlerinin temininde yardımcı olan Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Parazitoloji Laboratuvarı'ndan Uzman Dr. Cahit Babür'e teşekkür ederiz. Bu çalışma yüksek lisans tez çalışmasından özetlenmiştir.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Bu çalışma Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2016-144).

**Ethics Committee Approval:** All animal handling procedures were approved by the Kırıkkale University Local Ethics Committee for Animal Experiments (02.02.2016, Protocol no: 16/07).

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Concept – K.Y., P.A.; Design – K.Y., P.A.; Supervision – K.Y.; Resources – P.A.; Materials – K.Y., P.A.; Data Collection and/or Processing – P.A.; Analysis and/or Interpretation – P.A., K.Y.; Literature Search – P.A.; Writing Manuscript – P.A., K.Y.; Critical Review – K.Y.

**Acknowledgement:** We would like to thank Dr. Cahit Babür from the Public Health Agency of Turkey Parasitology Laboratory, which helped in the provision of *T. gondii* tachyzoites. This study is summarized from a thesis.

**Conflict of Interest:** Authors have no conflicts of interest to declare.

**Financial Disclosure:** This study was financially supported by the Scientific Research Committee of Kırıkkale University (Project no: 2016-144).

## KAYNAKLAR

1. Dubey JP. Toxoplasmosis in Animals and Humans, 2nd Ed, CRC Press, Boca Raton, FL; 2010. p: 1-313.
2. Sibley LD, Khan A, Ajioka JW, Rosenthal BM. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2009; 364: 2749-61. [CrossRef]
3. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Basic Immunology Functions and Disorders of the Immune System. Temel İmmünoloji İmmün Sistem İncelemeleri ve Bozuklukları. 4th ed. Çeviren: Camcioğlu Y, Deniz G, Güneş Tıp Kitapevleri Ankara; 2016. s:17-40.
4. Eales JC. Immunology for Life Scientists, 2nd. ed. John Wiley & Sons, Inc, USA; 2005. p:75.
5. Simon EJ, Dickey JL, Hogan KA, Reece JB. Campbell Essential Biology with Physiology. Campbell Temel Biyoloji Fizyoloji İlaveli. 5th ed. Çeviren: Gündüz E, Türkan İ, Palme Yayıncılık Ankara; 2016.



# The Importance of Checking *Leishmania* Promastigotes Viability in the Proteomics Analysis of Secretions

Sekresyonların Proteomiks Analizinde *Leishmania* Promastigotların Canlılıklarının Kontrol Edilmesinin Önemi

Sajad Rashidi<sup>1</sup> , Kurosh Kalantar<sup>2</sup> , Davood Rostamzadeh<sup>3</sup> , Gholamreza Hatam<sup>4\*</sup> 

<sup>1</sup>Department of Parasitology and Mycology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

<sup>2</sup>Department of Immunology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

<sup>3</sup>Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

<sup>4</sup>Basic Sciences in Infectious Diseases Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

**Cite this article as:** Rashidi S, Kalantar K, Rostamzadeh D, Hatam G. The Importance of Checking *Leishmania* Promastigotes Viability in the Proteomic analysis of Secretions. *Turkiye Parazit Derg* 2018; 42(4): 245-8.

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of the present study was to compare the efficacy of checking the viability of *Leishmania* promastigote by flow cytometry using propidium iodide (PI) and microscopic method using trypan blue (TB) before proteomics analysis of the secretions.

**Methods:** The promastigotes ( $6 \times 10^9$ ) of *Leishmania infantum* in the exponential growth phase were transferred to serum-free media. Then, the viability of promastigotes was checked and compared with flow cytometry and microscopic method at 0, 2, 3, 4, 5, and 72 h.

**Results:** Flow cytometry did not show many dead cells at 0 to 4 h, and the viability was approximately 98%. The percentage of the dead promastigotes increased to 8% at 5 h and 17% at 72 h. Meanwhile, the microscopic method using TB did not show any dead cell after 4 and 72 h, and the viability was 100%.

**Conclusion:** The present study confirms the importance of flow cytometry using PI in checking the viability of *Leishmania* promastigotes, especially before the proteomics analysis of the secretions. It also shows that flow cytometry using PI is more sensitive than microscopic method using TB.

**Keywords:** Flow cytometry, trypan blue, viability, *Leishmania*, proteomics

**Received:** 30.12.2018

**Accepted:** 18.06.2018

## ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, sekresyonların proteomik analizinden önce, *Leishmania* promastigotunun canlılığının tripan mavisi (TB) kullanılan mikroskopik yöntem ve propidium iyodid (PI) kullanılan akış sitometrisi ile kontrol edilmesinin etkinliğini karşılaştırmaktır.

**Yöntemler:** Üstel büyüme fazında *Leishmania infantum* promastigotları ( $6 \times 10^9$ ) serumuz ortama aktarıldı. Daha sonra promastigotların canlılığı 0, 2, 3, 4, 5 ve 72nci saatlerde akış sitometrisi ve mikroskopik yöntemle kontrol edildi ve karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Akış sitometrisi 0 ila 4 saat arasında çok ölü hücre göstermedi ve canlılık yaklaşık % 98 idi. Ölü promastigotların yüzdesi 5 saatte %8'e ve 72 saatte %17'ye yükseldi. Diğer yandan, TB kullanan mikroskopik yöntemde 4 ve 72 saat sonra herhangi bir ölü hücre gözlenmedi ve canlılık % 100 idi.

**Sonuç:** Bu çalışma, özellikle sekresyonların proteomik analizinden önce, *Leishmania* promastigotlarının canlılığının kontrol edilmesinde PI kullanılarak uygulanan akış sitometrisinin önemini doğrulamaktadır. Ayrıca PI kullanılan akış sitometrisinin, TB kullanılan mikroskopik yöntemden daha duyarlı olduğunu da göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Akış sitometrisi, tripan mavisi, canlılık, *leishmania*, proteomik

**Geliş Tarihi:** 30.12.2018

**Kabul Tarihi:** 18.06.2018

The abstract of this article was presented at the 3<sup>rd</sup> International and the 10<sup>th</sup> National Congress of Parasitology and Parasitic Diseases of Iran (NICOPA10, no.: HN10104350404).

Bu yazının özeti 3. Uluslararası ve 10. Ulusal İran Parazitoloji ve Paraziter Hastalıklar Kongresi'nde sunulmuştur (NICOPA10, no.: HN10104350404).

**Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Gholamreza Hatam E.mail: hatamghr@sums.ac.ir

DOI: 10.5152/tpd.2018.5834

©Copyright 2018 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.turkiyeparazitolog.org

©Telif hakkı 2018 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.turkiyeparazitolog.org web sayfasından ulaşılabilir.

## INTRODUCTION

Leishmaniasis is a major parasitic vector-borne disease caused by a family of obligate intracellular dimorphic protozoa of the genus *Leishmania*. The life cycle of *Leishmania* includes extracellular promastigote in sandflies and amastigote stage that presents in mammals within mononuclear phagocyte cells (1, 2). To our knowledge, there is no effective treatment with reduced side effect for leishmaniasis in the literature. Therefore, improving the diagnosis, treatment, and vaccination of leishmaniasis is urgent for the control and prevention of this disease (3, 4).

Nowadays, most studies on *Leishmania* are performed using promastigote as this form is more adaptable in vitro, and the required technology for its cultivation is not tedious and laborious (5). The antigenic targets in secretions of *Leishmania* promastigotes are suitable sources for designing vaccines and diagnosing leishmaniasis since these antigens are considered as stimulants of the immune system (6, 7). Therefore, the preparation of excretory-secretory antigens from live promastigotes (viable cells  $\geq 98\%$ ) is a considerable advantage, especially in the proteomics research on secretions of *Leishmania* parasites.

Proteome refers to a set of proteins that have been encoded by the genome (8) and defined as the analysis of proteins to determine their unique identity, quantity, function, and interaction (9). Evidence also shows that proteomics is practically suitable for the analysis of the proteome of the *Leishmania* genus (10). Recently, researchers have attempted to use this technique to identify immunodominant antigens in *Leishmania* parasites and to introduce new targets for vaccines (11).

The preparation of a high-quality sample is an important issue in the proteomics approaches (12). Therefore, it is very essential to provide a reliable method that can determine the viability of *Leishmania* promastigotes before proteomics analysis of the secretions.

For performing some experimental procedures, checking cell viability is the first step (13). Most of the viability tests are based on the integrity of the cell membranes. Vital dyes, such as trypan blue (TB), can penetrate selectively into the dead cells, but the viable cells do not permit these dyes to penetrate the cells so the live cells remain unstained. Therefore, optical microscopy methods are used to count the number of stained and unstained cells using a Neubauer chamber (14).

One of the major practical assays widely used to check the viability is flow cytometry with propidium iodide (PI) staining (15). The PI function is similar to TB and penetrates the dead cells that produce a complex with DNA (16). The advantages of the PI assay are its high accuracy and the possibility of running many samples in a short time. There are only few studies in the literature that have been conducted to improve the TB exclusion test by making the adaptations with flow cytometry (17).

To the best of our knowledge, few studies have checked the viability of *Leishmania* promastigotes before proteomics analysis of the secretions (18-20). Based on various results in this regard, the aim of the present study was to evaluate and to check the viability of *Leishmania infantum* promastigotes by flow cytometry using PI in comparison to microscopic method using TB.

## METHODS

### Sample preparation and promastigote culture

*L. infantum* strain (MCAN/IR/07/Moheb-gh) was provided by the Department of Parasitology and Mycology of Medical Sciences, Shiraz, Iran. *L. infantum* promastigotes were mass cultivated at 25 °C in the Schneider's insect culture media (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) supplemented with 20% (v/v) bovine serum (heat inactivation requires the serum to be at 56 °C for 50 min), 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. Then,  $6 \times 10^9$  promastigotes were collected in the exponential growth phase (day 3) by centrifugation at  $2000 \times g$  for 10 min at 4 °C and washed three times with RPMI-1640 (Shellmax Co., China) serum-free media (21).

Washed promastigotes were transferred to 10 mL RPMI-1640 serum-free media for secretions assay. The number of promastigotes was determined by a Neubauer hemocytometer (22). Then, the viability of promastigotes was indicated at 0, 2, 3, 4, 5, and 72 h by flow cytometry using PI and microscopic method using TB.

### Flow cytometry assay using PI

Ten thousand promastigotes in 500 µL of the RPMI-1640 serum-free media were incubated in the presence of 5 µL PI solution (1 mg/mL; Sigma Chemicals Co.) for 5 min at 23-25 °C (19). Suspended promastigotes were run by flow cytometry (BD FACSCalibur®, USA) set to excitation at 493 nm and emission at 636 nm wavelengths. The results were analyzed by the FlowJo software, version 7 (LLC, USA) at 0, 2, 3, 4, 5, and 72 h.

### Microscopic method using TB

In the TB exclusion test, 10 µL of TB was added to 10 µL of RPMI-1640 serum-free media containing 10,000 promastigotes, and the viability was immediately determined at 0, 2, 3, 4, 5, and 72 h (23). In PI and TB experiments, the promastigotes that were exposed to methanol were used as a positive control.

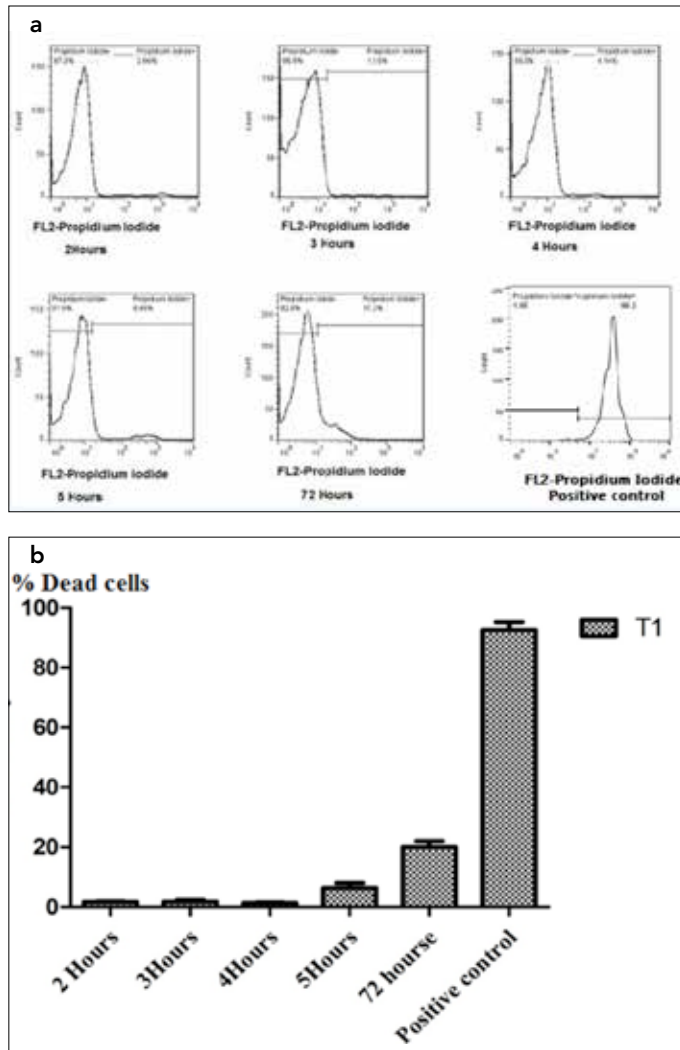
### Statistical Analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments. The statistical significant difference between the groups was evaluated using the GraphPad software (GraphPad San Diego, CA, USA). The statistical test was evaluated using the one-way analysis of variance. A  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

In the present study, the results showed that the PI can precisely discriminate dead promastigotes against viable promastigotes. Interestingly, the percent of dead cells using PI was shown to be time dependent. The cell viability using PI was approximately 98% at 0, 2, 3, and 4 h. However, the viability declined to 92% and 83% after 5 and 72 h, respectively (Figures 1a, b).

Furthermore, the same experiment was performed in regard to TB to evaluate the viability. The percent of the viability of promastigotes in respect to TB was not inconsistent with the PI results. Surprisingly, all promastigotes were viable after 5 and 72 h. In the positive control, the dead cells were measured at approximately 98% by flow cytometry using PI (Figures 1a, b) and 100% by microscopic method using TB.



**Figure 1. a, b.** The results of flow cytometry with PI for checking the viability of *L. infantum* promastigotes at 2, 3, 4, 5, and 72 h and positive control (a) Values are expressed as mean±SD of three independent experiments (b).

## DISCUSSION

Some proteomics studies in *Leishmania* parasites present different antigens that could be effective in the development of vaccines, drugs, and diagnosis of leishmaniasis (7, 24-27). Obtaining secretions from the viable cells is pivotal for having a good interpretation of the results of proteomics experiments (28). Since the contamination of secretions with dead parasites leads to some unreliable data, checking the viability is necessary in this regard.

A proteomics research on the secretions of *Leishmania* promastigotes did not use a precise method to check the viability of promastigotes (29). The findings by Cuervo et al. (18) showed that the best time point for collecting secretions is 3 h based on the TB method. However, our findings indicated that the microscopic method using TB cannot detect dead cells at 3 h, and the accuracy of the results will probably be decreased.

In 2015, Kumar et al. (19) detected the immunostimulant antigens in soluble exogenous antigens in *Leishmania donovani* and used

the microscopic method to check the viability of promastigotes. Their findings identified that the appropriate time for the evaluation of viability is approximately 72 h. Although our microscopy results were in accordance with their study, the flow cytometry results showed that 17% of promastigotes are not viable after 72 h. The microscopic method using TB appears to be imprecise and can lead to an overestimation of the live cells, especially in cases in which we intend to check the viability of many cells (30).

Our findings for PI are somehow in line with the study by Braga et al. (20). They used the flow cytometry assay to check the viability of promastigotes within 2–8 h and proposed that the optimum time for collecting the promastigote secretions is 6 h (19).

To our knowledge, few studies have been conducted to improve the TB exclusion test using flow cytometry (17). They suggested that using TB in flow cytometry could also be precise. However, the use of TB in flow cytometry based on the literature is not common. In addition, they did not compare their results with PI.

## CONCLUSION

The present study proposes and confirms that flow cytometry using PI staining should be prioritized for checking the viability of promastigotes in the proteomics analysis of *Leishmania* secretions. In addition, our findings proved that the optimum incubation time is 4 h for obtaining secretions without many dead cells.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Concept – S.R., G.H.; Design – S.R., G.H.; Supervision – G.H.; Resources – G.H.; Materials – G.H.; Data Collection and/or Processing – S.R., K.K., D.R., G.H.; Analysis and/or Interpretation S.R., K.K.; Literature Search S.R.; Writing Manuscript – S.R., K.K., G.H.; Critical Review – G.H.

**Acknowledgements:** We hereby gratefully acknowledge Dr. Jose Maria Alunda Rodriguez for his helpful discussion and comments on the manuscript.

**Conflict of Interest:** Authors have no conflicts of interest to declare.

**Financial Disclosure:** This work was supported by Shiraz University of Medical Sciences (Grant No: 94-7597).

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir – S.R., G.H.; Tasarım – S.R., G.H.; Denetleme – G.H.; Kaynaklar – G.H.; Malzemeler – G.H.; Veri Toplanması ve/veya İşlenmesi S.R., K.K., D.R., G.H.; Analiz ve/veya Yorum – S.R., K.K.; Literatür Taraması – S.R.; Yazıyı Yazan – S.R., K.K., G.H.; Eleştirel İnceleme – G.H.

**Teşekkür:** Dr. Jose Maria Alunda Rodriguez'e makaleye yaptığı tartışma ve yorumlar için minnetle teşekkür ediyoruz.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Bu çalışma Şiraz Üniversitesi tarafından desteklenmiştir (No: 94-7597).

## REFERENCES

1. Beyhan YE, Çelebi B, Ergene O, Mungan M. Seroprevalance of Leishmaniasis in Dogs from Hatay and Burdur Provinces of Turkey and Northern Cyprus. *Turkiye Parazitol Derg* 2016; 40: 9-12. [CrossRef]

2. Tlamçani Z, Er-Rami M. The current status of cutaneous leishmaniasis in Morocco. *Turkiye Parazitol Derg* 2014; 38: 5-8. [\[CrossRef\]](#)
3. Alkawahaj A, Larbi E, Al-Gindan Y, Abahussein A, Jain S. Treatment of cutaneous leishmaniasis with antimony: intramuscular versus intraleisional administration. *Ann Trop Med Parasitol* 1997; 91: 899-905. [\[CrossRef\]](#)
4. Rasouli M, Hoseini AZ, Kazemi B, Alborzi A, Kiany S. Expression of recombinant heat-shock protein 70 of MCAN/IR/96/LON-49, a tool for diagnosis and future vaccine research. *Iran J Immunol* 2009; 6: 75-86.
5. Mohammadi-Ghalehbin B, Hatam GR, Sarkari B, Mohebal M, Zarei Z, Jaberipour M, et al. A *Leishmania* infantum FML-ELISA for the detection of symptomatic and asymptomatic canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Iran. *Iran J Immunol* 2011; 8: 244-50.
6. Gour JK, Kumar V, Singh N, Bajpai S, Pandey HP, Singh RK. Identification of Th1-responsive leishmanial excretory-secretory antigens (LESAs). *Exp Parasitol* 2012; 132: 355-61. [\[CrossRef\]](#)
7. Rashidi S, Kalantar K, Hatam G. Using proteomics as a powerful tool to develop a vaccine against Mediterranean visceral leishmaniasis. *J Parasit Dis* 2018; 42: 162-70. [\[CrossRef\]](#)
8. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1996; 13: 19-50. [\[CrossRef\]](#)
9. Herosimczyk A, Dejeans N, Sayd T, Ozgo M, Skrzypczak W, Mazur A. Plasma proteome analysis: 2D geld and chips. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57: 81-93.
10. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005; 366: 1561-77. [\[CrossRef\]](#)
11. Gupta SK, Sisodia BS, Sinha S, Hajela K, Naik S, Shasany AK, et al. Proteomic approach for identification and characterization of novel immunostimulatory proteins from soluble antigens of *Leishmania donovani* promastigotes. *Proteomics* 2007; 7: 816-23. [\[CrossRef\]](#)
12. Chandramouli K, Qian PY. Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity. *Hum Genomics Proteomics* 2009; 2009.
13. Lévesque A, Paquet A, Pagé M. Measurement of tumor necrosis factor activity by flow cytometry. *Cytometry* 1995; 20: 181-4. [\[CrossRef\]](#)
14. Tennant JR. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation* 1964; 2: 685-94. [\[CrossRef\]](#)
15. Edidin M. A rapid, quantitative fluorescence assay for cell damage by cytotoxic antibodies. *J Immunol* 1970; 104: 1303-6.
16. Fried J, Perez AG, Clarkson BD. Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide. Properties of the method and mathematical analysis of the data. *J Cell Biol* 1976; 71: 172-81. [\[CrossRef\]](#)
17. Avelar-Freitas B, Almeida VG, Pinto MCX, Mourão FAG, Massensini AR, Martins-Filho OA, et al. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Braz J Med Biol Res* 2014; 47: 307-15. [\[CrossRef\]](#)
18. Cuervo P, De Jesus JB, Saboia-Vahia L, Mendonça-Lima L, Domont GB, Cupolillo E. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania* (Viannia) braziliensis promastigotes. *J Proteomics* 2009; 73: 79-92. [\[CrossRef\]](#)
19. Kumar A, Samant M, Misra P, Khare P, Sundar S, Garg R, et al. Immunostimulatory potential and proteome profiling of *Leishmania donovani* soluble exogenous antigens. *Parasite Immunol* 2015; 37: 368-75. [\[CrossRef\]](#)
20. Braga MS, Neves LX, Campos JM, Roatt BM, Soares RDdOA, Braga SL, et al. Shotgun proteomics to unravel the complexity of the *Leishmania* infantum exoproteome and the relative abundance of its constituents. *Mol Biochem Parasitol* 2014; 195: 43-53. [\[CrossRef\]](#)
21. Rashidi S, Kalantar K, Hatam G. Achievement amastigotes of *Leishmania* infantum and investigation of pathological changes in the tissues of infected golden hamsters. *J Parasit Dis* 2018; 42: 187-95. [\[CrossRef\]](#)
22. Kaneshiro ES, Wyder MA, Wu Y-P, Cushion MT. Reliability of calcein acetoxy methyl ester and ethidium homodimer or propidium iodide for viability assessment of microbes. *J Microbiol Methods* 1993; 17: 1-16. [\[CrossRef\]](#)
23. Louis KS, Siegel AC. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol Biol* 2011; 740: 7-12. [\[CrossRef\]](#)
24. McNicoll F, Drummelsmith J, Müller M, Madore É, Boilard N, Ouellette M, et al. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania* infantum. *Proteomics* 2006; 6: 3567-81. [\[CrossRef\]](#)
25. El Fakhry Y, Ouellette M, Papadopoulou B. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania* infantum. *Proteomics* 2002; 2: 1007-17. [\[CrossRef\]](#)
26. Kumari S, Kumar A, Samant M, Singh N, Dube A. Discovery of novel vaccine candidates and drug targets against visceral leishmaniasis using proteomics and transcriptomics. *Curr Drug Targets* 2008; 9: 938-47. [\[CrossRef\]](#)
27. Kumari S, Kumar A, Samant M, Sundar S, Singh N, Dube A. Proteomic approaches for discovery of new targets for vaccine and therapeutics against visceral leishmaniasis. *Proteomics Clin Appl* 2008; 2: 372-86. [\[CrossRef\]](#)
28. Cuervo P, Saboia-Vahia L, Silva-Filho FC, Fernandes O, Cupolillo E, De Jesus J. A zymographic study of metalloprotease activities in extracts and extracellular secretions of *Leishmania* (Viannia) braziliensis strains. *Parasitology* 2006; 132: 177-85. [\[CrossRef\]](#)
29. Silverman JM, Chan SK, Robinson DP, Dwyer DM, Nandan D, Foster LJ, et al. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol* 2008; 9: R35. [\[CrossRef\]](#)
30. Kim JS, Nam MH, An SSA, Lim CS, Hur DS, Chung C, et al. Comparison of the automated fluorescence microscopic viability test with the conventional and flow cytometry methods. *J Clin Lab Anal* 2011; 25: 90-4. [\[CrossRef\]](#)

# Farklı Sıvı Besiyerlerinde *Trypanosoma cruzi*'nin Üreme Yoğunluklarının Karşılaştırılması ve Kriyoprezervasyonu

Comparison of Reproduction Densities in Different Liquid Media of *Trypanosoma cruzi* and Cryopreservation

Ahmet Özbilgin<sup>1</sup> , Tuğba Kaya<sup>1</sup> , İbrahim Çavuş<sup>1</sup> , Ahmet Yıldırım<sup>1</sup> , Necati Özpınar<sup>2\*</sup> 

<sup>1</sup>Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Ana Bilim Dalı, Manisa, Türkiye

<sup>2</sup>Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Sivas, Türkiye

**Cite this article as:** Özbilgin A, Kaya T, Çavuş İ, Yıldırım A, Özpınar N. Comparison of Reproduction Densities in Different Liquid Media of *Trypanosoma cruzi* and Cryopreservation. Türkiye Parazitol Derg 2018; 42(4): 249-53.

## ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmada *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) suşunun gerek kültürde canlılık süresi gerekse üreme hızı bakımından en iyi sıvı besiyeri ortamını tespit etmek ve çalışılan suşun kriyoprezervasyonunu sağlamak amaçlanmıştır.

**Yöntemler:** *T. cruzi* suşu ticari olarak satın alınan RPMI 1640, Medium 199 (M199), Schneider's Insect Medium (SİM), Nutrient Broth (NB), Brain Heart Infusion Broth (BHİB) olmak üzere beş farklı sıvı kültür ortamında üreme yoğunlukları bakımından değerlendirildi. Parazit kültürleri gün aşırı olarak 24 gün boyunca takip edildi. *T. cruzi* suşunun kriyoprezervasyonu da yapılarak altı ay sonra canlılık durumu test edildi.

**Bulgular:** *T. cruzi* epimastigotlarının NB ve BHİB besiyerlerinde üremediği tespit edildi. İlk 10 günlük veriler incelendiğinde RPMI 1640, M199, SİM besiyerlerinde üreme potansiyeli açısından önemli bir fark gözlenmedi. RPMI 1640 besiyeri 12 ile 24'üncü günler arasında en iyi üremenin görüldüğü besiyeri oldu. Parazitin 18'inci gün itibarıyla form değiştirerek amastigot forma dönüştüğü, 24'üncü günde amastigot yoğunluğunun en üst seviyeye ulaşarak üremenin durduğu tespit edildi. *T. cruzi* suşunun kriyoprezervasyonu sonucunda altı ay sonra *T. cruzi* suşunun canlılığını koruduğu tespit edildi.

**Sonuç:** *T. cruzi* suşunun epimastigot formu ile planlanan araştırmalarda öncelikle RPMI 1640 besiyerinin daha sonra M199 ve SİM besiyerlerinin tercih edilmesinin uygun olacağı kanısına varılmıştır. Epimastigot formu ile yapılacak çalışmalar için çalışma planının 18. güne kadar, amastigot formu ile yapılacak çalışmalarda ise planlamanın 18. günden sonra yapılmasının uygun olacağı düşünülmüştür. Ayrıca *T. cruzi* suşunun epimastigot formunun %15 DMSO yoğunluğunda sıvı azot tankında kriyoprezervasyon yapılarak uzun süre saklanabileceği kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *T. cruzi*, epimastigot, chagas, besiyeri, kriyoprezervasyon, Türkiye

**Geliş Tarihi:** 27.11.2017

**Kabul Tarihi:** 07.09.2018

## ABSTRACT

**Objective:** This study aims to determine the optimum liquid medium for the reproduction of *Trypanosoma cruzi* strains and provide cryopreservation.

**Methods:** The reproduction density of *T. cruzi* strain was evaluated in the following five different commercial liquid culture media: RPMI 1640, Medium 199 (M199), Schneider's Insect Medium (SIM), Nutrient Broth (NB), Brain Heart Infusion Broth (BHİB). Cultures were monitored on every other day for a period of 24 days. Cryopreservation of *T. cruzi* was also performed and viability was tested after six months.

**Results:** Epimastigotes of *T. cruzi* were not found to be produced in NB and BHİB media. Significant difference was not observed among the reproduction potential of RPMI-1640, M199, and SIM after evaluating the data for the first 10 days. Between days 12 and 24, RPMI-1640 was found to be the best reproduction medium. From the 18<sup>th</sup> day onwards, parasites transformed amastigotes. On the 24<sup>th</sup> day, the highest level of amastigote amount was observed, and reproduction was determined to have stopped. As a result of cryopreservation, it was determined that the survival of *T. cruzi* continued after six months.

**Conclusion:** Thus, the selection of RPMI-1640 medium, followed by M199 and SIM media would be appropriate when studying *T. cruzi* epimastigotes. Studies using epimastigotes should be planned for up to 18 days and for those using amastigotes, it would be appropriate to plan the studies after the 18<sup>th</sup> day. Moreover, *T. cruzi* can be cryopreserved with 15% DMSO and stored for a long time in liquid nitrogen.

**Keywords:** *T. cruzi*, epimastigote, chagas, medium, cryopreservation, Turkey

**Received:** 27.11.2017

**Accepted:** 07.09.2018

**Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** Necati Özpınar E.mail: necatiozpınar@gmail.com

DOI: 10.5152/tpd.2018.5750

©Telif hakkı 2018 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.turkiyeparazitolog.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2018 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.turkiyeparazitolog.org



## GİRİŞ

Amerikan Trypanosomiosis'i olarak da bilinen Chagas hastalığı (CH), protozoon parazit *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)'nin neden olduğu zoonotik bir hastalıktır. *T. cruzi*'nin dünya çapında altı milyon ile yedi milyon kişiye bulaştığı tahmin edilmektedir. Hastalık 21 Latin Amerika ülkesinde endemiktir ve önemli bir halk sağlığı problemidir (1). *T. cruzi* enfeksiyonu zoonoz olduğundan hastalığın devamı için insan zorunlu bir ara konak değildir. İnsan rastlantısal olarak enfekte olmaktadır. Vektörü *Triatoma* cinsi Reduviid böcekler Amerika kıtasının güney yarısında ve Güney Arjantin'de bulunmaktadır. Vektör özellikle hayvan barınaklarında yaşamakta ve hayvanları enfekte etmektedir. İnsan enfeksiyonu, vektörün insandan kan emmesi sırasında etkeni dışı ve vücut sıvılarıyla insana bulaştırması sırasında gerçekleşir. *T. cruzi*, 150 tür evcil ve vahşi memeliden izole edilmiştir (2, 3). CH, her ne kadar vektör kaynaklı bir hastalık olarak görülse de özellikle triatomalarla yakın temasta olan kırsal kesimlerde oral bulaşmanın gittikçe arttığı görülmektedir. Gıda kaynaklı bulaş, hastalığın yayılmasında önemli bir unsurdur ve sadece rezervuar barınaklarında değil vektör tarafından ısırılma ihtimali düşük olan bölgelerde bile insanlar için bir tehdit oluşturmaktadır. Bu durum hastalık prevalansının yüksek olmasının nedenlerindedir (4).

Günümüzde CH'nin tanısına yönelik yeni test kitleri ve tanı yöntemleri geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir. *Trypanosoma* epimastigot formlarının aksenik kültürlerde üretilmesi, hastalık tanısının desteklenmesinin yanı sıra, hayvan modelleri dışında parazit suşunun devamı için oldukça önemlidir. Parazit kültürasyonu, parazit biyokimyası, immünolojik çalışmalar ve moleküler testlerde büyük avantaj sağlamaktadır. Ayrıca parazitin metabolik yolları, antijenik değişim mekanizmaları ve hastalığın kontrolü için etkin bir ilaç geliştirilmesi gibi diğer önemli konular ile de araştırma yapmayı mümkün kılmaktadır (5).

Bu çalışmada *T. cruzi* suşunun farklı sıvı besiyerlerinde üreme yoğunlukları araştırılmıştır. Amacımız *T. cruzi* suşunun gerek kültürde canlılık süresi gerekse üreme hızı bakımından en iyi sıvı besiyeri ortamını tespit etmek ve çalışılan suşun kriyoprezervasyonunu sağlamaktır.

## YÖNTEMLER

### T. cruzi suşunun sıvı azot tankından çıkarılıp üretilmesi

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Parazit Bankası'nda sıvı azot tankında saklanan American Type Culture Collection (ATCC) 50825 *T. cruzi* suşunun epimastigot formu sıvı azot tankından uygun koşullar altında çıkarıldı. Çıkarılan kriyovialler hızlı bir şekilde 25°C'lik su banyosunda tamamen çözülene kadar bekletildi. Tüp içeriği konik tüplere aktarıldıktan sonra ürün hacminin üç katı oranında aynı ısıdaki PBS ile karıştırıldı. 800 rpm de beş dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Elde edilen *T. cruzi* suşu, Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) besiyerine ekilerek 25°C'de inkübe edildi.

### Sıvı kültürlerin hazırlanması ve T. cruzi suşunun üreme potansiyelinin değerlendirilmesi

RPMI 1640 (Gibco, USA), Medium 199 (M199, Gibco, USA), Schneider's Insect Medium (SİM, Sigma, USA), Nutrient Broth (NB, Merck, Germany) ve Brain Heart Infusion Broth (BHİB, Fluka, USA) besiyerleri ticari olarak satın alındı. Her bir besiyeri, kullanım talimatına göre hazırlandıktan sonra ekim yapılmadan önce

%10 fetal calf serum (FCS), 200 U penisilin/ml ve 0,2 mg streptomisin/ml eklenip 25 ml'lik flasklara beşer ml olacak şekilde dağıtıldı. NNN besiyerinde üretilen *T. cruzi* epimastigotları, hazırlanan besiyerlerine 10<sup>5</sup> epimastigot/ml olacak şekilde birer ml eklendi ve 25°C'lik etüvde inkübe edildi. Ekimleri yapılan kültür ortamları 24 gün süre ile gün aşırı epimastigot yoğunlukları bakımından değerlendirildi. Değerlendirme, Thoma lamı yardımıyla canlı epimastigotlar sayılarak yapıldı. Ayrıca kültür ortamlarından alınan örnekler giemsa ile boyanarak parazitin morfolojik yapısı değerlendirildi. Çalışmada beş farklı kültür ortamı değerlendirildi. Her kültür ortamı üç tekrarlı çalışıldı.

### T. cruzi suşunun kriyoprezervasyonu

RPMI 1640 besiyerinde üreyen epimastigotların 22'inci günde NNN besiyerine yapılan subkültüründe başarılı bir şekilde ürediği gözlemlendi. NNN besiyerinde üreyen epimastigotlar steril falcon tüplerine aktarıldı ve 4400 rpm 10 dk +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atıldı ve pellet üzerine 10 ml fosfat tampon solüsyonu (PBS) eklenerek homojenize edildi. Yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. Son santrifüjden sonra süpernatant atılarak pellet üzerine 10<sup>5</sup> ml/epimastigot olacak şekilde PBS eklendi. Epimastigot sayısı thoma lamı yardımıyla mikroskopta sayılarak ayarlandı. Hazırlanan epimastigot süspansiyonu üzerine %15 Dimetilsülfoksit (DMSO) eklenerek süspansiyon homojen bir şekilde karıştırıldı. Süspansiyon kriyo tüplerine aktarıldı ve kriyo tüpleri Coolcell kutularına yerleştirilerek -86°C'de bir gece bekletildi. Ertesi gün Coolcell kutularından çıkarılan kriyo tüpleri sıvı azot tankına aktarıldı. Sıvı azot tankına aktarılan *T. cruzi* epimastigotları içeren kriyo tüpü altı ay sonra çıkarılarak 25°C'lik su banyosunda eritildi. Epimastigotların mikroskop altında canlılık ve hareketlilikleri kontrol edildi. Daha sonra NNN besiyerine ekimleri yapılarak 25°C'lik etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı.

### İstatistiksel Analiz

Çalışmamızdan elde edilen veriler GraphPad Prism (v6, California, USA) programına yüklenerek verilerin değerlendirilmesinde Sidak's multiple comparisons testi kullanıldı ve yanılma düzeyi 0,05 olarak alındı.

## BULGULAR

Araştırmamızda beş farklı sıvı besiyeri ortamında *T. cruzi* suşunun üreme yoğunluğu 24 gün süre ile test edildi. Araştırma verileri incelendiğinde *T. cruzi* epimastigotlarının NB ve BHİB besiyerlerinde üremediği tespit edildi. Gruplar arası ilk 10 günlük veriler incelendiğinde RPMI 1640, M199 ve SİM besiyerinde *T. cruzi* epimastigotlarının üreme potansiyeli açısından aralarındaki fark önemsiz bulundu ( $p>0.05$ ). RPMI 1640, M199 ve SİM besiyerlerinin 12'inci gün ile 24'üncü gün arası veriler incelendiğinde RPMI 1640 besiyerinin diğer besiyerlerine göre *T. cruzi* epimastigotlarının üreme yoğunluğu açısından farkı önemli iken ( $p<0.05$ ), M199 ve SİM besiyeri arasındaki fark önemsiz bulundu ( $p>0.05$ , Tablo 1, Şekil 1).

RPMI 1640, M199 ve SİM besiyerinden alınan örnekler giemsa ile boyanarak preparatlar hazırlandı ve mikroskopik olarak incelendi. Mikroskopik inceleme sonucunda 8'inci ve 18'inci günler arasında bol miktarda *T. cruzi* epimastigotları görülürken (Resim 1a), 18'inci ve 20'inci günler arasında bazı epimastigotların amastigot formuna dönüştüğü tespit edildi (Resim 1b). Aynı besiyerlerinde



Kronik evrede teşhisin en az iki serolojik test ile gerçekleştirilmesi gerekir (9). Klinik olarak şüphelenilen ve mikroskopik incelemelerde parazit saptanamayan olgularda parazit kültürasyonunun gerekliliği bildirilmektedir (3). Yapılan bir çalışmada özellikle kronik fazın teşhisinde kültürasyonun serolojik (IFT, CFT, HA) ve xenodiagnozise göre daha iyi sonuçlar verdiği bahsedilmiştir. Hasta gruplarında yapılan taramalarda serolojik testlerden %26, xenodiagnozisten %27,5 oranında pozitiflik saptanırken kültürasyon sonrasında bu oranın %55,08 olduğu tespit edilmiştir (10). Başka bir çalışmada yine hemokültür, xsenodiyagnoze göre daha duyarlı olduğundan bahsedilmiş ancak parazit kültürünün rutinde kullanılabilmesi için geliştirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır (11).

Son yıllarda bazı araştırmacılar, deneysel çalışmaların dışında pratikte de kullanılabilir ve parazitin formunu değiştirmeden uzun süre canlılığını koruyabildiği farklı kültür yöntemleri geliştirmeyi hedeflemişlerdir (5, 12, 13). Ancak yine de bütün çalışmalarda uygulanabilecek tek bir protokol oluşturulamayıp çalışmalar hala devam etmektedir (12). Yapılan bir çalışmada, yeni bir kültür ortamı beş farklı *T. cruzi* klinik izolatu ile test edilmiştir. Geliştirilen kültür ortamına katılan ve LM14 ve LM14B olarak kodlanan maddelerin kültür ortamında parazitin morfolojisini 40 pasaj sonrasında bile uzun süre koruduğu bildirilmiştir (12). Bizim çalışmamızda ise *T. cruzi* suşu RPMI 1640, M199 ve SİM kültür ortamlarında üretildi ve 18'inci günden itibaren üç besiyerinde de parazitin formu değiştirdiği, amastigot forma dönüştüğü tespit edilmiştir. Kültürlerde 24'üncü gün itibarıyla parazitin hemen hemen tamamen amastigot forma dönüştüğü ve üremenin yavaşlayarak durduğu gözlenmiştir.

Parazit kültürleri, bilimsel çalışmalar için büyük önem arz etmektedir. Parazitin aksenik kültürlerde üretilmesi parazit biyokimyası, immünolojik, fizyolojik ve moleküler çalışmalarda büyük avantaj sağlamaktadır. Araştırmamızda birbirinden farklı beş sıvı besiyeri ortamında *T. cruzi* epimastigotlarının üreme potansiyelleri test edilmiş olup bunlardan ikisinde üremenin olmadığı çalışma sonucunda görülmüştür. Çalışmaya alınan diğer üç besiyerinde (RPMI 1640, M199 ve SİM) 24'üncü gün sonunda en iyi üreme potansiyeli RPMI 1640 besiyerinde görülmüş ve üreme potansiyeli açısından M199 ve SİM'e göre anlamlı bir fark oluşturmuştur ( $p < 0.05$ ). Bunun yanı sıra çalışmaya alınan kültür ortamlarında 18'inci günden itibaren parazitin amastigot formunun kültürlerde tespit edilmesi de araştırma bulgularındandır.

Protozoon parazitlerin *in vivo* ve *in vitro* devamlılığı bazı problemleri de beraberinde getirmektedir. Kültürlerde ve model organizmalarda belirli aralıklarla yapılması gereken pasajların, büyük bir iş gücü gerektirmesinin yanı sıra suşların kaybı, bakteri ve mantar kontaminasyonları, parazitin biyolojik ve metabolik özelliklerindeki değişimler bu problemlerden bazılarıdır ve bunların büyük bir kısmı kriyoprezervasyon ile önlenmektedir (14). Protozoon parazitlerin kriyoprezervasyonu ile ilgili birçok çalışma yapılarak kriyoprezervasyonun önemi vurgulanmıştır (15-17). Geliştirilen kriyoprezervasyon yöntemleri ile *Trypanosoma* parazitlerinin 7 yıla kadar canlılıklarını koruduğu belirtilmiştir (18). Biz bu çalışmada laboratuvarımızda rutin olarak kullandığımız kriyoprezervasyon protokolünü belirttik.

## SONUÇ

*T. cruzi* suşunun epimastigot formu ile planlanan araştırmalarda bol sayıda epimastigot elde etmek için öncelikle RPMI 1640 besiyerinin daha sonra M199 ve SİM besiyerlerinin tercih edilmesinin uygun olacağı kanısına varılmıştır. Epimastigot formu ile yapılacak çalışmalar için çalışma planının 18. güne kadar, amastigot formu ile yapılacak çalışmalarda ise planlanan 18. günden sonra yapılmasının uygun olacağı düşünülmüştür. *T. cruzi* suşunun epimastigot formunun %15 DMSO yoğunluğunda sıvı azot tankında kriyoprezervasyonu yapılarak uzun süre saklanabileceği görülmüştür. Bu şekilde saklanan parazitlerin gerektiğinde tekrar canlandırılarak çalışmalarda başarı ile kullanılabilirliği kanısına varılmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir – A.Ö.; Tasarım – A.Ö.; Denetleme – A.Ö.; Kaynaklar – A.Ö., T.K., İ.Ç., A.Y., N.Ö.; Malzemeler – A.Ö., T.K., İ.Ç., A.Y., N.Ö.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – A.Ö., T.K., İ.Ç., A.Y., N.Ö.; Analiz ve/veya Yorum – A.Ö., T.K., İ.Ç., A.Y., N.Ö.; Literatür Taraması – A.Ö., T.K., İ.Ç., A.Y., N.Ö.; Yazıyı Yazan – A.Ö., T.K., İ.Ç., A.Y., N.Ö.; Eleştirel İnceleme – A.Ö., T.K., İ.Ç., A.Y., N.Ö.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Concept – A.O.; Design – A.O.; Supervision – A.O.; Resources – A.O., T.K., I.C., A.Y., N.O.; Materials – A.O., T.K., I.C., A.Y., N.O.; Data Collection and/or Processing – A.O., T.K., I.C., A.Y., N.O.; Analysis and/or Interpretation – A.O., T.K., I.C., A.Y., N.O.; Literature Search – A.O., T.K., I.C., A.Y., N.O.; Writing Manuscript – A.O., T.K., I.C., A.Y., N.O.; Critical Review – A.O., T.K., I.C., A.Y., N.O.

**Conflict of Interest:** Authors have no conflicts of interest to declare.

**Financial Disclosure:** The authors declared that this study has received no financial support.

## KAYNAKLAR

1. WHO. Chagas Disease (American Trypanosomiasis): World Health Organization; 2017. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
2. Dario MA, Rodrigues MS, Barros JH, Xavier SC, D'Andrea PS, Roque AL, et al. Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). *Parasit Vectors* 2016; 9: 477. [CrossRef]
3. Töz SÖ, Ertabaklar H, Özbel Y. Özcel'in tıbbi parazit hastalıkları, Trypanosomiasis. Özcel MA, Özbel Y, Ak M, editörler: Meta Basım, İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği; 2007.
4. de Noya BA, Gonzalez ON, Robertson LJ. *Trypanosoma cruzi* as a foodborne pathogen: Springer, Cham; 2015. ISBN: 978-3-319-23409-0. [CrossRef]
5. Kumar R, Singh J, Singh R, Kumar S, Yadav S. Comparative efficacy of different *in vitro* cultivation media for *Trypanosoma evansi* isolated from different mammalian hosts inhabiting different geographical areas of India. *J Parasit Dis* 2015; 39: 174-8. [CrossRef]

6. Dias JCP. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). Arthropod Borne Diseases: Springer; 2017. p. 245-75.
7. Gomes YM. PCR and sero-diagnosis of chronic chagas' disease biotechnological advances. Appl Biochem Biotechnol 1997; 66: 107-19. [CrossRef]
8. Rassi A, Rezende J, Luquetti A, Rassi Jr A. Clinical phases and forms of Chagas disease. American trypanosomiasis (Chagas disease) One hundred years of research 1st edition Burlington (MA): Elsevier Inc. 2010: 709-41.
9. CDC. Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease): Centers For Disease Control and Prevention; 2017. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/diagnosis.html>.
10. Chiari E, Dias JCP, Lana M, Chiari CA. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. Rev Soc Bras Med Trop 1989; 22: 19-23. [CrossRef]
11. Minter-Goedbloed E, Minter DM, Marshall TF. Quantitative comparison between xenodiagnosis and haemoculture in the detection of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in experimental and natural chronic infections. Trans R Soc Trop Med Hyg 1978; 72: 217-25. [CrossRef]
12. De Paula Lima CV, Batista M, Kugeratski FG, Vincent IM, Soares MJ, Probst CM, et al. LM14 defined medium enables continuous growth of *Trypanosoma cruzi*. BMC Microbiol 2014; 14: 238. [CrossRef]
13. Lemos M, Souza C, da Costa SG, Souto-Padrón T, D'agosto M. Isolation and in vitro culture of trypanosomes from *Leptodactylus ocellatus* from the Atlantic forest in a new experimental culture medium. J Parasitol 2013; 99: 164-7. [CrossRef]
14. Miyake Y, Karanis P, Uga S. Cryopreservation of protozoan parasites. Cryobiology 2004; 48: 1-7. [CrossRef]
15. Filardi LS, Brener Z. Cryopreservation of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms. J Eukaryot Microbiol 1975; 22: 398-401.
16. Raether W, Michel R, Uphoff M. Effects of dimethylsulfoxide and the deep-freezing process on the infectivity, motility, and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res 1988; 74: 307-13. [CrossRef]
17. Santos R, Furtado C, Martins J, Martins A. Influence of the cryopreservation at nitrogen temperature on the vaccinic ability of the "PF" strain of *Trypanosoma cruzi* (author's transl). Rev Bras Pesqui Med Biol 1978; 11: 99-104.
18. Yaeger RG. Long term cryopreservation of the amastigote stages of hemoflagellates. J Eukaryot Microbiol 1988; 35: 114-5. [CrossRef]

# Gastrointestinal Sistem ve Dermatolojik Yakınmaları Olan Hastalarda Blastocystosis Prevalansı ve *Blastocystis* spp. Yoğunluğunun Semptomatolojiye Etkisi

The Prevalance of Blastocystosis among Patients with Gastrointestinal and Dermatologic Complaints and Effects of *Blastocystis* spp. Density on Symptomatology

Varol Tunalı <sup>id</sup>, Eylem Akdur Öztürk <sup>id</sup>, Ayşegül Ünver <sup>id</sup>, Nevin Turgay <sup>id</sup>

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Ana Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

**Cite this article as:** Tunalı V, Akdur Öztürk E, Ünver A, Turgay N. The Prevalance of *Blastocystosis* among Patients with Gastrointestinal and Dermatologic Complaints and Effects of *Blastocystis* Spp. Density on Symptomatology. *Türkiye Parazitol Derg* 2018; 42(4): 254-7.

## Öz

**Amaç:** Blastocystosis diyare, karın ağrısı, gaz hissi gibi non-spesifik belirtilerle ilişkilendirilmektedir. Bu çalışmada, blastocystosisin ürtiker ve gastrointestinal sistem yakınmaları ile olan ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntemler:** Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Parazitoloji Direkt Tanı Laboratuvarı'na, Ocak 2011 ile Temmuz 2016 tarihleri arasında çeşitli gastrointestinal sistem (GIS) ve/veya dermatolojik yakınmalarla başvuran hastaların dışkı örnekleri inceleme sonuçları geriye dönük olarak taranmıştır.

**Bulgular:** Değerlendirilen 37.108 dışkı inceleme raporunun 2.573 tanesinde (%6.93) *Blastocystis* spp. tespit edildiği saptanmıştır. Gastrointestinal belirtileri olan kişiler *Blastocystis* spp. saptanan tüm örneklerin %68.4'ini (1.761 örnek) oluştururken, alerjik ve dermatolojik yakınmaları olan kişiler %30.1'sini (776 örnek) oluşturmaktadır. *Blastocystis* spp. yoğunluğu incelenen dışkılarda gastrointestinal yakınmaları olan hastaların; %2,47'sinde nadir, %21,73'ünde az, %49,65'inde orta, %26,27'sinde ise yoğun *Blastocystis* spp. varlığı saptanmıştır. Dermatolojik yakınmaları olan hastaların ise; %1,35'inde nadir, %22,17'sinde az, %54,29'unda orta, %22,17'sinde de yoğun *Blastocystis* spp. varlığı tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Gastrointestinal ve dermatolojik yakınmaları olan hastaların %75'inden fazlasında dışkıda *Blastocystis* spp. yoğunluğunun orta ve üzerinde olması sebebiyle parazit yoğunluğu ve semptomatoloji arasında pozitif korelasyon olabileceği kanaatine varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Blastocystosis, ürtiker, gastrointestinal semptomlar, parazit yükü

**Geliş Tarihi:** 24.11.2017

**Kabul Tarihi:** 03.10.2018

## ABSTRACT

**Objective:** *Blastocystosis* has been linked with non-specific symptoms, such as diarrhea, abdominal pain, and distention. In this study, we evaluated the relationship between *Blastocystis* spp. with urticaria and intestinal symptoms.

**Methods:** The results of the stool examinations of the patients who were referred to Ege University Medical Faculty Hospital's Medical Parasitology Department Direct Diagnosis Laboratory with gastrointestinal (GIS) and/or dermatologic symptoms between January 2011 and July 2016 were retrospectively scanned.

**Results:** Of the evaluated 37108 stool samples, 2573 (6.93 %) were identified to be positive for *Blastocystis* spp. The patients with gastrointestinal complaints comprised 68.4% of *Blastocystis* spp. positive samples (1.761 samples) while 30.1% of patients had dermatologic symptoms (urticaria) (776 samples). *Blastocystis* spp. density in the non-amplified (without using any stool concentration technique) stool samples of the patients with GIS and dermatological symptoms was as follows: 2.47%, 1.35% rare, 21.73%, 22.17% few, 49.65%, 54.29% medium, 26.27%, and 22.17% dense, respectively.

**Conclusion:** 75.92% and 76.46% of the patients with GIS and dermatological complaints had medium to dense parasite densities in their stool samples respectively. This suggests a positive correlation between parasite density and GIS and dermatologic symptomatology.

**Keywords:** Blastocystosis, urticaria, gastrointestinal complaints, parasite burden

**Received:** 24.11.2017

**Accepted:** 03.10.2018

## GİRİŞ

*Blastocystis* spp. kalın bağırsak epiteli ve lümeninde yaşayan anaerobik bir protozoondur. *Blastocystis* spp.'in tanımlanmış 17 farklı alt-tipinin olduğu ve bunların çeşitli mekanizmalar-

la, konak üzerinde zararlı veya yararlı etkilere sebep olabileceği düşünülmektedir (1). *Blastocystis* spp.'in moleküler yöntemlerle saptanan 17 alt-tipi olmasına rağmen, direkt mikroskopik yöntemler kullanılarak tanımlanan 4 adet formu

**Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** Varol Tunalı E.mail: varoltunalı@gmail.com

DOI: 10.5152/tpd.2018.5702

©Telif hakkı 2018 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.turkiyeparazitolderg.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2018 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.turkiyeparazitolderg.org



bulunmuştur. En kolay tanınan ve dışkı örneklerinde en sık rastlanan vakuoler ve granüler formlara ilave olarak, ameboid ve kist formları da bulunmaktadır (2). Yaşam döngüsü yıllar boyunca tam anlaşılabilen *Blastocystis* spp. için en yaygın kabul gören görüş; ağız yoluyla alınan kistlerin kalın bağırsakta eksiste olarak vakuoler formlara dönüştüğü ve burada ikiye bölünme ile çoğalarak ya vakuoler formda kaldığı veya granüler, ameboid formlara dönüştüğü yönündedir (3). Enkistasyonun kolon içerisinde hangi mekanizmalarda olduğu halen tam anlaşılabilen değildir. Yapılan araştırmalar *Blastocystis* spp.'in anaerobik bir ortamda yaşamasını sağlayan, çift zarla çevrili mitokondri benzeri organeller (MLO) içerdiğini göstermiştir (4). *Blastocystis* spp.'in hücrel kompartmanlarının anaerobik olduğu kadar aerobik solunuma elverişli mitokondriler de içerdiği gösterilmiştir (5).

*Blastocystis* spp.'in gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde dışkı preparatlarında en sık karşılaşılan parazit olduğu bir çok yayında bildirilmiştir (6). Prevalansı gelişmiş ülkelerde %1,5-10, gelişmekte olan ülkelerde ise %30-50 arasında bildirilmekte, patojenliği tartışmalı olmakla birlikte diyare, karın ağrısı, gaz hissi gibi non-spesifik belirtilerle ilişkilendirilmektedir (7). Benzer şekilde *Blastocystis* spp. varlığının kaşıntı, ürtiker ve kronik ürtiker ile bağlantısı bir çok yayında gösterilmiş fakat olası patofizyolojik yollar kesin olarak tanımlanamamıştır (8, 9). Bununla birlikte asemptomatik kolonizasyonun sıklığı, kesin virülans kanıtı olabilecek kamçı, roptri gibi organellerinin bulunmaması, *Blastocystis* spp. tedavisi sonrası hasta şikayetlerinde her zaman gerileme olmaması gibi sebeplerle, bir patojen yerine sağlıklı bağırsak florası elemanı olabileceği tartışılmaktadır (10).

Biz bu çalışmamızda *Blastocystis* spp. pozitifliği ile hastalardaki gastrointestinal sistem (GİS) yakınmaları ve alerjik, dermatolojik semptomlar arasındaki bağlantıyı incelemeyi amaçladık.

## YÖNTEMLER

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Parazitoloji Direkt Tanı Laboratuvarı'na, Ocak 2011 ile Temmuz 2016 tarihleri arasında, çeşitli gastrointestinal sistem ve/veya dermatolojik yakınmalarla başvuran hastaların dışkı örnekleri inceleme sonuçları geriye dönük olarak taranmıştır. Gastrointestinal sistem yakınmaları olan hasta grubu; öncelikle Gastroenteroloji ve Enfeksiyon Hastalıkları bölümlerinden, dermatolojik yakınmaları olan hasta grubu ise, Dermatoloji ve Alerji/İmmünoloji bölümlerinden laboratuvarımıza dışkı incelemesi için yönlendirilmektedir. Laboratuvarımıza gelen tüm dışkı örnekleri ilk olarak herhan-

**Tablo 1.** *Blastocystis* yoğunluğunun gastrointestinal ve dermatolojik yakınmaları olan hastalara göre dağılımı

<i>Blastocystis</i> Yoğunluğu*	Gastrointestinal Yakınmalar (%)	Dermatolojik Yakınmalar (%)
Nadir	2,47	1,37
Az	21,61	22,17
Orta	49,65	54,29
Yoğun	26,27	22,17

\**Blastocystis* Yoğunluğu; herhangi bir sahada görülmesi "nadir", her sahada 1 adet bulunması "az", her sahada 2-4 adet bulunması "orta", her sahada 5 ve fazlası görülmesi ise "yoğun"

gi bir işlem uygulanmadan salin solüsyonu ve lugol boyası ile boyanıp x20 ve x40'lik objektifler aracılığıyla direk mikroskopik incelemeleri yapılmıştır. Bu işlemi takiben, hasta örneklerine formol-etil asetat ile çöktürme işlemi uygulanmış, elde edilen çökelti süspanse edilerek hazırlanan preparatlar, tekrar salin solüsyonu ve lugol boyası ile boyanarak incelenmiştir. İlave olarak tüm örnekler modifiye kinyoun asit fast ve trichrome boyama yöntemleri, immün suprese hasta grubuna ise ayrıca asit-fast trichrome ve modifiye trichrome boyaları uygulanmıştır (11, 12). Salin-lugol, formalin-etil asetat çoğaltma, trichrome boyama ve modifiye kinyoun asit-fast boyama yöntemleri kullanılarak saptanan *Blastocystis* spp. ve eşlik eden diğer parazitler etkenler değerlendirilmeye alınmıştır. Ayrıca çoğaltma yöntemleri uygulanmadan, direk dışkı örneğinden salin-lugol yöntemiyle hazırlanan örneklerde yapılan direk mikroskopik incelemede *Blastocystis* spp.'in herhangi bir formunun; herhangi bir sahada görülmesi "nadir", her sahada 1 adet bulunması "az", her sahada 2-4 adet bulunması "orta", her sahada 5 ve fazlası görülmesi ise "yoğun" olarak belirtilerek, parazit yoğunluğu da kayıt altına alınmıştır. Hastaların cinsiyeti, başvuru tarihi, ilk başvuru klinik, belirtiler ve ko-enfeksiyon varlığı kaydedilmiştir.

Yapılan çalışmanın hasta dosyaları üzerinden retrospektif olarak düzenlenmesinden ötürü, Etik Komite Onayı ve Hasta Onamı formu gerekliliği aranmamıştır.

## İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirmesinde The Statistical Package for the Social Sciences versiyon 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) paket programı kullanılmıştır. Gözlenen ve beklenen frekanslar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı ki-kare testi ile belirlenmiştir. Veriler sayı ve yüzde olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler için anlamlılık sınırı  $p < 0,05$  olarak kabul edilmiştir.

## BULGULAR

Değerlendirilen 37,108 dışkı inceleme raporunun 2,573 tanesinde (%6,93) *Blastocystis* spp. saptanmıştır. *Blastocystis* spp. pozitifliği açısından cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır. *Blastocystis* spp. varlığı saptanan 2573 örneğin 321'inde, *Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica/dispar*, *Enterobius vermicularis*, *Entamoeba coli* ve *Iodamoeba butschlii* parazitleri ile *Blastocystis* spp. birlikteliği (%12,27) izlenmiştir. Bu ko-enfeksiyon olgularının %85'i gastrointestinal sistem yakınmaları ile başvurmuştur. Gastrointestinal belirtileri olan kişiler *Blastocystis* spp. saptanan tüm örneklerin %68,4'ini (1,761 örnek) oluştururken, alerjik ve dermatolojik yakınmaları olan hastalar %30,1'sini (776 örnek) oluşturmaktadır. Geriye kalan %1,5'lik hasta popülasyonu ise diğer bölümlerden laboratuvarımıza gönderilen örnekleri kapsamaktadır. *Blastocystis* spp. varlığının belirgin bir mevsimsel varyasyon göstermediği izlenmiştir ( $p=0,594$ ).

*Blastocystis* spp. yoğunluğu incelenen dışkı örneklerinde gastrointestinal yakınmaları olan hastaların; %2,47'sinde nadir, %21,73'ünde az, %49,65'inde orta, %26,27'sinde ise yoğun *Blastocystis* spp. varlığı saptanmıştır. Dermatolojik yakınmaları olan hastaların ise; %1,35'inde nadir, %22,17'sinde az, %54,29'unda orta, %22,17'sinde de yoğun *Blastocystis* spp. tespit edilmiştir (Tablo 1).

## TARTIŞMA

*Blastocystis* spp.'nin patojenitesi tartışmalıdır. Mikrobiyotanın elemanı olabileceğine işaret eden çalışmalar bulunmakla birlikte (13), çeşitli yayınlarda *Blastocystis* spp.'in disbiozise neden olarak sağlıklı bağırsak işlevlerini bozduğu ve irritabl bağırsak sendromu ve inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi hastalıklara yatkınlığın artmasına sebep olabileceği de gösterilmiştir (7, 14). *Blastocystosis*'in bağırsak bariyer işlevini bozarak gastrointestinal belirtilere neden olduğu düşünülmektedir (15). Bağırsakta *Blastocystis* spp. varlığının immünomodülasyon yaparak çeşitli alerjik ve ürtiker benzeri semptomlara yol açabileceği de belirtilmiştir (16). Çeşitli araştırmalarda, en sık karşılaşılan *Blastocystis* spp. alttipinin ST-3 olduğu gösterilmiştir. Ürtikeryal lezyonlardan ise özellikle ST-2 ve ST-3'ün sorumlu olduğuna işaret edilmektedir (17, 18). *Blastocystis* spp. alt-türlerinin virülans ve konak seçiciliği üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar devam etmekle birlikte, aynı alt-tür içerisinde bile dikkate değer genomik ve metabolomik farklılıklar bulunması, *Blastocystosis* patofizyolojisinin inanıldığından daha karmaşık olduğunu düşündürmektedir (19).

Bu çalışmada dışkılarında *Blastocystis* spp. saptanan hastaların yaklaşık 1/3'ünde alerjik ve/veya dermatolojik şikayetler, 2/3'ünde ise gastrointestinal yakınmalar izlenmiştir; bu durum gastrointestinal sistemde yerleşen bir parazit olan *Blastocystis* spp.'in, dikkat çekici oranda dermatolojik yakınmalara sebep olabileceğini düşündürmektedir. Macaristan'da yapılan benzer bir çalışmada, hasta popülasyonunun %6'sında *Blastocystis* spp. pozitif bulunmuş ve bu hastaların %11.25'inin dermatolojik, %73.75'inin ise gastrointestinal yakınmaları olduğu görülmüştür (20). Komşumuz Yunanistan'da yapılan bir çalışmada ise, akut ürtiker şikayeti ile başvuran bir hastada ameboid formda *Blastocystis* spp. ST-3 saptanmıştır (21). Ülkemizde moleküler yöntemlerin kullanıldığı çalışmalardan birinde semptomatik hasta popülasyonunda *Blastocystis* spp. prevalansı %15.24 bulunmuş ve ST-6 ve ST-7'nin semptomlarla ilişkili temel alt-tip olabileceği sonucuna varılırken (22), bir diğer yayında alt-tipler ve semptomlar arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (23). Her iki çalışmada da en sık rastlanan alt-tip, ST-3 olarak bildirilmektedir. Türkiye'de pediatrik yaş grubunda yapılan bir çalışmada ise kronik spontan ürtiker tanımlı hastaların %10.2'sinde dışkıda parazite rastlandığı ve parazite rastlanan örneklerin %26'sından *Blastocystis* spp.'nin sorumlu olduğu izlenmiştir (24).

Örneklerde çoğaltma yöntemleri uygulanmadan yapılan salin-Lugol incelemelerinde, gastrointestinal sistem ve dermatolojik yakınmaları olan hastaların incelenen dışkılarının 3/4'den fazlasında orta ve yoğun *Blastocystis* spp. varlığı saptanmıştır. Bu durum *Blastocystis* spp. yoğunluğu ve semptomatoloji arasında anlamlı bir bağlantı olabileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda, *Blastocystosis*'in diğer barsak parazitleri ile birlikte saptandığı olguların büyük kısmının GIS yakınmaları ile başvurduğu görülmüş olup, bu durum ko-enfeksiyon varlığının disbiyozis koşullarını destekleyebileceğini düşündürmektedir.

Bağırsak mikrobiyotası üzerinde ökaryotik canlıların etkisi günümüzde yoğun olarak araştırılan bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır (25). Son yıllarda *Blastocystis* spp.'in sağlıklı bir bağırsak florası için gerekli ökaryotik canlılardan biri olduğu görüşü kabul görmeye başlamaktadır (26). Tüm *Blastocystis* spp. alt tiplerinin

flora elemanı mı olduğu yoksa belirli alt-tip ve morfolojilerin mi patolojiyle ilişkilendirilebileceği hala cevaplanmayı bekleyen bir sorudur.

Mikroskopik inceleme yöntemleri kullanılarak yapılan bu retrospektif çalışma, parazit yükünün fazla olduğu olgularda *Blastocystis* spp. varlığının semptomatik olarak özellikle gastrointestinal sistem yakınmalarına ve ikinci sıklıkta dermatolojik yakınmalara sebep olabileceğini göstermektedir. Tedavinin her zaman başarılı olmadığı göz önüne alınarak, farklı semptomlarda tespit edilen *Blastocystis* spp. formlarının moleküler genotiplendirme ile incelenmesi durumunda, semptomlara sebep olan alt tiplerin tanımlanması ve gerekli olgularda farklı tedavi seçeneklerinin denenerek, tedaviye alınan cevabın iyileştirilmesi de mümkün olabilecektir.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir – V.T., E.Ö.A., N.T., A.Ü.; Tasarım – V.T., E.Ö.A.; Denetleme – A.Ü., N.T.; Kaynaklar – V.T., E.Ö.A.; Malzemeler – V.T., E.Ö.A.; Veri Toplanması ve/veya İşlenmesi – V.T., E.Ö.A.; Analiz ve/veya Yorum – V.T., N.T.; Literatür Taraması – V.T., E.Ö.A.; Yazıyı Yazan – V.T., N.T.; Eleştirel İnceleme – V.T., A.Ü., N.T.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Concept – V.T., E.Ö.A., N.T., A.Ü.; Design – V.T., E.Ö.A.; Supervision – A.Ü., N.T.; Resources – V.T., E.Ö.A.; Materials – V.T., E.Ö.A.; Data Collection and/or Processing – V.T., E.Ö.A.; Analysis and/or Interpretation – V.T., N.T.; Literature Search – V.T., E.Ö.A.; Writing Manuscript – V.T., N.T.; Critical Review – V.T., A.Ü., N.T.

**Conflict of Interest:** Authors have no conflicts of interest to declare.

**Financial Disclosure:** The authors declared that this study has received no financial support.



## KAYNAKLAR

1. Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, et al. Genetic Diversity of *Blastocystis* in Livestock and Zoo Animals. *Protist* 2013; 164: 497-509. [CrossRef]
2. Stenzel DJ, Boreham PF. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 563-84. [CrossRef]
3. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 639-65. [CrossRef]
4. Nasirudeen AMA, Tan KSW. Isolation and characterization of the mitochondrion-like organelle from *Blastocystis hominis*. *J Microbiol Methods* 2004; 58: 101-9. [CrossRef]
5. Pérez-Brocail V, Clark CG. Analysis of two genomes from the mitochondrion-like organelle of the intestinal parasite *Blastocystis*: Complete sequences, gene content, and genome organization. *Mol Biol Evol* 2008; 25: 2475-82. [CrossRef]
6. Coyle CM, Varughese J, Weiss LM, Tanowitz HB. *Blastocystis*: To treat or not to treat.. *Clin Infect Dis* 2012; 54: 105-10. [CrossRef]
7. Ustün S, Turgay N. *Blastocystis hominis* and bowel diseases. *Türkiye Parazit Derg* 2006; 30: 72-6.
8. Zuel-Fakkar NM, Abdel Hameed DM, Hassanin OM. Study of *Blastocystis hominis* isolates in urticaria: A case-control study. *Clin Exp Dermatol* 2011; 36: 908-10. [CrossRef]

9. Lepczyńska M, Chen WC, Dzika E. Mysterious chronic urticaria caused by *Blastocystis* spp.? Int J Dermatol 2016; 55: 259-66. [\[CrossRef\]](#)
10. Andersen LO, Stensvold CR. *Blastocystis* in Health and Disease Are We Moving from a Clinical to a Public Health Perspective? J Clin Microbiol 2016; 54: 524-8. [\[CrossRef\]](#)
11. Turgay N, Yolasiğmaz AU, Oyur T, Bardak-Ozdemir S, Toz S. Monthly Distribution of Intestinal Parasites Detected in a Part of Western Turkey between May 2009-April 2010-Results of Acid Fast and Modified Trichrome Staining Methods. Türkiye Parazit Derg 2012; 36: 71-4. [\[CrossRef\]](#)
12. NT. Özel boyama yöntemleri. Parazitolojide Laboratuvar. 23rd ed. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları Ege Üniversitesi Basımevi; 2011.
13. Scanlan PD, Stensvold CR, Rajilić-Stojanović M, Heilig HG, De Vos WM, O'Toole PW, et al. The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. FEMS Microbiol Ecol 2014; 90: 326-30. [\[CrossRef\]](#)
14. Nourrisson C, Scanzani J, Pereira B, NkoudMongo C, Wawrzyniak I, Cian A, et al. *Blastocystis* is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects. PLoS One 2014; 9: e111868. [\[CrossRef\]](#)
15. Lepczyńska M, Dzika E, Kubiak K, Korycińska J. The role of *Blastocystis* sp. as an etiology of irritable bowel syndrome. Polish Ann Med 2016; 23: 57-60. [\[CrossRef\]](#)
16. Casero RD, Mongi F, Sánchez A, Ramírez JD. *Blastocystis* and urticaria: Examination of subtypes and morphotypes in an unusual clinical manifestation. Acta Trop 2015; 148: 156-61. [\[CrossRef\]](#)
17. Abdel Hameed DM, Hassanin OM, Zuel-Fakkar NM. Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. Parasitol Res 2011; 108: 553-60. [\[CrossRef\]](#)
18. Vogelberg C, Stensvold CR, Monecke S, Ditzgen A, Stopsack K, Heinrich-Gräfe U, et al. *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. Parasitol Int 2010; 59: 469-71. [\[CrossRef\]](#)
19. Gentekaki E, Curtis BA, Stairs CW, Klimeš V, Eliáš M, Salas-Leiva DE, et al. Extreme genome diversity in the hyper-prevalent parasitic eukaryote *Blastocystis*. PLoS Biol 2017; 15: e2003769. [\[CrossRef\]](#)
20. Bálint A, Dóczi I, Bereczki L, Gyulai R, Szucs M, Farkas K, et al. Do not forget the stool examination!-cutaneous and gastrointestinal manifestations of *Blastocystis* sp. infection. Parasitol Res 2014; 113: 1585-90. [\[CrossRef\]](#)
21. Katsarou-Katsari A, Vassalos CM, Tzanetou K, Spanakos G, Papadopoulou C, Vakalis N. Acute urticaria associated with amoeboid forms of *Blastocystis* sp. subtype 3. Acta Derm Venereol 2008; 88: 80-1. [\[CrossRef\]](#)
22. Dagci H, Kurt Ö, Demirel M, Mandiracioglu A, Aydemir S, Saz U, et al. Epidemiological and diagnostic features of *blastocystis* infection in symptomatic patients in izmir province, Turkey. Iran J Parasitol 2014; 9: 519-29.
23. Özyurt M, Kurt Ö, Mølbak K, Nielsen HV, Haznedaroglu T, Stensvold CR. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. Parasitol Int 2008; 57: 300-6. [\[CrossRef\]](#)
24. Arik Yilmaz E, Karaatmaca B, Cetinkaya PG, Soyer O, Sekerel BE, Sahiner UM. The persistence of chronic spontaneous urticaria in childhood is associated with the urticaria activity score. Allergy Asthma Proc 2017; 38: 136-42. [\[CrossRef\]](#)
25. Andersen LO, Nielsen HV, Stensvold CR. Waiting for the human intestinal Eukaryote. Int Soc Microb Ecol 2013; 7: 1253-5. [\[CrossRef\]](#)
26. Audebert C, Even G, Cian A, The Blastocystis Investigation Group, Loywick A, Merlin S, et al. Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. Sci Rep 2016; 6: 25255. [\[CrossRef\]](#)

# Niğde Yöresi Güvercinlerinde (*Columba livia*) Kan Protozoonlarının Yaygınlığı

Prevalence of Haemoprotozoans in Pigeons (*Columba livia*) in Niğde Province

Bilge Karatepe<sup>1</sup> , Mustafa Karatepe<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Bor Meslek Yüksekokulu, Niğde, Türkiye

<sup>2</sup>Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Niğde, Türkiye

**Cite this article as:** Karatepe B, Karatepe M. Prevalence of Haemoprotozoans in Pigeons (*Columba livia*) in Niğde Province. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2018; 42(4): 258-61.

## ÖZ

**Amaç:** Bu çalışma, Niğde yöresi evcil ve yabani güvercinlerinde kan protozoonlarının prevalansının saptanması amacı ile yapılmıştır.

**Yöntemler:** Çalışma materyalini Niğde yöresinde 105'i evcil (55 dişi, 50 erkek) ve 111'i yabani (53 dişi, 58 erkek) olmak üzere toplam 216 güvercin oluşturmuştur. Bu güvercinlerin kanat altı venasından (vena cutanea ulnaris) kan alınarak her güvercin için kan frotileri hazırlanmış ve mikroskopta kan protozoonları yönünden incelenmiştir.

**Bulgular:** Muayenesi yapılan 216 güvercinin 107'si (%49,54) *Haemoproteus columbae* ile enfekte bulunmuştur. Mikroskopik incelemelerde, 105 evcil güvercinin 9'unda (%8,57) ve 111 yabani güvercinin 98'inde (%88,29) *H. columbae* saptanmıştır. *Haemoproteus columbae* enfeksiyonunun pozitifliği, istatistiksel olarak evcil ve yabani güvercinler arasında önemli bulunmuştur ( $p < 0,01$ ). *Haemoproteus columbae* ile enfekte 107 güvercinde ortalama parazitemi oranı %2,85 olarak tespit edilmiştir. Mikroskopik muayenesi yapılan kan frotilerinde *Plasmodium*, *Leucocytozoon* ve *Trypanosoma* türlerine rastlanmamıştır.

**Sonuç:** Niğde yöresinde evcil ve yabani güvercinlerinde *H. columbae* varlığı ilk kez bu çalışma ile bildirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Haemoproteus columbae*, kan protozoonu, güvercin, Niğde

**Geliş Tarihi:** 01.03.2018

**Kabul Tarihi:** 24.05.2018

## ABSTRACT

**Objective:** The study was conducted to detect the prevalence of haemoprotozoan parasites in the domestic and wild pigeons in Niğde province.

**Methods:** The study material included a total of 216 pigeons, which comprised 105 domestic (55 females, 50 males) and 111 wild (53 females, 58 males) pigeons belonging to Niğde province. Smears were prepared using the blood collected from the vena cutanea ulnaris of the pigeons and then examined for the presence of haemoprotozoan parasites under a light microscope using immersion objective.

**Results:** The microscopic examination of the smears showed that 107 (49.54%) of the 216 pigeons were infected with *Haemoproteus columbae*. The samples collected from 9 (8.57%) of the 105 domestic pigeons and 98 (88.29%) of the 111 wild pigeons were positive for *H. columbae*. The positivity rates of *H. columbae* between the domestic and wild pigeons were calculated to be statistically significant ( $p < 0.01$ ). The average level of parasitaemia in the 107 pigeons infected with *H. columbae* was detected to be 2.85%. On the other hand, *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Trypanosoma* species were not observed in the blood smears of the pigeons.

**Conclusion:** This is the first survey regarding *H. columbae* performed on the domestic and wild pigeons in Niğde province.

**Keywords:** *Haemoproteus columbae*, haemoprotozoan, pigeon, Niğde

**Received:** 01.03.2018

**Accepted:** 24.05.2018

## GİRİŞ

Evcil ve yabani kanatlılarda *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* ve *Trypanosoma* soylarına bağlı kan protozoonları görülmekte ve bu parazitler çeşitli kan emen sineklerle nakledilmektedir (1-3). Güvercinlerde enfeksiyon oluşturan kan parazitlerinden *Plasmodium* türlerinin çok patojen olduk-

ları ve yüksek oranda ölüme yol açtıkları, *Trypanosoma* türlerinin ise güvercinler için apatojen oldukları bildirilmiştir. Bunun yanında *Leucocytozoon* ve *Haemoproteus* enfeksiyonlarının güvercinlerde düşük patojeniteye sahip oldukları ve özellikle güvercin yavrularında iştahsızlık, durgunluk, zayıflık, anemi ve solunum güçlüğüne neden oldukları, yüksek parazitemili konaklarda ise mortaliteye yol açtıkları saptanmıştır (1-5).

**Bu çalışma 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi'nde sunulmuştur (1-7 Kasım 2009, Adana, Türkiye).**

**This study was presented at the 16<sup>th</sup> National Parasitology Congress (November 1-7 2009, Adana, Turkey).**

**Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** Mustafa Karatepe E.mail: mkaratepe@ohu.edu.tr

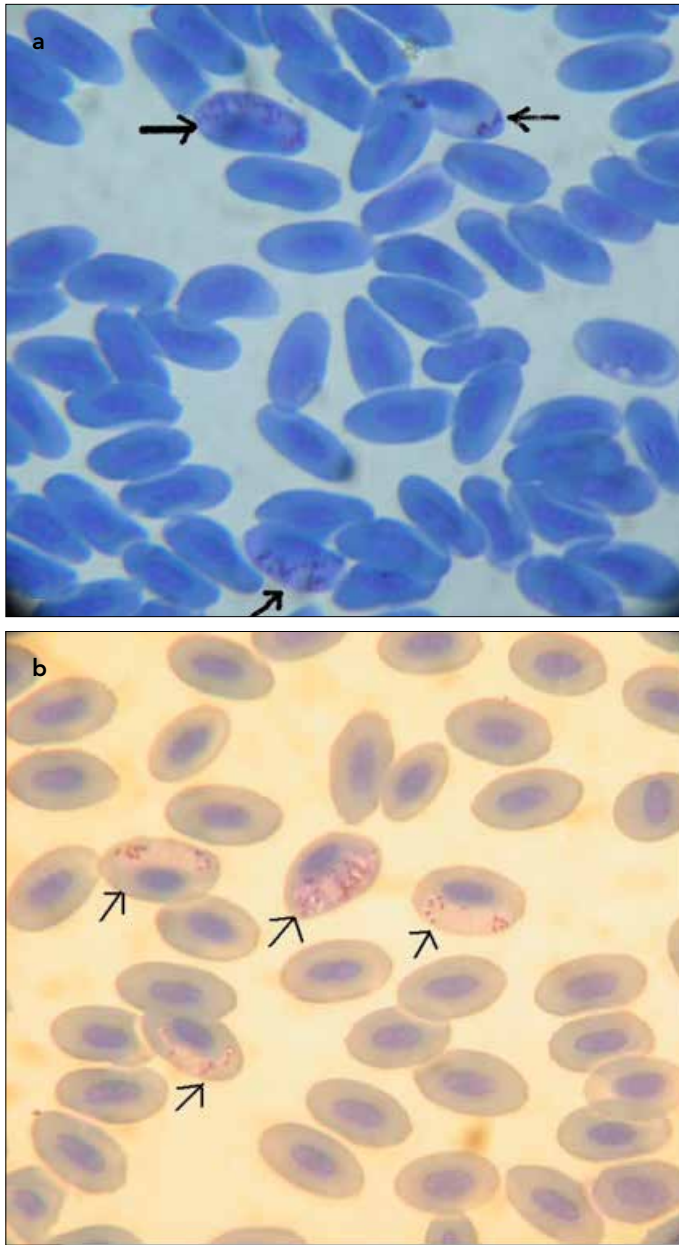
DOI: 10.5152/tpd.2018.5914

©Telif hakkı 2018 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.turkiyeparazitolog.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2018 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.turkiyeparazitolog.org

Asya, Avrupa ve Amerika'da güvercinlerde kan protozoonlarının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda *Haemoproteus columbae* başta olmak üzere (6-12), *H. sachavori*, *Leucocytozoon marchouxi*, *Plasmodium relictum*, *Trypanosoma avium* ve *T. hannai* türleri saptanmıştır (13, 14). Ülkemizde de benzer şekilde, evcil ve yabani güvercinlerin kan parazitleri üzerinde gerçekleştirilen mikroskopik incelemelerde en çok *H. columbae* türüne rastlanmıştır (15-21). Ayrıca güvercinlerde *Trypanosoma* spp., *L. marchouxi* ve *Haemoproteus* spp. de tespit edilmiştir (22-24).

Bu çalışma, Niğde yöresinde evcil ve yabani güvercinlerde bulunan kan protozoonlarının prevalansının ortaya konulması amacıyla yapılmıştır.



**Şekil 1. a, b.** a) Evcil güvercin eritrositlerinde *Haemoproteus columbae* gametositleri, Giemsa boyama, 100x (Orijinal) b) Yabani güvercin eritrositlerinde *Haemoproteus columbae* gametositleri, Giemsa boyama, 100x (Orijinal)

## YÖNTEMLER

Bu çalışma, Niğde yöresinde halk elinde kümeslerde yetiştirilen evcil güvercinler ile binaların çatılarından yakalanan yabani güvercinler üzerinde yürütülmüştür. Çalışma materyalini, 105'i evcil (55 dişi, 50 erkek) ve 111'i yabani (53 dişi, 58 erkek) olmak üzere toplam 216 güvercin oluşturmuştur. Bu güvercinlerin kanat altı venalarından (vena cutanea ulnaris) kan alınarak her güvercin için kan frotileri hazırlanmıştır. Hazırlanan ince yayma frotiler %5'lik Giemsa ile boyanarak mikroskopta immersiyon objektif (x100) ile *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon* ve *Trypanosoma* soylarında bulunan kan protozoonları yönünden incelenmiştir (2, 25). Her preparatta 200 mikroskop alanı içinde bulunan yaklaşık 10.000 eritrosit incelenerek parazitli eritrositler sayılmış ve yüzde (%) parazitemi oranı saptanmıştır (3).

## İstatistiksel Analiz

Araştırmada *H. columbae* enfeksiyonunun, hem evcil ve yabani güvercinlerde hem de erkek ve dişi güvercinlerde belirlenen pozitiflik oranlarının istatistiksel olarak karşılaştırılmasında Ki-kare testinden yararlanılmıştır.

## BULGULAR

Niğde yöresinde 216 evcil ve yabani güvercin üzerinde gerçekleştirilen bu çalışmada, toplam 107 güvercinde %49,54 oranında *H. columbae* prevalansı tespit edilmiştir. Eritrositlerin sitoplazmasında bulunan gametositlerin; ince, uzun ve hilal şeklinde olduğu ve eritrosit çekirdeğini kısmen kuşattığı görülmüştür (Şekil 1a ve b). Mikroskopik incelemelerde, 105 evcil güvercinin 9 (6 dişi, 3 erkek)'unda (%8,57) *H. columbae* gametositleri saptanmıştır. Bunun yanında 111 yabani güvercinin 98'inde (%88,29) *H. columbae* enfeksiyonu tespit edilmiş olup bu güvercinlerin 47'si dişi, 51'i erkek olarak saptanmıştır (Tablo 1).

Cinsiyetlere göre yapılan değerlendirmede, erkek ve dişi güvercinler arasında *H. columbae* enfeksiyonu taşımaları bakımından istatistiksel olarak fark görülmemiştir ( $p>0,05$ ). Buna karşılık evcil ve yabani güvercinler arasında parazit bulunup bulunmaması bakımından gözlenen fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,01$ ).

Bunun yanında mikroskopik muayenesi yapılan kan frotilerinde, hem evcil hem de yabani güvercinlerde bulunması muhtemel

**Tablo 1.** Evcil ve yabani güvercinlerde *Haemoproteus columbae*'nin mikroskopik muayene sonuçları

Gruplar	Muayene Edilen Güvercin Sayısı	Pozitif Güvercin Sayısı ( <i>Haemoproteus columbae</i> )	Pozitiflik (%)
<b>Güvercin Türü</b>			
Evcil güvercin	105	9	8.57 <sup>a</sup>
Yabani güvercin	111	98	88.29 <sup>b</sup>
<b>Cinsiyet</b>			
Dişi	108	53	49.07 <sup>a</sup>
Erkek	108	54	50.00 <sup>a</sup>
<b>Toplam</b>	216	107	49.54

<sup>a, b</sup>: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir ( $p<0,01$ ).



*Plasmodium*, *Leucocytozoon* ve *Trypanosoma* soylarında yer alan haemoprotozoon türleri tespit edilememiştir.

*Haemoproteus columbae* taşıyan güvercinlerdeki parazitemi oranı, evcil güvercinlerde (9 güvercin) %1,14 ve yabani güvercinlerde (98 güvercin) %3,01 olarak belirlenmiştir. Enfekte evcil ve yabani güvercinlerde (107 güvercin) ise ortalama parazitemi oranı %2,85 olarak saptanmıştır.

## TARTIŞMA

Dünyanın farklı coğrafi bölgelerindeki güvercinlerin kan protozoonlarını belirlemek için yapılan çalışmalarda *H. columbae* enfeksiyonunun prevalansının yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır (6-12). Yapılan kaynak taramalarında güvercinlerde *H. columbae* yaygınlığının %15,6-100 arasında değiştiği görülmüştür. Mikroskopik olarak Brezilya'da %19,3-100 (7, 9), Singapur'da %94-100, İsrail'de %65-100 (8), Hindistan'da %61,33 (12) ve serolojik olarak ELISA ile Amerika'da %90 (6) oranında *H. columbae* pozitifliği saptanmıştır. Bunun yanında ülkemize komşu ve aynı coğrafi bölgede bulunan ülkelerde *H. columbae* prevalansı araştırılmış; İran'da mikroskopide %20,8 (10), PCR ile %23,18 (11) pozitiflik bulunmuş, İtalya'da ise nested PCR ile %29,4 *Haemoproteus* spp./*Plasmodium* spp. ve %15,7 *Leucocytozoon* spp. belirlenmiştir (14). Niğde yöresinde evcil ve yabani güvercinler üzerinde gerçekleştirilen bu çalışmada ise *H. columbae*'nin yaygınlığı %49,54 olarak saptanmıştır. Güvercinlerin kan parazitleri prevalansındaki görülen bu farklılıklar; kullanılan yöntemin mikroskopik, serolojik ve moleküler olmasının yanısıra çalışmaların farklı coğrafi bölge ve mevsimlerde yapılmış olmasıyla açıklanabilir.

Türkiye'de evcil ve yabani güvercinlerin kan parazitleri üzerinde yapılan çalışmalarda *H. columbae* yaygınlığının yüksek olduğu tespit edilmiştir. Mikroskopik olarak *H. columbae* pozitifliği; İzmir'de Hayvanat bahçesindeki güvercinlerde %74 (15), Ankara'da yabani güvercinlerde %57 (16), Elazığ'da yabani güvercinlerde %73,58 (17), İstanbul'da evcil güvercinlerde %43,2 (18), Bursa'da evcil güvercinlerde %21 (19), Adana'da evcil güvercinlerinde %84,78 (20) ve %65,3 (21) ve Kırıkkale'de evcil güvercinlerde %13,2 (24) oranlarında bulunmuştur. Bu çalışmada ise evcil güvercinlerin 9'unda (%8,57), yabani güvercinlerin ise 98'inde (%88,29) *H. columbae* saptanmıştır. Ayrıca *H. columbae* taşıyan yabani güvercinlerdeki parazitemi oranı (%3,01) evcil güvercinlerinkinden (%1,14) daha yüksek bulunmuştur. Evcil güvercinlerde belirlenen bu düşük prevalans ve parazitemi düzeyi, yetiştiriciler tarafından ektoparazitlerle düzenli mücadele edildiğini akla getirmektedir. Bunun yanında yabani güvercinlerde bulunan bu yüksek prevalans oranı Türkiye'de İzmir Hayvanat Bahçesi (15) ve Elazığ'da yapılan (17) çalışma sonuçları ile benzerlik göstermekte, diğer yörelerdeki çalışma sonuçlarından ise daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum çalışmaların farklı coğrafi bölgelerde yapılmasına ve vektör kan emen sineklerin yaygınlığına bağlanabilir.

Türkiye'de güvercinlerde *Haemoproteus*'lar dışında kalan diğer kan protozoonları ile ilgili yapılan çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır. Bu çalışmalarda; *Trypanosoma* spp. (muhtemelen *T. hanna*) İstanbul'da (22), *L. marchouxi* ise Burdur'da (23) saptanmıştır. Bu çalışmada ise evcil ve yabani güvercinlerin hiçbirinde, *H. columbae* dışında bir kan protozoonuna rastlanmamıştır. Bu sonuç

kullanılan yöntemle bağlı olabileceği gibi güvercinlerin diğer haemoprotozoonların vektörlerine (sivrisinek, *Simulium*) maruz kalmalarındaki farklılık ile açıklanabilir.

## SONUÇ

Sonuç olarak, Niğde yöresindeki güvercinlerde *H. columbae*'nin %49,54 oranında yaygın olduğu ilk kez ortaya konulmuş, yaygınlığının evcil güvercinlerde (%8,57) yabani güvercinlere (%88,29) göre çok daha düşük olarak belirlenmiştir. Bu durum yetiştiricilerin kümeslerde güvercin kontrollerini düzenli yapmalarına ve görülen ektoparazitlerin ilaçlanması sırasında vektör sineklerle de mücadele edilmesine bağlanabilir.

**Etik Komite Onayı:** Yazarlar çalışmanın World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects", (amended in October 2013) prensiplerine uygun olarak yapıldığını beyan etmişlerdir.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir – B.K., M.K.; Tasarım – B.K., M.K.; Denetleme – B.K., M.K.; Kaynaklar – B.K., M.K.; Malzemeler – B.K., M.K.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – B.K., M.K.; Analiz ve/veya Yorum – B.K., M.K.; Literatür Taraması – M.K.; Yazıyı Yazan – B.K., M.K.; Eleştirel İnceleme – B.K.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

**Ethics Committee Approval:** Authors declared that the research was conducted according to the principles of the World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects".

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Concept – B.K., M.K.; Design – B.K., M.K.; Supervision – B.K., M.K.; Resources – B.K., M.K.; Materials – B.K., M.K.; Data Collection and/or Processing – B.K., M.K.; Analysis and/or Interpretation – B.K., M.K.; Literature Search – M.K.; Writing Manuscript – B.K., M.K.; Critical Review – B.K.

**Conflict of Interest:** Authors have no conflicts of interest to declare.

**Financial Disclosure:** The authors declared that this study has received no financial support.

## KAYNAKLAR

1. Levine ND. Veterinary Protozoology. Ames, Iowa: Iowa State Univ. Press; 1985.
2. Soulsby E.J.L. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. London: Baillare Tindall; 1986.
3. Kaufmann J. Parasitic Infections of Domestic Animals, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin; 1996. [CrossRef]
4. Lloyd JE. Louse flies, keds, and related flies (Hippoboscoidea). In: Mullen G, Durden L, editors. Medical and Veterinary Entomology. Academic Press/Elsevier Science; 2002. p. 349-62. [CrossRef]
5. Bowman DD, Lynn RC, Eberhard ML. Georgis' Parasitology for Veterinarians. USA: Elsevier Science; 2003.
6. Graczyk TK, Cranfield MR, Shiff CJ. Extraction of *Haemoproteus columbae* (Haemosporina: Haemoproteidae) antigen from rock dove pigeons (*Columba livia*) and its use in an Antibody ELISA. J Parasitol 1994; 80: 713-8. [CrossRef]

7. Adriano EA, Cordeiro NS. Prevalance and intensity of *Haemoproteus columbae* in three species of wild doves from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96: 175-8. [\[CrossRef\]](#)
8. Paperna I, Smalridge C. *Haemoproteus columbae* infection of feral pigeons in Singapore and Israel. Raffles B Zool 2002; 50: 281-6.
9. Marques SMT, De Quadros RM, Da Silva CJ, Baldo M. Parasites of pigeons (*Columba livia*) in urban areas of Lages, Southern Brazil. Parasitol Latinoam 2007; 62: 183-7.
10. Bahrami AM, Doosti A, Nahrevanian H, Shamsi M. Pathological study on parasitism in racing pigeons; An indication of its effects on community health. Adv Environ Biol 2012; 6: 726-32.
11. Doosti A, Ahmadi R, Mohammadalipour Z, Zohoor A. Detection of *Haemoproteus columbae* in Iranian pigeons using PCR. International Conference on Biological, Civil and Environmental Engineering (BCEE-2014); March, 17-18; Dubai (UAE): 2014.
12. Borkataki S, Katoch R, Goswami P, Godara R, Khajuria JK, Yadav A, et al. Incidence of *Haemoproteus columbae* in pigeons of Jammu district. J Parasit Dis 2015; 39: 426-8. [\[CrossRef\]](#)
13. Stabler RM, Kitzmiller NJ, Braun CE. Blood parasites from band-tailed pigeons. J Wildl Manage 1977; 41: 128-30. [\[CrossRef\]](#)
14. Scaglione FE, Pregel P, Cannizzo FT, Pérez-Rodríguez AD, Ferroglio E, Bollo E. Prevalence of new and known species of haemoparasites in feral pigeons in northwest Italy. Malaria J 2015; 14: 99. [\[CrossRef\]](#)
15. Tolgay N. Çeşitli kanatlıların Plasmodium, Haemoproteus ve Leucocytozoon enfeksiyonları üzerine araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1972; 19: 271-86.
16. Gıcık Y, Arslan MÖ. Blood parasites of wild pigeons in Ankara district. Turk J Vet Anim Sci 2001; 25: 169-72.
17. Köroğlu E, Şimşek S. Elazığ yöresi güvercinlerinde (*Columba livia*) bulunan kan parazitleri ve yayılış oranları. Fırat Üniv Sağlık Bil Derg 2001; 15: 185-8.
18. Gülanber A, Tüzer E, Çetinkaya H. *Haemoproteus columbae* infections and *Pseudolynchia canariensis* infestations in pigeons in İstanbul, Turkey. Acta Vet Eurasia 2002; 28: 227-9.
19. Senlik B, Gulegen E, Akyol V. Prevalence and intensity of *Haemoproteus columbae* in domestic pigeons (*Columba livia domestica*). Indian Vet J 2005; 82: 998-9.
20. Öz İ, Turut N. Adana yöresinde evcil güvercinlerde *Haemoproteus columbae*'nin yaygınlığı. Bornova Vet Kont Araşt Enst Derg 2007; 29: 25-9.
21. Karacaoğlu M, Karatepe M. Adana yöresi evcil güvercinlerinde (*Columba livia domestica*) kan parazitlerinin araştırılması. Fırat Üniv Sağlık Bil Derg 2017; 31: 33-7.
22. Gülanber A, Tüzer E, Efil İ. A case of trypanosomosis in a pigeon in İstanbul, Turkey. Acta Vet Eurasia 2002; 28: 235-7.
23. Özmen Ö, Haligür M, Yukarı BA. A study on the presence of Leucocytozoonosis in wild birds of Burdur district. Turk J Vet Anim Sci 2005; 29: 1273-8.
24. Sürsal N, Atan P, Gökpinar S, Duru Ö, Çakmak A, Yıldız K. Prevalence of *Haemoproteus* spp. in Tumbler Pigeons (*Columba livia domestica*) in Kirikkale Province, Turkey. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2017; 41: 71-5. [\[CrossRef\]](#)
25. Bennett GF, Peirce MA. The haemoproteid parasites of the pigeons and doves (family Columbidae). J Nat Hist 1990; 24: 311-25. [\[CrossRef\]](#)

# *In-vitro* Anthelmintic Effects of Aqueous and Ethanolic Extracts of *Marrubium vulgare* Leaves Against Bovine Digestive Strongyles

## *Marrubium vulgare* (karaderme) Yapraklarının Sulu ve Etanolik Ekstraktlarının Sığır Sindirim Strongilozuna Karşı *in-vitro* Antelmintik Etkileri

Lotfi Moussouni<sup>1</sup>, Mokhtar Benhanifia<sup>2</sup>, Abdelhanine Ayad<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Sciences of Environment, University A. Mira, School of Life and Nature Sciences, Bejaia, Algeria

<sup>2</sup>Department of Agricultural Sciences, University M. Stambouli, School of Life and Nature Sciences, Mascara, Algeria

**Cite this article as:** Moussouni L, Benhanifia M, Ayad A. *In-vitro* anthelmintic effects of aqueous and ethanolic extracts of *Marrubium vulgare* leaves against bovine digestive strongyles. Türkiye Parazit Derg 2018; 42(4): 262-7.

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of the present study was to evaluate *in vitro* the anthelmintic activity of *Marrubium vulgare* L. growing in Algeria against digestive strongyles in naturally infected bovine.

**Methods:** The anthelmintic activities of the extracts were evaluated using the egg hatch assay and larval mortality assay. Leaves powder of *M. vulgare* as extracted by maceration. Ethanolic (EE) and aqueous extracts (AE) were tested at 0.78, 1.55, 3.1, 6.2, 12.5, 25, and 50 mg/ml. Albendazole and dimethyl sulfoxide were used as positive and negative controls at concentrations 20 mg/ml and 3%, respectively.

**Results:** The mean embryonation rate was maximum in AE and EE (48.4±3.47% and 54.2±2.87%, respectively) of *M. vulgare* leaves. The extracts of *M. vulgare* leaves high effects were observed with 50 mg/ml, but the lowest reduction on parasite eggs hatchability was observed in cultures exposed to 0.78 mg/ml to both extracts. The larval mortality rate of both AE and EE from *M. vulgare* showed that the extracts at 50 mg/ml exhibited 45.8±1.99% and 51±2.53%, respectively, at 24h.

**Conclusion:** The findings of the present study showed that AE and EE of *M. vulgare* leaves have a potential anthelmintic activity on eggs and larvae of bovine strongyles parasites *in vitro*.

**Keywords:** *Marrubium vulgare*, anthelmintic effects, Bovine, *in vitro*

**Received:** 03.04.2018

**Accepted:** 05.06.2018

### ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı Cezayir’de yetişen *Marrubium vulgare* yapraklarının, doğal yollarla enfekte olmuş sığırlarda sindirim strongilozuna karşı *in vitro* antelmintik etkisini değerlendirmektir.

**Yöntemler:** Ekstraktların antelmintik aktiviteleri yumurtadan çıkma testi (egg hatch assay) ve larva mortalite testi (larval mortality assay) kullanılarak değerlendirildi. *M. vulgare* yaprak tozları maserasyon ile ekstrakte edildi. 0.78, 1.55, 3.1, 6.2, 12.5, 25 ve 50 mg/mL ölçülerinde etanolik (EE) ve sulu ekstraktlar (AE) test edildi. Sırasıyla 20 mg/mL ve 3% konsantrasyonlarında albendazol and dimetil sülfoksit, pozitif ve negatif kontroller olarak kullanıldılar.

**Bulgular:** *M. vulgare* yapraklarının ortalama embriyonlaşma oranı AE ve EE’de maksimum idi (sırasıyla %48,4±3,47 ve %54,2±2,87). *M. vulgare* ekstraktlarının yapraklarının 50 mg/mL ile yüksek etki gösterdiği gözlenmiştir, ancak her iki ekstrakta da, 0,78 mg/mL’ye maruz bırakılan kültürlerde en düşük parazit yumurta kuluçka randımanı gözlenmiştir. *M. vulgare*’den elde edilen AE ve EE’nin larva mortalite oranları, 24 saatte 50 mg/mL’deki ekstraktlar için sırasıyla %45,8±1,99 ve %51±2,53 olarak gözlenmiştir.

**Sonuç:** Bu çalışmanın bulguları, *M. vulgare* yapraklarının AE ve EE’sinin, *in vitro* olarak sığır strongil parazitlerinin yumurtaları ve larvaları üzerinde potansiyel bir antelmintik etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Marrubium vulgare*, antelmintik etkiler, sığır, *in vitro*

**Geliş Tarihi:** 03.04.2018

**Kabul Tarihi:** 05.06.2018

### INTRODUCTION

Parasitic diseases are among the factors that limit ruminant production worldwide, accounting for large economic losses. Digestive strongyles are parasitic diseases caused by strongylid nematodes that include a number of parasitic

species, (such as *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Bunostomum*, *Oesophagostomum*, etc.) and are among the bovine parasites most commonly encountered in temperate regions. Helminthes are the most common infections in cattle, affecting almost all bovine

**Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Abdelhanine Ayad E.mail: hanine06@gmail.com

DOI: 10.5152/tpd.2018.5972

©Copyright 2018 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.turkiyeparazitderg.org

©Telif hakkı 2018 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.turkiyeparazitderg.org web sayfasından ulaşılabilir.

breeds. The negative impact of helminth infections in livestock productivity in some countries has been established, such as retarded growth, weight loss, reduced food consumption, lower milk production, impaired fertility, and high mortality rates in cases of massive infections (1). A recent study in Algeria (Bass Kabylie region) demonstrates that digestive strongyles are the most prevalent species in cattle (2). This infection is generally controlled by synthetic drugs; however, excessive use of such drugs has led to widespread resistance.

The worldwide interest in herbal products has grown significantly. A large number of medicinal plants have been used to treat parasitic infections in humans and animals. Herbal medicine can increase profits by reducing the use of conventional anthelmintics and extending the useful life of the limited number of anthelmintics available. Plants and their bioactive products are reported to have multiple medicinal applications in the treatment or control of many health problems and infections, including its use as antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, antipyretic, and immunostimulant (3).

*Marrubium vulgare* L. (*Lamiaceae*) is native to North Africa, Central and Western Asia, and Southern Europe. This plant is used in folk medicine for the treatment of a variety of diseases. *M. vulgare* is currently used by traditional healers alone or combined with other herbs to treat bronchitis, coughs, and colds. Moreover, it is traditionally used for its antioxidant, antibacterial (4), analgesic, and hypoglycemic effects (5). It is essentially rich in phenolic compounds among other phytochemicals and is widely used in traditional medicine. Recently, Amessis-Ouchemoukhet al. (4) demonstrated the potential role of this plant in the inhibition of cyclooxygenase1 and acetylcholinesterase activities. The important biological activities of *Marrubium* are attributed to its different bioactive compounds, such as flavonoids, diterpenoids, and phenylethanoid glycosides (6).

It is important to establish a successful program and to search for the development of alternative, safer, and environmentally friendly anthelmintic agents. There is also urgency in the use of medicinal plants to treat cases of parasitism in ruminants, and much of the success has been achieved against a variety of parasites. To our knowledge, no study using the anthelmintic activity of plant extracts from *M. vulgare* L. was reported in Algeria. The aim of the present study was to evaluate in vitro the anthelmintic activity of *M. vulgare* L. growing in Algeria (area of Béjaïa) against digestive strongyles in naturally infected bovine.

## METHODS

The experimental protocol was approved by the Scientific Council of the Faculty of Life and Nature Sciences, University of Abderrahmane Mira, Béjaïa, Algeria.

### Plant material and extraction

The leaves of *M. vulgare* were collected in March 2015 from the Aokas locality (Béjaïa Province, North Algeria; 36° 36' N, 4° 41' E). The species identification was performed at the laboratory of ecology (University of Béjaïa, Algeria). The plant was cut into small pieces and dried at room temperature (25-30 °C) for 1 week. Thereafter, the plant material was pounded using a coffee grinder resulting in a fine powder and was kept in the dark.

Leaves powder of *M. vulgare* was extracted by maceration with ethanol by shaking (Corning® PC-400D hot plate). Briefly, leaves powder was extracted with 70% ethanol and water in a 1:10 W/V ratio for 24h and then homogenized using a Polytron homogenizer (Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY, USA) (7). The combined ethanolic extract (EE) and water extract were evaporated to dryness to yield crude EE and water extract. In addition, the resulting supernatants were filtered through Whatman paper no. 1. The combined EE and water extract were evaporated at 50 °C to dryness to yield crude EE and aqueous extract (AE). In order to improve solubility in water, the extract was dissolved in dimethyl sulfoxide solution (DMSO, 3%). A total volume (100 mL) was obtained that produced a stock solution at a concentration of 50 mg/ml from which a series of dilutions was made to obtain solutions at different concentrations of 0.78, 1.55, 3.1, 6.2, 12.5, 25, and 50 mg/mL.

### Recovery of nematode eggs

Fresh eggs were obtained from the feces of naturally infected cattle according to Chollet et al. (8). Briefly, 3g of feces was collected, homogenized in mortar, suspended in saturated salt solution (NaCl, d=1.2), and filtered through two sieves (1 and 0.15 mm). The content was centrifuged at 1000 g for 5 min. The supernatant was poured through a 45 µm sieve. The retained material on the sieve containing the eggs was washed with tap water to remove the salt solution. It was then turned, and the opposite side was washed with tap water. Finally, the eggs were collected in a Petri dish (16 cm diameter).

### Evaluation of ovicidal activity

The ovicidal efficacy test of different extracts was performed using two procedures as described by Coles et al. (9). An egg suspension of 0.2 ml was distributed in a flat-bottomed microtiter plate containing approximately 100 eggs/well and mixed with the same volume of plant extract yielding the following final concentrations: 0.78, 1.55, 3.1, 6.2, 12.5, 25, and 50 mg/mL. The eggs were incubated at room temperature for 24h.

A Lugol iodine solution was added to prevent the eggs from hatching. The number of embryonated eggs per well was counted using a stereo microscope (40× magnification). The percentage of embryonation (EM%) was determined as follows (10):  $E (\%) = \text{Number of embryonated eggs} \times 100 / \text{Number of eggs nature}$ .

After 24h of incubation, all embryonated eggs and first stage larvae (L<sub>1</sub>) were counted using a microscope (40× magnification) to assess the effects of the plant extract in the second experiment. The hatching rate (E%) was estimated using the following formula (11):  $E (\%) = \text{Number of Larvae 1} \times 100 / \text{Number of embryonated eggs in culture}$ .

### Recovery of nematode larvae

The eggs were cultured using the technique described by Smyth (12). Briefly, 3ml of the eggs suspension was poured on a filter paper covering the bottoms of one Petri dish, then covered to maintain a high relative humidity (65%-67%) to prevent the dish from drying out, and stored at +24°C. After 3 days of incubation, L<sub>1</sub> larvae were observed in a Petri dish and were collected using a Baermann apparatus.

### Evaluation of larvicidal activity

For assessment of the effects of the extracts on larvae (L<sub>1</sub>), a 1mL solution containing approximately 15-20 L<sub>1</sub> was distributed in each

well of a flat-bottomed microtiter plate and mixed with the same volume of a specific extract. The flat-bottomed microtiter plate was covered, and the larvae were incubated at room temperature for 24h. The number of dead or immobilized larvae was assessed under a microscope (40× magnification). The corrected mortality rate (%) was determined using the following formula (13):  $cMR (\%) = (Mce - Mt) \times 100 / 100 - Mt$ .

Where cMR is the corrected mortality rate (%), Mce is the mortality obtained during the test, and Mt is the mortality registered in the negative control wells. If the mortality rate in the latter wells is <5%,  $cMR = Mce$ .

### Statistical Analysis

The results (mean±SD) were expressed as percentage (%). The different rates of embryonation (EM%), eclosability (E%), and mortality (cMR%) due to the plant extracts were compared using the chi-square test at a 5% significance level. The lethal concentration 50 (LC<sub>50</sub>) was determined using the regression lines of the SAS Probit according to the decimal logarithm of the concentration. All tests were repeated five times for each treatment and control. Albendazole (ABZ) was used as a positive control at 20 mg/mL concentration.

### RESULTS

Table 1 summarizes the extracts of *M. vulgare* LC<sub>50</sub> values of in vitro anthelmintic activity test. Regression analysis indicated that

**Table 1.** Lethal concentration (LC<sub>50</sub>, mg/mL) of AE and EE *M. vulgare* on inhibiting embryonation, hatchability eggs, and mortality L<sub>1</sub> of bovine digestive strongyles

Extract	Inhibiting embryonation	Inhibiting hatching	Mortality L1
Ethanollic	39.72 mg/mL	38.66 mg/mL	42.38 mg/mL
Water	>50 mg/mL	>50 mg/mL	>50 mg/mL

**Table 2.** Mean embryonation (EM%, ±SD) of leaves extract of *M. vulgare* at different concentrations against bovine digestive strongyles

Concentration (mg/mL)	Percentage of embryonation (EM%, ±SD)	
	AE	EE
0.78	8.4±2.02	10.6±2.16
1.55	10.4±2.01	13.8±2.41
3.1	14.6±2.16	17.4±2.56
6.2	20.8±2.40	22.6±2.78
12.5	29±2.73	31.8±3.08
25	38.2±3.08	43.8±3.08
50	48.4±3.47	54.2±2.87
DMSO	5.8±1.45*	6.4±2.01*
ABZ	100±0*	100±0*

\*Negative and positive controls (DMSO and ABZ, respectively) compared with each extract treatment are statistically different in the same column (p<0.05).  
AE: aqueous extracts; EE: ethanolic extracts; DMSO: dimethyl sulfoxide solution; ABZ: Albendazole

LC<sub>50</sub> values were 39.72, 38.66, and 42.38 mg/ml for the inhibition of embryonation eggs, hatching rate, and L<sub>1</sub> mortality of *M. vulgare* EE, respectively. However, the LC<sub>50</sub> value of AE of *M. vulgare* was >50 mg/mL for all tests.

The results indicated that EE of *M. vulgare* leaves appears to be more efficient against gastrointestinal strongyles in different tested stages than AE. Table 2 shows the variation of the mean embryonation rate of digestive strongyles eggs according to the concentrations of the extract of *M. vulgare* leaves. The inhibition

**Table 3.** Mean hatchability rate (E%, ±SD) of leaves extract of *M. vulgare* at different concentrations against bovine digestive strongyles

Concentration (mg/mL)	Hatchability rate (E%, ±SD)	
	AE	EE
0.78	8.8±1.45	11±1.57
1.55	11±1.36	14.2±2.40
3.1	15.4±2.02	18.2±2.27
6.2	21.6±2.16	23.6±1.68
12.5	29.8±2.41	32.6±2.30
25	39.4±3.20	44.8±2.14
50	49.2±3.08	55.2±2.41
DMSO	5.8±1.45*	6.2±1.45*
ABZ	100±0*	100±0*

\*Negative and positive controls (DMSO and ABZ, respectively) compared with each extract treatment are statistically different in the same column (p<0.05).  
AE: aqueous extracts; EE: ethanolic extracts; DMSO: dimethyl sulfoxide solution; ABZ: Albendazole

**Table 4.** Mean rate of mortality (cMR%, ±SD) of leaves extract of *M. vulgare* at different concentrations against bovine digestive strongyles

Concentration (mg/mL)	Percentage of mortality (Mc%, ±SD)	
	AE	EE
0.78	7.8±1.99	9.6±2.02
1.55	10.2±2.28	12.6±2.30
3.1	14.4±2.55	14±2.1
6.2	19.8±1.82	21.4±2.67
12.5	26.8±3.8	30.2±2.41
25	37.6±3.2	42.6±2.56
50	45.8±1.99	51±2.53
DMSO	5.8±1.45*	6.6±1.27*
ABZ	100±0*	100±0*

\*Negative and positive controls (DMSO and ABZ, respectively) compared with each extract treatment are statistically different in the same column (p<0.05).  
AE: aqueous extracts; EE: ethanolic extracts; DMSO: dimethyl sulfoxide solution; ABZ: Albendazole



effect was proportional to the extract concentration. The mean embryonation rate was maximum in AE and EE ( $48.4 \pm 3.47\%$  and  $54.2 \pm 2.87\%$ , respectively). The lowest concentration of AE and EE of *M. vulgare* leaves (0.78 mg/ml) did not affect parasite embryonation. At 3.1 mg/ml, the embryonation rates were moderate in the solution containing both extracts. The mean embryonation rate of AE and EE ( $5.8 \pm 1.45\%$  and  $6.4 \pm 2.01\%$ , respectively) was very low in distilled water and 3% DMSO. Both extracts of inhibition of embryonation rate were significantly lower than positive control ( $p < 0.05$ ).

Table 3 illustrates the variation of the mean hatching rate eggs of *M. vulgare* according to the concentration of AE and EE. *M. vulgare* effect varied according to the concentration of extracts. The extracts of *M. vulgare* leaves high effects were observed with 50 mg/ml, but the lowest reduction on parasite eggs hatchability was observed in cultures exposed to 0.78 and 1.55 mg/ml to both extracts. With regard to DMSO diluted in water (3%), its activity on the hatchability rate was lower than that shown by both extracts at minimal concentration. The ABZ-treated cultures (positive control) were significantly higher ( $p < 0.05$ ) than the tested concentration of AE and EE.

Table 4 shows the effects of different extracts on L<sub>1</sub> larvae of gastrointestinal strongyles after 24h of contact. The larval mortality rate of both AE and EE from *M. vulgare* showed that the extracts at 50 mg/ml exhibited  $45.8 \pm 1.99\%$  and  $51 \pm 2.53\%$ , respectively, at 24h. At a concentration of 3.1 mg/mL, the mean larval mortality rates were similar in AE and EE ( $14.4 \pm 2.55\%$  and  $14 \pm 2.1\%$ , respectively). Generally, the larval mortality rate was concentration dependent in both extracts. Distilled water and 3% DMSO in both AE and EE were  $5.8 \pm 1.45\%$  and  $6.6 \pm 1.27\%$ , respectively. Significantly different ( $p < 0.05$ ) from tested concentrations of AE and EE and from ABZ-treated cultures were observed.

## DISCUSSION

The present study was conducted in order to find a phytotherapeutic product to help control gastrointestinal parasites in bovines and to provide an alternative use of plant extracts. These tests measured the effect of anthelmintic activity directly on the processes of hatching, development, and motility of endoparasites. The results of our study have demonstrated that extracts of *M. vulgare* leaves have an inhibitory effect on the eggs and larval development of bovine digestive strongyles parasite in vitro. As previously described, *M. vulgare* possesses different bioactive compounds, such as flavonoids, diterpenoids, tannins, and phenylethanoid glycosides (4). Moreover, plants with anthelmintic activities contain phytochemicals, such as polyphenols, tannins, flavonoids, and saponins. This anthelmintic activity may be attributed to an individual or a combined effect of the bioactive compounds (14).

AE and EE of leaves of *M. vulgare* at high concentration showed a significant anthelmintic activity, in agreement with those reported by Al-Shaibani et al. (15). The results of the present study also correspond with those published previously, which demonstrated that the anthelmintic activity resulted with increasing the plant extract concentrations (16). More interesting, the present study also considered the positive and negative controls of both extract tests, which give a more tangible comparison in the ex-

periment. As expected, the low concentration of DMSO (3%) examined did not have any effect on hatching, whereas ABZ completely prevented egg hatching at the standard dose used (20 mg/ml). In addition, the results obtained for the inhibition of embryonation and egg hatching, as well as for the larvae mortality, are slightly higher with EE than with AE in bovine digestive strongyles. A similar observation was reported by Tiwari et al. (17); in their study, EE possesses a high amount of polyphenols than AE. In addition, the higher concentrations of more bioactive flavonoid compounds were detected with 70% ethanol due to its higher polarity than pure ethanol (18). Hence, organic solvent extracts were more bioactive compounds from plants than AE (19).

Previous studies have used this test to screen the anthelmintic activity of some plant compounds (20). In the present study, AE showed practically similar activity with an LC<sub>50</sub> value of 50 mg/mL than EE with an LC<sub>50</sub> value of 49.7 mg/ml. Recently, Ngaradoum et al. (21) showed that methanolic extract of *Ziziphus mucronata* barks has a significantly ( $p < 0.05$ ) higher activity with an inhibition concentration 50 (IC<sub>50</sub>) value of 3.9 mg/mL than AE with an IC<sub>50</sub> value of 14.7 mg/mL when tested against *Haemonchus contortus* egg. In addition, Zabr e et al. (22) reported that *Acacia raddiana* is effective with IC<sub>50</sub>=1.58 mg/mL for AE and IC<sub>50</sub>=0.58 mg/mL for acetonic extract for egg hatch inhibition. These differences may be attributed to the used concentration and the composition of plant extracts. Our results on parasite eggs suggested that EE of *M. vulgare* appears to be active than AE on embryonation mechanism and hatching egg. This could be attributed to the difference in proportions of the secondary metabolite components and the greatest facility of extracts diffusion through the egg shell that were responsible for anthelmintic activity. It has been reported that tannins or saponins can possibly penetrate the different layers of the egg and inhibited the formation of larva by affecting the *morula* (23).

Moreover, several studies had demonstrated that tannins and saponins could stop the larval formation and hatching process of *H. contortus* eggs (24). In this research, the ovicidal activities of the extracts could be due to the fact that the active compounds passed through the egg shell and stopped the segmentation of blastomeres or paralyzed the larvae inside the embryonated egg (25). In addition, the larvicidal activity of plant extract may be attributed to tannins capacity to bind free protein available in the tubes for larval nutrition, therefore leading to larval starvation or decrease in gastrointestinal metabolism directly through the inhibition of oxidative phosphorylation, causing larval death (26).

The biochemical and pharmacological activities of flavonoids have been attributed to their antioxidative and antibacterial properties (4) and act by penetrating the cuticle blocking the postsynaptic receptors and consequently paralyzing effects on larvae (27). In addition, Chartier et al. (28) noted that active compounds may have induced the release of gamma-aminobutyric acid that blocked the transmission of nerve impulses or decoupling the oxidative phosphorylation reaction that can lead to the exhortation of the energy of larvae.

Some studies have shown that some local plants that contain tannins can impair different key biological processes of the parasitic life cycle, namely the eggs development into larvae, the excretion

of eggs by adult worms, and the establishment of the infective L<sub>3</sub> larvae (29). The findings of the present study showed that increasing the concentration of the plant extracts resulted in increased inhibition of embryo nation eggs, hatching rate, and mortality L<sub>1</sub> effect of bovine strongyles parasites that could be related to a supplement of different active compounds. Moreover, the activity level of the different concentrations of *M. vulgare* extract was significantly lower than the ABZ activity. This difference can be explained by the presence of small concentrations of the active ingredient in the plant extracts. It is likely that at higher concentration, all binding receptors on the larvae were occupied, thus leading to hyperpolarization of membranes limiting excitation and impulse transmission causing flaccid paralysis of larvae muscles, a similar observation also made by a previous study (30).

## CONCLUSION

The findings of the present study showed that AE and EE of *M. vulgare* leaves have a potential anthelmintic activity on eggs and larvae of bovine strongyles parasites. Further studies geared toward isolation, identification, characterization, and purification of bioactive compounds from this plant should be conducted in order to test its efficacy. In addition, *in vivo* investigations are required to warrant the ethno medicinal application of *M. vulgare* as anthelmintic agent.

**Ethics Committee Approval:** Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Faculty of Life and Nature Sciences, University A. Mira, Bejaia.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Concept – A.A.; Design – A.A.; Supervision – A.A.; Resources – L.M., A.A.; Materials – L.M., A.A.; Data Collection and/or Processing – L.M.; Analysis and/or Interpretation – L.M., A.A.; Literature Search - L.M.; Writing Manuscript – L.M.; Critical Review – L.M., M.B., A.A.

**Conflict of Interest:** Authors have no conflicts of interest to declare.

**Financial Disclosure:** The authors declared that this study has received no financial support.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı A. Mira Üniversitesi, Yaşam ve Doğa Bilimleri Fakültesi etik kurulundan alınmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir – A.A.; Tasarım – A.A.; Denetleme – A.A.; Kaynaklar – L.M., A.A.; Malzemeler – L.M., A.A.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – L.M.; Analiz ve/veya Yorum – L.M., A.A.; Literatür Taraması – L.M.; Yazıyı Yazan – L.M.; Eleştirel İnceleme – L.M., M.B., A.A.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

## REFERENCES

1. Maizels RM, McSorley HJ. Regulation of the host immune system by helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 138: 666-75. [CrossRef]
2. Moussouni L, Benhanifia M, Saidi M, Ayad A. Prevalence of gastrointestinal parasitism infections in cattle of Bass Kabylie area: Case of Bejaia province, Algeria. *Mac Vet Rev* 2018; 41: 73-82. [CrossRef]
3. Laudato M, Capasso R. Useful plants for animal therapy. *OA Altern Med* 2013; 1: 1.
4. Amessis-Ouchemoukh N, Madani K, Falé PL, Serralheiro ML, Araújo MEM. Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Ind Crops Prod* 2014; 53: 6-15. [CrossRef]
5. Meyre-Silva C, Yunes R, Schlemper V, Campos-Buzzi F, Cechinel-Filho V. Analgesic potential of Marrubium derivatives, a bioactive diterpene present in Marrubium vulgare (Lamiaceae). *Il Farmaco* 2005; 60: 321-6. [CrossRef]
6. Meyre-Silva C, Cechinel-Filho V. A review of the chemical and pharmacological aspects of the genus Marrubium. *Curr Pharm Des* 2010; 16: 3503-18. [CrossRef]
7. Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med* 1998; 64: 711-3. [CrossRef]
8. Chollet J, Martrenchar A, Bouchel D, Njoya A. Epidémiologie des parasitoses digestives des jeunes bovins dans le Nord-Cameroun. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 1994; 47: 365-74.
9. Coles G, Bauer C, Borgsteede F, Geerts S, Klei T, Taylor M, et al. World association for the advancement of veterinary parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 1992; 44: 35-44. [CrossRef]
10. Wabo PJ, Bilong BC, Mpoame M. *In vitro* nematicidal activity of extracts of *Canthium mannii* (Rubiaceae), on different life-cycle stages of *Heligmosomoides polygyrus* (Nematoda, Heligmosomatidae). *J Helminthol* 2010; 84: 156-65. [CrossRef]
11. Wabo PJ, Bilong CB, Mpoame M, Ngwa CF, Coles C. *In vitro* activity of ethanol, cold and hot water extracts of the stem bark of *Canthium mannii* (Rubiaceae) on *Ancylostoma caninum* eggs. *East Cent Afr J Pharma Sci* 2006; 9: 14-8.
12. Smyth JD. *Animal Parasitology*, 3rd ed. London, UK: Cambridge University Press; 1996.
13. Morrison AA, Mitchell S, Mearns R, Richards I, Matthews JB, Bartley DJ. Phenotypic and genotypic analysis of benzimidazole resistance in the ovine parasite *Nematodirus battus*. *Parasitol Res* 2014; 45: 116. [CrossRef]
14. Kalmobé J, Ndjonka D, Boursou D, Vildina JD, Liebau E. Phytochemical analysis and *in vitro* anthelmintic activity of *Lophira lanceolata* (Ochnaceae) on the bovine parasite *Onchocerca ochengi* and on drug resistant strains of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *BMC Complement Altern Med* 2017; 17: 404. [CrossRef]
15. Al-Shaibani I, Phulan M, Arijio A, Qureshi T. Ovicidal and larvicidal properties of *Adhatoda vasica* (L.) extracts against gastrointestinal nematodes of sheep *in vitro*. *Pak Vet J* 2008; 28: 79-83.
16. Suteky T, Dwatmadji T. Anthelmintic activity of *Melastomamala batricum* extract of *Haemonchus contortus* *in vitro*. *Asian J Pharm Clin Res* 2011; 4: 68-70.
17. Tiwari P, Kumar B, Kumar M, Debnath J, Sharma P. Comparative anthelmintic activity of aqueous and ethanolic stem extract of *Tinospora cordifolia*. *Int J Drug Dev Res* 2011; 3: 70-83.
18. Bimkr M, Abdul Rahman R, Ganjloo A, Salleh LM, Selamat J, Hamid A, et al. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food Bioprod Process* 2011; 89: 67-72. [CrossRef]
19. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 2010; 15: 7313-52. [CrossRef]
20. Hamad KK, Iqbal Z, Muhammad G. Antinematicidal activity of *Nicotiana tabacum* L. leaf extracts to control benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* in sheep. *Pak Vet J* 2013; 33: 85-90.

21. Ngaradoum O, Kagira JM, Karanja SM, Kipyegon K, Maina N. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of aqueous and methanolic extracts of *Ziziphus mucronata* barks against *Haemonchus contortus*. *Eur J Exp Bio* 2017; 7: 1.
22. Zabré G, Kaboré A, Bayala B, Katiki LM, Costa-Junior LM, Tamboura HH, et al. Comparison of the *in vitro* anthelmintic effects of *Acacia nilotica* and *Acacia raddiana*. *Parasite* 2017; 24: 44. [\[CrossRef\]](#)
23. Cabardo DE Jr, Portugaliza H. Anthelmintic activity of *Moringa oleifera* seed aqueous and ethanolic extracts against *Haemonchus contortus* eggs and third stage larvae. *Int J Vet Sci Med* 2017; 5: 30-4. [\[CrossRef\]](#)
24. Engstrom M, Karonen M, Ahern J, Baert N, Payré B, Hoste H, et al. Chemical structures of plant hydrolyzable tannins reveal them *in vitro* activity against egg hatching and motility of *Haemonchus contortus* nematodes. *J Agr Food Chem* 2016; 64: 840-51. [\[CrossRef\]](#)
25. Wabo Poné J, Fossi Tankoua O, Yondo J, Komtangi MC, Mbida M, Bilong Bilong C. The *in vitro* effects of aqueous and ethanolic extracts of the leaves of *Ageratum conyzoides* (Asteraceae) on three life cycle stages of the parasitic nematode *Heligmosomoides bakeri* (Nematoda: Heligmosomatidae). *Vet Med Int* 2011; 140:293.
26. Sutar N, Garai R, Sharma UK, Sharma US, Jana GK, Singh A. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Cocciniaindica* leaves extracts. *J Pharm Res* 2010; 3: 2172-3.
27. WaboPoné J, Payne VK, NgangoutAlidou M, WaboPoné J, Komtangi MC, Yondo J, et al. *In vitro* ovicidal and larvicidal activities of aqueous and ethanolic extracts of stem bark of *Nauclea latifolia* (Rubiaceae) on *Heligmosomoides bakeri* (Nematoda, Heligmosomatidae). *Med Plants* 2012; 4: 212-7.
28. Chartier C, Etter E, Hoste H, Pors I, Koch C, Dellac B. Efficacy of copper oxide needles for the control of nematode parasites in dairy goats. *Vet Res Comm* 2000; 24: 389-99. [\[CrossRef\]](#)
29. Moreno-Gonzalo J, Osoro K, García U, Frutos P, Celaya R, Ferreira LM, et al. Effect of the consumption of heather on incoming larvae and established population of *Teladorsagia circumcincta* in experimentally infected Cashmere goats. *Vet Parasitol* 2013; 196: 124-9. [\[CrossRef\]](#)
30. Peter W, Deogracious O. The *in vitro* ascaricidal activity of selected indigenous medicinal plants used in ethno veterinary practices in Uganda. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2006; 3: 94-103.

# Direkt Bakıda Tanımlama Zorluğu Yaşanılan Dört Parazit İçin Alternatif Bir Yaklaşım

Alternative Staining Method for Four Parasites that are Difficult to Identify through Direct Inspection

Koray Öncel 

Mehmet Akif İnan Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Şanlıurfa, Türkiye

**Cite this article as:** Öncel K. Alternative Staining Method for Four Parasites that are Difficult to Identify through Direct Inspection. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2018; 42(4): 268-76.

## ÖZ

**Amaç:** Taze dışkı örneklerinde, ıslak preparat (nativ-lugol) incelemesinde tanımlamada zorlandığımız *Blastocystis* spp. (özellikle granüler form), *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica/dispar* trofozoitleri ile deneyimsiz araştırmacıların tereddüt yaşayabileceği *Giardia intestinalis* kistleri için farklı bir fiksatif kullanılarak Trikróm boyası ile yaklaşık beş dakika içinde tanımlanması amaçlanmıştır.

**Yöntemler:** Çinko sülfat hidrat, bakır sülfat hidrat, alüminyum sülfat hidrat ve ferrik sülfat hidrat gibi dört farklı mordan [bazı boyalar ile koordinasyon kompleksleri oluşturan polivalens (en az +2 değerlikli) metaller] kullanılarak hazırlanmış etil alkol, formalin, asetik asit ve distile su bazlı fiksatifler ile tespit edilmiş preparatlar Gomori'nin trikróm boyasının modifiye edilmiş şekli ile boyanmıştır. Kontrol ve kıyaslama amacıyla altın standart olarak; cıva klorür içeren Schaudinn fiksatif ile fikse edilen örnekler Gomori'nin trikróm boyasının Wheatley modifikasyonu ile boyanmıştır.

**Bulgular:** *D. fragilis* ve *Entamoeba histolytica/dispar* trofozoitleri ele alındığında; alternatif yöntem tatbik edilen dışkı örnekleri ile klasik fiksasyon/ boyama yöntemi ile boyanmış preparatlar arasında değerlendirme kriterleri açısından hemen hemen benzer sonuçlar alınmıştır. *Blastocystis* spp. ve *Giardia intestinalis* kistleri ele alındığında ise, klasik fiksasyon/boyama yönteminin alternatif yöntemle nazaran biraz daha üstün olduğu gözlenmiştir.

**Sonuç:** Alternatif yöntem klasik yöntemle göre bir miktar yetersiz kalmasına rağmen sürecin kısalığı göz önüne alındığında iyi bir seçenek gibi gözükmektedir.

**Anahtar sözcükler:** Protozoon, dışkı, fiksatif

**Geliş Tarihi:** 20.02.2018

**Kabul Tarihi:** 18.05.2018

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of the present study was to identify *Blastocystis* spp. (particularly the granular form), *Dientamoeba fragilis*, and *Entamoeba histolytica/dispar* trophozoites, which are difficult to identify using wet mount, as well as *Giardia intestinalis* cysts, which are difficult to identify by inexperienced researchers, in fresh fecal samples within 5 min using a different fixative employing trichrome staining.

**Methods:** The slides were fixed by fixatives based ethyl alcohol, formalin, acetic acid, and distilled water including four different mordants (divalent or polyvalent metals that form coordination complex with some dyes) consisted of zinc sulfate hydrate, copper sulfate hydrate, aluminum sulfate hydrate, and ferric sulfate hydrate using a modification of Gomori's trichrome staining. Samples fixed by Schaudinn fixative including mercury chloride were stained using Wheatley modification of Gomori's trichrome staining as gold standard for control and comparison.

**Results:** Regarding *D. fragilis* and *E. histolytica/dispar* trophozoites, similar results were obtained among the slides stained by classical fixation/ staining method and those stained by the alternative method. However, regarding *Blastocystis* spp. and *Giardia intestinalis* cysts, classical fixation/ staining method was relatively superior to the alternative method.

**Conclusion:** Although the alternative method is slightly inferior to the classical fixation/staining method, it seems to be a good option with respect to the process time.

**Keywords:** Protozoa, feces, fixative

**Received:** 20.02.2018

**Accepted:** 18.05.2018

## GİRİŞ

Dışkı örneklerinde bağırsak parazitlerinin tanısını etkileyen en önemli faktörlerden biri de numunenin verilmesi ile incelenmesi arasında geçen zaman faktörüdür. İdeal şartlarda sulu ve yarı katı dışkılarda özellikle de trofozoit şekilleri-

nin yapılarının bozulmadan tanımlanabilmesi için numune verildikten 30 dakika içinde incelenmesi gerekmektedir. Hasta-çalışan uyumu, laboratuvar işleyiş yoğunluğu, ilk incelemede tanımlamada tereddütte kalınanların tekrardan incelenmesi gibi faktörler bu sürecin aksamasına sebep ol-

**Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** Koray Öncel E.mail: korayoncel@gmail.com

DOI: 10.5152/tpd.2018.5902

©Telif hakkı 2018 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.turkiyeparazitolog.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2018 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.turkiyeparazitolog.org

maktadır. Zaman faktörünü bir şekilde bertaraf edebilmek için fiksatifler kullanılmaktadır (1).

Potansiyel karsinogenik özellikleri, inhalasyon ve deriden emilmesi sonucunda yüksek toksisitesi olmasına rağmen formalin solüsyonu ile yüksek düzeyde toksik ve koroziv özelliklere sahip cıva klorür ( $HgCl_2$ ) bazlı Schaudinn ve düşük viskoziteli polivinilalkol (PVA) fiksatifleri bağırsak parazit yaymalarının iyileştirme ve tanısı için dışkı örneklerinin korunmasında birçok laboratuvar uzun senelerdir kullanılmakta olan geleneksel dışkı fiksatifleridir (2-4).

Bağırsak parazitlerinin morfolojik olarak uzun dönemli korunmasını sağladıkları için halen parazitolojide altın standart olarak kabul edilmektedirler. Formalin solüsyonu helmint erişkin ve yumurtaları ile protozoon kistleri gibi farklı yaşam evrelerini korumada kullanılmaktadır (2).

Polivinilalkol plastik bir reçine olup; dışkı yaymaları hazırlanması esnasında dışkının cam slayt üzerine yapışmasını kolaylaştırıcı etki yapmaktadır (2, 5).

Atıklarının yüksek maliyetli bertaraf sorununa rağmen cıva klorür ( $HgCl_2$ ) içeren Schaudinn veya PVA'lı Schaudinn fiksatifleri öncelikli olarak bağırsak protozoonlarının tanısında kullanılmaktadır. Çinko sülfat ( $ZnSO_4$ ) ve bakır sülfat ( $CuSO_4$ ) gibi farklı mordanlar ile kıyaslandığında bu amaç için halen en önemli teknik olduğu düşünülmektedir (3, 5, 6).

Çalışmamızın temel amacı; taze dışkı örneklerinde, ıslak preparat (nativ-lugol) inceleme esnasında tanımlamada zorlandığımız *Blastocystis* spp. (özellikle granüler form), *Dientamoeba fragilis* (*D. fragilis*), *Entamoeba histolytica/dispar* (*E. histolytica/dispar*) trofozoitleri ile deneyimsiz araştırmacıların tereddüt yaşayabileceği *Giardia intestinalis* (*G. intestinalis*) kistleri için dört farklı mordan seçeneği ile hazırlanan yeni bir fiksatif kullanarak Trikróm boyası ile yaklaşık beş dakika içinde tanımlanmasıdır.

## YÖNTEMLER

Çalışmamızda kullanılacak olan fiksatifimiz içerik olarak 100 mL'de; 15 mL etil alkol (temel olarak %96'lık etil alkol kullanılmıştır), 1 mL formalin solüsyonu (temel olarak %37-40'lık formalin kullanılmıştır), 5 mL asetik asit (temel olarak %99'lük asetik asit kullanılmıştır) ve 79 mL distile su içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Hazırladığımız baz fiksatif solüsyonlarının içerisine mordan olarak; 50 mg çinko sülfat hidrat ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ), 50 mg bakır sülfat hidrat ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), 50 mg alüminyum sülfat hidrat [ $Al_2(SO_4)_3 \cdot xH_2O$ ] ve 50 mg ferrik sülfat hidrat [ $Fe_2(SO_4)_3 \cdot xH_2O$ ] eklenmiş, karıştırılarak tamamen fiksatif içinde çözünmeleri sağlanmıştır. Mordanlar çözüldüğü anda dört farklı fiksatif de kullanıma hazır hale gelmiştir.

Karşılaştırma amacıyla altın standart olarak cıva klorür ( $HgCl_2$ ) içeren Schaudinn fiksatifini kullanılmıştır.

Taze dışkı örnekleri nativ-lugol inceleme yapıldıktan sonra, öncelikli olarak *Blastocystis* spp. (özellikle granüler form), *D. fragilis*, *E. histolytica/dispar* trofozoitleri ve *G. intestinalis* kistleri olduğu düşünülen dışkı örnekleri ayrılmıştır. Fiksasyon ve boyama süreci çok kısa olduğu için dört farklı mordan ile aynı anda boyama

yapılmıyorsa sırası ile bakır sülfat hidrat, çinko sülfat hidrat, alüminyum sülfat hidrat ve ferrik sülfat hidrat içeren her bir fiksatif ile işlem yapılmıştır.

Altın standart yöntem ile fiske edilen ve Gomori'nin trikrom boyasının Wheatley modifikasyonu ile boyanan preparatlar yaklaşık 60-70 dakika arasında incelemeye hazır hale gelmektedir (7). Alternatif yöntemimizde; fiksatifte 1 dakika, %96'lık etilalkolde 3 dakika, Trikróm boyada 1 dakika bekletilmektedir. Renk giderme safhasında sırası ile 0,5 mL glasiyal asetik asit içeren %90'lık etil alkolde 1-3 saniye, sonrasında iki adet %96'lık etilalkolde 1-3 saniye bekletilerek boyama tamamlanmaktadır. Ksilende 1 dakika yeterli olmakla birlikte süreyi uzatıp uzatmamak uygulayıcının tercihine bırakılmıştır.

Her dışkı örneği için hazırlanan beşer adet boyalı preparat x1000 büyütmede ışık mikroskopunda incelenmiştir. Değerlendirme esnasında dikkat edilen parametreler; genel anlamda parazitin morfolojisi, çekirdek ve sitoplazmik organellere ait detayların şekil ve netliği ile parazitin dışkıdaki artefaktların arasında fark edilebilirliği olmuştur. Skorlamada; bu kriterler dikkate alındığında 1 en kötü, 5 ise en iyi kriterlere sahip olanı belirtmek için kullanılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan dışkı örnekleri ile ilgili olarak hastalardan onam belgesi alınmıştır.

Bu çalışma için etik kurul onayı Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (08.06.2017 tarih, 06 no'lu oturum, 17 sayılı karar).

## BULGULAR

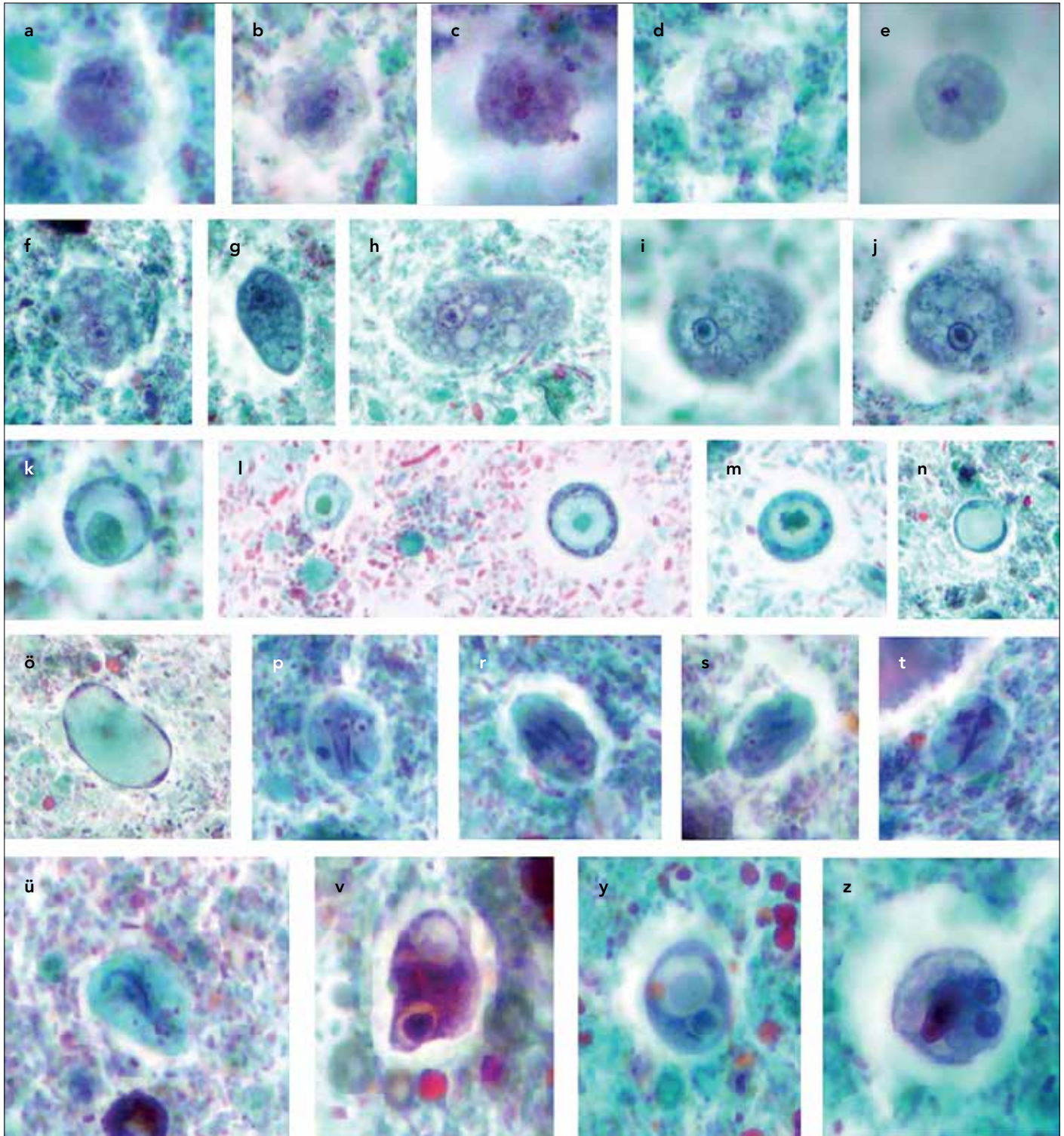
Nativ-lugol inceleme sonrası *Blastocystis* spp (özellikle granüler form), *D. fragilis*, *E. histolytica/dispar* trofozoitleri ve *G. intestinalis* kistleri olduğu düşünülen 50 adet taze dışkı örneğine ait toplamda 250 adet boyalı preparat incelenmiş ve kullanılan mordanlara göre bulgular Tablo 1'de kıyaslanmıştır.

Tablodan da anlaşılacağı üzere; *D. fragilis* ve *E. histolytica/dispar* trofozoitleri ele alındığında, alternatif fiksatifler ile tespit edilerek hızlı bir şekilde Trikróm boyama yöntemi tatbik edilen dışkı örnekleri ile Schaudinn fiksatifini ile tespit edilmiş ve klasik Trikróm yöntemi ile boyanmış preparatlar arasında parazitin morfolojisi, çekirdek ve sitoplazmik organellere ait detayların şekil ve netliği ile parazitin dışkıdaki artefaktların arasında fark edilebilirliği açısından hemen hemen benzer ya da yakın sonuçlar alınmıştır (Resim 1a, b, c, d, e, f, g, h, i, j).

*Blastocystis* spp. ele alındığında, klasik fiksasyon/boyama yönteminin alternatif yöntem nazaran parazitin morfolojik netliği ile parazitin dışkıdaki artefaktların arasında fark edilebilirliği açısından biraz daha üstün olduğu gözlenmiştir (Resim 1k, l, m, n, ö).

*Giardia intestinalis* kistleri ele alındığında, klasik fiksasyon/boyama yönteminin alternatif yöntem nazaran parazitin morfolojik netliği ile parazitin dışkıdaki artefaktların arasında fark edilebilirliği açısından biraz daha üstün olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu parazitte dört farklı mordan ile yapılan alternatif fiksatiflerin tü-





**Resim 1. a-z.** a) Alüminyum sülfat hidrat, *D. Fragilis*. b) Bakır sülfat hidrat, *D. Fragilis*. c) Ferrik sülfat hidrat, *D. Fragilis*. d) Çinko sülfat hidrat, *D. Fragilis*. e) Schaudinn fiksatif, *D. Fragilis*. f) Alüminyum sülfat hidrat, *E. histoyltica /dispar*. g) Ferrik sülfat hidrat, *E. histoyltica /dispar*. h) Çinko sülfat hidrat, *E. histoyltica /dispar*. i) Bakır sülfat hidrat, *E. histoyltica /dispar*. j) Schaudinn fiksatif, *E. histoyltica /dispar*. k) Bakır sülfat hidrat, *B. hominis*. l) Ferrik sülfat hidrat, *B. hominis*. m) Çinko sülfat hidrat, *B. hominis*. n) Alüminyum sülfat hidrat, *B. hominis*. ö) Schaudinn fiksatif, *B. hominis*. p) Çinko sülfat hidrat, *G. intestinalis*. r) Alüminyum sülfat hidrat, *G. Intestinalis*. s) Bakır sülfat hidrat, *G. Intestinalis*. t) Ferrik sülfat hidrat, *G. Intestinalis*. ü) Schaudinn fiksatif, *G. intestinalis*. v) Bakır sülfat hidrat, *I. bütschlii*. y) Ferrik sülfat hidrat, *I. bütschlii*. z) Alüminyum sülfat hidrat, *E. hartmanni*

**Tablo 1.** Boyalı preparatların kullanılan fiksatif ve içerdiği mordana göre değerlendirilmesi

Örnek No	Parazit İsmi	Kullanılan fiksatif ve içerdiği mordan				
		Yeni fiksatif				Schaudinn
		CuSO4	ZnSO4	Al2 (SO4)3	Fe2 (SO4)3	HgCl2
1	<i>B. hominis</i>	4,5	3,4	4,5	5	4,5
	<i>D. fragilis</i>	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
2	<i>B. hominis</i>	3,4	3	3	3,4	3
	<i>D. fragilis</i>	4,5	5	4,5	4,5	4,5
3	<i>B. hominis</i>	3	3	3	3,4	3-5
	<i>E. nana</i> (trf)	3-5	3-5	3-5	3	3-5
	<i>G. intestinalis</i> (k)	2-5	2-5	1,2	2,3	2-5
	<i>G. intestinalis</i> (trf)	1	3,4	3,4	3	4
	<i>E. coli</i> (trf)	4,5	4,5	3	4	4,5
4	<i>B. hominis</i>	4,5	4,5	3-5	3-5	3-5
	<i>E. h/E. d</i> (trf)	4,5	4,5	5	4,5	4,5
	<i>E. nana</i> (trf)	3,4	3,4	3	Ø	3
5	<i>B. hominis</i>	3,4	3-5	4,5	3-5	4,5
	<i>E. h/E. d</i> (trf)	4,5	5	5	4,5	4,5
6	<i>D. fragilis</i>	4,5	3,4	5	3-5	4,5
7	<i>B. hominis</i>	4	3,4	3	3,4	3-5
	<i>E. coli</i> (pk)	4	2,3	1,2	2,3	3-5
8	<i>B. hominis</i>	3	Ø	2	3	3,4
	<i>E. nana</i> (trf)	3	1	3,4	2-4	3,4
	<i>G. intestinalis</i> (k)	2	1	2	1,2	2-4
9	<i>B. hominis</i>	4	3,4	3,4	3,4	2-4
10	<i>B. hominis</i>	2,3	3-5	2-4	3-5	3,4
	<i>C. mesnili</i> (k)	2	3-5	2,3	4,5	3
11	<i>B. hominis</i>	4,5	3,4	2,3	3,4	3-5
	<i>D. fragilis</i>	Ø	3	2,3	3,4	2,3
12	<i>B. hominis</i>	3,4	3,4	3,4	3-5	4,5
	<i>D. fragilis</i>	4,5	Ø	3,4	Ø	3,4
	<i>E. nana</i> (k)	4,5	4,5	4,5	4,5	5
	<i>E. nana</i> (trf)	4,5	3	3,4	4,5	3-5
13	<i>B. hominis</i>	4	3,4	3,4	3,4	3,4
14	<i>B. hominis</i>	2,3	3,4	3	2,3	3,4
	<i>D. fragilis</i>	3-5	3-5	Ø	Ø	Ø
15	<i>B. hominis</i>	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4
16	<i>C. mesnili</i> (k)	3-5	3-5	2,3	3-5	4,5
	<i>E. hartmanni</i> (k)	1-3	1-4	1-4	1-3	3-5
	<i>E. coli</i> (k)	1,2	3	1	1	3-5
17	<i>B. hominis</i>	3,4	2,3	2-4	2,3	2,3
	<i>C. mesnili</i> (k)	3,4	3-5	1-4	3	1-3
	<i>C. mesnili</i> (trf)	3,4	Ø	Ø	Ø	Ø
	<i>E. coli</i> (k)	1-3	1-3	1-3	1,2	2-4
18	<i>B. hominis</i>	3-5	2-4	2,3	2-4	2,3
	<i>D. fragilis</i>	3,4	1-3	3,4	2-5	3,4

**Tablo 1.** Boyalı preparatların kullanılan fiksatif ve içerdiği mordana göre değerlendirilmesi (devam)

Örnek No	Parazit İsmi	Kullanılan fiksatif ve içerdiği mordan				Schaudinn
		Yeni fiksatif				
		CuSO4	ZnSO4	Al2 (SO4)3	Fe2 (SO4)3	
	<i>E. coli</i> (k)	1-3	Ø	Ø	Ø	3,4
	<i>E. coli</i> (trf)	3-5	1	1,2	1-4	3,4
19	<i>B. hominis</i>	2,3	2,3	2,3	2,3	3,4
	<i>D. fragilis</i>	Ø	Ø	Ø	Ø	3
20	<i>B. hominis</i>	3	2,3	2,3	2,3	2-4
	<i>D. fragilis</i>	2,3	2,3	2,3	2,3	2-5
21	<i>B. hominis</i>	3,4	2-4	3,4	3,4	2-4
22	<i>B. hominis</i>	3	3,4	3,4	3-5	3-5
	<i>D. fragilis</i>	3-5	4,5	4,5	3-5	3-5
23	<i>B. hominis</i>	3	2-4	1,2	2	3,4
24	<i>G. intestinalis</i> (k)	1-5	1-5	1-4	2-5	1-5
25	<i>B. hominis</i>	2,3	2	2,3	2-4	2-4
	<i>E. nana</i> (trf)	Ø	2,3	2,3	2	2-4
	<i>E. coli</i> (trf)	3,4	3,4	3,4	3,4	4
26	<i>B. hominis</i>	3,4	2-4	2-4	2,3	3,4
27	<i>B. hominis</i>	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4
28	<i>B. hominis</i>	2-4	2-4	2-4	2-4	3-4
	<i>D. fragilis</i>	3-5	Ø	4,5	Ø	3
	<i>E. nana</i> (trf )	2,3	Ø	Ø	Ø	Ø
29	<i>B. hominis</i>	4,5	2-4	2-4	2-4	3-5
	<i>D. fragilis</i>	4,5	Ø	Ø	Ø	Ø
30	<i>B. hominis</i>	2-4	3,4	2-4	2-4	3-5
	<i>E. nana</i> (k)	Ø	3,4	Ø	Ø	3-5
	<i>E. nana</i> (trf)	3,4	1,2	Ø	3	2-4
31	<i>D. fragilis</i>	3-5	3-5	2,3	3	3,4
32	<i>B. hominis</i>	2-4	2-4	3	2-4	3-5
	<i>D. fragilis</i>	2-4	2-4	3,4	2,3	4,5
33	<i>B. hominis</i>	2-4	2-4	3	2-4	3-5
	<i>D. fragilis</i>	2-4	2-4	2-4	4,5	3,4
	<i>C. mesnili</i> (trf)	Ø	Ø	4,5	Ø	3,4
34	<i>B. hominis</i>	Ø	1-3	1-3	2-4	2
	<i>D. fragilis</i>	3-5	3,4	2,3	Ø	3-5
	<i>E. nana</i> (k)	3,4	3	4	3	3-5
	<i>E. nana</i> (trf)	3,4	3,4	3-5	3,4	3-5
	<i>G. intestinalis</i> (k)	3-5	3-5	3,4	Ø	3,4
	<i>E. coli</i> (trf)	3	Ø	Ø	3	Ø
	<i>C. mesnili</i> (trf)	3,4	3,4	3	1,2	3-5
35	<i>B. hominis</i>	2-4	2-4	Ø	4	2-4
	<i>D. fragilis</i>	3	3,4	Ø	4,5	4
36	<i>B. hominis</i>	2-4	2,3	1,2	2-4	3,4
	<i>E. nana</i> (k)	2-4	2-4	2,3	3,4	4,5
	<i>E. nana</i> (trf)	2,3	3	Ø	3,4	Ø

**Tablo 1.** Boyalı preparatların kullanılan fiksatif ve içerdiği mordana göre değerlendirilmesi (devam)

Örnek No	Parazit İsmi	Kullanılan fiksatif ve içerdiği mordan				Schaudinn
		Yeni fiksatif				
		CuSO4	ZnSO4	Al2 (SO4)3	Fe2 (SO4)3	
37	<i>B. hominis</i>	1-4	2-4	2,3	2-4	3,4
	<i>E. nana</i> (trf)	3	3	4,5	3,4	4,5
38	<i>E. nana</i> (k)	3-5	1-5	1-4	3-5	5
	<i>E. nana</i> (trf)	3,4	Ø	3,4	4	4,5
39	<i>B. hominis</i>	3	1,2	1,2	1-3	3,4
	<i>D. fragilis</i>	3,4	Ø	Ø	3,4	Ø
	<i>E. nana</i> (k)	3	2,3	Ø	Ø	4
	<i>E. nana</i> (trf)	Ø	Ø	3,4	3,4	5
40	<i>B. hominis</i>	2,3	3	2,3	2	2-4
41	<i>B. hominis</i>	2-4	2-4	2-4	2-4	3-5
	<i>E. nana</i> (trf)	2-5	3-5	3-5	2-4	4,5
	<i>C. mesnili</i> (trf)	4	Ø	3,4	4,5	4,5
42	<i>G. intestinalis</i> (k)	3-5	2-5	1-5	1-4	3-5
43	<i>D. fragilis</i>	3-5	3,4	3,4	2,3	3,4
	<i>E. coli</i> (trf)	3	3,4	1-4	1,2	3-5
	<i>E. coli</i> (pk)	3-5	2,3	Ø	Ø	3-5
44	<i>B. hominis</i>	Ø	1-3	1-3	Ø	1-4
	<i>E. nana</i> (k)	3	1-3	1,2	2-5	4,5
	<i>C. mesnili</i> (k)	3	1,2	1,2	1,2	2-4
45	<i>I. bütschlii</i> (k)	1,2	2,3	1,2	1,2	2-4
46	<i>B. hominis</i>	2-4	2-5	3-5	3-5	5
	<i>E. coli</i> (pk)	3-5	Ø	3	3,4	4
47	<i>D. fragilis</i>	3-5	3	3	3	4
48	<i>G. intestinalis</i> (k)	1-3	1-4	1-3	1-4	1-4
49	<i>B. hominis</i>	1-3	1-3	1-3	1-3	1-3
50	<i>B. hominis</i>	2-4	2-4	2-4	2-4	3-5

trf: trofozoid, k: kist, pk: prekist, Ø: preparatta görülmüdi

1-5 arası rakamlar: Değerlendirme esnasında dikkat edilen parametrelerin (genel anlamda parazitin morfolojisi, çekirdek ve sitoplazmik organellere ait detayların şekil ve netliği ile parazitin dışkıdaki artefaktların arasında fark edilebilirliği) incelemeyi yapan uzman tarafından sayısal verilere dökümdür. 1 rakamı en kötü, 5 rakamı en iyi sayısal veriye karşılık gelmektedir.

münde boyanabilirlik açısından bir ile beş arasında değişen geniş bir patern elde edilmiştir (Resim 1p, r, s, t, ü).

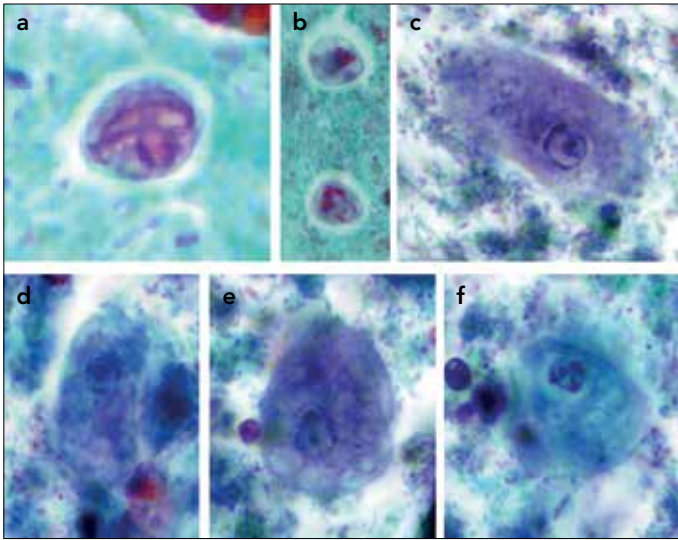
Her ne kadar önceliğimiz olmamasına rağmen non-patojen protozoonlardan olan *Endolimax nana* (*E. nana*), *Entamoeba coli* (*E. coli*), *Chilomastix mesnili* (*C. mesnili*), *Entamoeba hartmanni* (*E. hartmanni*), *Iodamoeba bütschlii* (*I. bütschlii*) kist veya trofozoitleri de boyanan preparatlarda tiplendirilebilmiştir. *E.coli*, *C.mesnili*, *E. hartmanni* ve *I.bütschlii* kistik yapılarında klasik fiksasyon/boyama yönteminin alternatif yöntem nazaran parazitin morfolojik netliği ile parazitin dışkıdaki artefaktların arasında fark edilebilirliği açısından daha üstün olduğu gözlenmiştir (Resim1v, y, z, 2a, 2b).

*Entamoeba coli* trofozoitlerinde de *E. histolytica/dispar* trofozoitlerine benzer şekilde, alternatif fiksatifler ile tespit edilerek hızlı

bir şekilde Trikrom boyama yöntemi tatbik edilen dışkı örnekleri ile Schaudinn fiksatifini ile tespit edilmiş ve klasik Trikrom yöntemi ile boyanmış preparatlar arasında parazitin morfolojisi, çekirdek ve sitoplazmik organellere ait detayların şekil ve netliği ile parazitin dışkıdaki artefaktların arasında fark edilebilirliği açısından hemen hemen benzer ya da yakın sonuçlar alınmıştır (Resim 2c, 2d, 2e, 2f).

Alternatif metotta mordanlar arasında kıyaslama yapıldığında en iyi sonuçların sırası ile bakır sülfat hidrat ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), ferrik sülfat hidrat [ $Fe_2(SO_4)_3 \cdot H_2O$ ], çinko sülfat hidrat ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) ve alüminyum sülfat hidrat [ $Al_2(SO_4)_3 \cdot H_2O$ ] içeren boyalar ile alındığı görülmüştür. Çinko sülfat hidrat ve ferrik sülfat hidrat her ne kadar birbirine yakın boyama yapmış olsalar da ferrik sülfat hidrat ile boyanan preparatlar ile daha bakır kırmızısı bir sitoplaz-





**Resim 2. a-f.** a) Çinko sülfat hidrat, *C. Mesnili*. b) Çinko sülfat hidrat, *E. hartmanni*. c) Bakır sülfat hidrat, *E. Coli*. d) Ferrik sülfat hidrat, *E. Coli*. e) Çinko sülfat hidrat, *E. Coli*. f) Schaudinn fiksativ, *E. coli*

ma rengi alınmıştır. Alüminyum sülfat hidrat ve çinko sülfat hidrat ile boyanan preparatlar hem saha hem de parazitler yapılar açısından daha yeşile çalan bir renk vermiştir.

### TARTIŞMA

Parazitoloji laboratuvarları ve parazitolojik tetkiklerin yapıldığı mikrobiyoloji laboratuvarlarında barsak protozoonlarının ayırt edilmesinde en önemli teknik olarak kabul edilen HgCl<sub>2</sub> içeren Schaudinn veya düşük viskoziteli PVA ile fiske edilen ve Gomeri'nin trikrom boyasının Wheatley modifikasyonu ile boyanan preparatlar yaklaşık 60-70 dakika arasında incelemeye hazır hale gelmektedir (6, 7).

Rutin laboratuvarlarda teknisyen sayısının azlığı, yeterli deneyime sahip olmaması, klasik yöntemin oldukça vakit alması sebebiyle çoğu zaman sadece ishelli dışkılarda boyama metodunun kullanılmasına ya da hiç yapılmamasına yol açmaktadır. Klasik yöntem kullanıldığında ise yoğun çalışan laboratuvarlarda ya da toplum taraması gerektiren yüksek sayılı örneklemelerde fiksasyon ve boyama süresinin uzun oluşunun dezavantajlarını yaşamaktayız.

Yüksek bertaraf maliyetlerine ve zorluklarına rağmen halen HgCl<sub>2</sub> içeren Schaudinn veya düşük viskoziteli PVA fiksatifleri kullanılmakta ya da tercih edilmektedirler (5).

Garcia ve ark. (6) yapmış oldukları çalışmada bakır sülfat (CuSO<sub>4</sub>) ve cıva klorür (HgCl<sub>2</sub>) içeren PVA fiksatiflerinin etkinliğini kıyaslamışlardır. Sayısal anlamda preparatlarda etkenlerde atlama yapmasa da, netlik ve çekirdek ayrıntıları açısından daha kötü bir performans sergilediği ve sitoplazmik büzüşme görüldüğü belirtilmiştir.

Garcia ve ark. (5) yapmış oldukları bir başka çalışmada çinko sülfat (ZnSO<sub>4</sub>) ve cıva klorür (HgCl<sub>2</sub>) içeren PVA fiksatiflerinin etkinliğini kıyaslamışlardır. Her ne kadar sayısal anlamda nadir protozoon içeren bazı preparatlarda etkeni atlasa da, netlik ve çekirdek/si-

toplama ayrıntıları açısından daha kötü bir performans sergilese de çinko sülfat (ZnSO<sub>4</sub>)'ın protozoonları tanımlama da alternatif bir mordan olabileceğini belirtilmiştir.

Garcia ve Shimizu (3) yapmış oldukları bir diğer çalışmada ise bağırsak paraziti tespit edilen 46 hastadaki 67 protozoonun tanımlaması için Ecofix ile fiske edilen preparatları önerilen boya Ecostain (ES) ve Gomeri'nin trikrom boyasının Wheatley modifikasyonu (WT) ile boyamış ve kıyaslamıştır. ES ve WT ile boyanan preparatlardaki protozoonların yapısal karşılaştırmaları çoğu olguda (36/67 [53,7%]) eşit düzeyde, bazı olgularda (24/67 [35,8%]) ES ile boyanmış olanlar daha iyi, çok az bir kısmında (4/67[6%]) ise WT ile boyamada daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Farklı fiksatif ve boya eşleştirmelerinin sağlayacağı uyumun klasik metodolojide alternatif oluşturabileceğini belirtmişlerdir.

Nace ve ark. (4) yapmış oldukları çalışmada Streck tissue fixative (STF) adında bir fiksatif ile cıva klorür (HgCl<sub>2</sub>) içeren PVA fiksativ ve formalini karşılaştırmışlardır. Kalıcı boyalı preparatlarda PVA'ya oranla keskinliğin kaybolması, çekirdek ve sitoplazmik ayrıntıların soyutlaşması ve renk tonunda kırmızı ve yeşile çalma gibi bulgular elde etmişlerdir.

Jensen ve ark. (8) insan ve primat dışkısı kullanarak yaptıkları çalışmalarında düşük viskoziteli PVA'ya alternatif olarak üç ticari fiksativ (Ecofix, Parasafe ve Proto-fix) kalıcı boyalı preparatların hazırlanmasında karşılaştırmışlardır. Zemin ya da arka plan açısından Parasafe ile hazırlanan preparatlarda yaklaşık %40 oranında kirlilik görülürken diğer üç fiksativle hazırlanan preparatlarda bu görülmemiştir. Dört farklı metodun beş parazit (E. histolytica/dispar, E. coli, I. bütschlii, B. hominis, C. mesnili) tespit edilmesindeki duyarlılıkları istatistikî anlamda değerlendirildiğinde Protofix'in E. histolytica ve C. mesnili' nin tanımlanmasında PVA'dan daha iyi, diğer parazitlerin tanımlanmasında ise kıyaslanabilir olduğunu belirtmişlerdir. Ecofix'in ise tanımlamada PVA ile benzer olduğu fakat netlik ve çekirdek/sitoplazma ayrıntıları açısından daha kötü bir performans sergilediğini belirtmişlerdir. Parasafe'te ise E. histolytica, E. coli ve C. mesnili tanımlaması diğer üç metodun tümünden kötü olmuştur ve zeminde yeşil renkli bir kirlilik oluşmuştur. Ayrıca metodların uygulama aşamalarının 15 ile 22 basamak arasında olduğu, boyalı preparatın hazır hale gelmesi içinde 24 ile 55 dakika arasında bir sürenin gerektiğini belirtmişlerdir.

Pietrzak-Johnston ve ark. (2) çalışmalarında düşük viskoziteli PVA'ya alternatif olarak beş ticari fiksativ (Ecofix, sodyum asetat-asetik asid-formalin [SAF], STF, Parasafe ve Proto-fix) kalıcı boyalı preparatların hazırlanmasında karşılaştırmışlardır. Ecofix dışındaki ticari kitler ile yapılan kalıcı preparatların düşük viskoziteli PVA ile fiske edilmiş preparatlardaki boyama kalitesine kıyasla yetersiz kaldığını gözlemlemişlerdir. Ecofix ile fiske edilen preparatların da önerilen boya (Ecostain) ile boyandığı takdirde düşük viskoziteli PVA ile fiske edilmiş preparatlardaki boyama kalitesine benzer sonuçlar alınabildiğini belirtmişlerdir.

Genel anlamda önceki yapılan çalışmalara bakıldığında alternatif olarak sunulan yöntemlerde sürecin uzunluğu konusunda net bir çözüm sunulmamıştır.



Yapmış olduğumuz çalışmada elde ettiğimiz bulgular; alternatif yöntemin özellikle *Blastocystis* spp. (özellikle granüler form), *D. fragilis*, *E. histolytica/dispar* trofozoitleri ve *G. intestinalis* kistleri gibi dört patojen etkeni tanımlamada diğer dışı protozoonlarına kıyasla daha efektif olduğunu göstermiştir. *D. fragilis* ve *E. histolytica/dispar* trofozoitleri içeren preparatlar hemen hemen klasik yöntemle benzer kriterlerde boyanmışlardır. *Blastocystis* spp. ve *G. intestinalis* kistlerinde ise klasik yöntem biraz daha üstün olmakla beraber alternatif yöntemde 10 kat zaman kazandırarak avantaj sağlamıştır.

Öncelikli amacımız dört patojen etkeni tanımlama olmasına rağmen, boyanan preparatlarda *E. nana*, *E. coli*, *C. mesnili*, *E. hartmanni*, *I. bütschlii* kist veya trofozoitleri de tiplendirilebilmiştir. Genel anlamda kistik yapılarda klasik yöntemin üstünlüğü açık bir şekilde görülmekte iken trofozoit şekillerinde özellikle *E. coli* trofozoitlerinde de *E. histolytica/dispar* trofozoitlerine benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Bir başka açıdan bakarsak, boyamada klasik yöntem kadar etkili olamadığı *E. coli*, *C. mesnili*, *E. hartmanni*, *I. bütschlii* kistleri ile ilgili olarak, nativ-lugol incelemesinde tipik ayırt edici morfolojileri ile tiplendirme için neredeyse boyamaya bile ihtiyaç duyulmamasının bu yöntemin öneminin asıl nativ-lugol incelemede tanımlama gücüne bağlı olarak trofozoit şekillerinde ön plana çıkacağı yönündedir.

Boyamalar esnasında ilk tercihimin bakır sülfat hidrat olması sonuçları bir miktar bu mordan lehine olumlu etkilemiş olabilir. Değerlendirme aşamasında bazen trofozoit ve pre-kistik şekillerin yapıların görülmemesinde etken olarak; bazı dışkılardaki parazit yapıların sayısal anlamda çok az olmasına rağmen boyamanın yapılması olduğunu söyleyebilirim.

Ayrıca Sağlık Bakanlığı'nın yayımladığı yönetmelik ile yapılan düzenleme sonrasında, *E. histolytica*'nın etken olduğu amipli dizanteride kesin tanı için geçerli laboratuvar tekniklerinin içinde klinik tanımlamaya uygun olguların taze/sıcak dışkısının trikrom boyama ile mikroskopik incelemesinde eritrosit fagosite etmiş trofozoitlerin gözlenmesi gerektiği belirtilmiştir (9). Yeni yöntem ile bu prosedürün yerine getirilmesi yaklaşık beş dakika sürmektedir.

## SONUÇ

Çalışmamızda uygulanan yeni fiksatif ve modifiye edilmiş boyama yöntemi parazitoloji ve mikrobiyoloji laboratuvarlarında yapılmakta olan insan dışkısına ait parazitolojik tetkiklerde boya ile tanımlama sürecinde klasik yöntemle kıyasla on kat daha hızlı teşhise gitmemize olanak sağlamaktadır. Çalışma sürecinde görülmeyen birkaç parazitinde dahil edilmesi ile birlikte yapılacak olan çalışmaların bize metodun etkinliği ile ilgili daha kapsamlı bilgiler vereceği düşünülmektedir.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik kurul onayı Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (08.06.2017 tarih, 06 no'lu oturum, 17 sayılı karar).

**Informed Consent:** Taken

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir – K.Ö.; Tasarım – K.Ö.; Denetleme – K.Ö.; Kaynaklar – K.Ö.; Malzemeler – K.Ö.; Veri Toplanması ve/veya İşlenmesi – K.Ö.; Analiz ve/veya Yorum – K.Ö.; Literatür Taraması – K.Ö.; Yazıyı Yazan – K.Ö.; Eleştirel İnceleme – K.Ö.

**Teşekkür:** Bu araştırmanın hazırlanma aşamasında, boyalı preparatların fotoğraflanmasında teknik alt yapı imkanlarını sunarak yardımlarını esirgemeyen Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine başta Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Muhammed Emin Güldür olmak üzere, Araştırma Görevlileri Dr. Rabia Altunbas ve Dr. Osman Aydoğmuş'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca yazım aşamasındaki yorum ve önerileri ile desteklerini esirgemeyen Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Ana Bilim Dalı öğretim görevlileri Prof. Dr. Seray Töz ve Prof. Dr. Yusuf Özbek'e teşekkürlerimi sunarım.

**Çıkar Çatışması:** Yazar çıkar çatışması bildirmemiştir.

**Finansal Destek:** Yazar bu çalışma için finansal destek almadığını beyan etmiştir.

**Ethics Committee Approval:** The ethics committee approval for this study was taken from Harran University, Medical Faculty Ethics Committee (08.06.2017, 6th session, 17th decision).

**Hasta Onamı:** Hasta onamı alındı.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Concept – K.Ö.; Design – K.Ö.; Supervision – K.Ö.; Resources – K.Ö.; Materials – K.Ö.; Data Collection and/or Processing – K.Ö.; Analysis and/or Interpretation – K.Ö.; Literature Search – K.Ö.; Writing Manuscript – K.Ö.; Critical Review – K.Ö.

**Acknowledgements:** I would like to thank, in the preparation stage of this research, the faculty members of the Department of Medical Pathology of Harran University Faculty of Medicine, Department of Medical Pathology, who provided the technical infrastructure services for the photographing of the dyed preparations, were presented by Assoc. Dr. Research Assistants Dr. Muhammed Emin Güldür Rabia Altunbas and Osman Aydoğmuş. In addition, I would like to thank with the comments and suggestions in the writing stage, Ege University Faculty of Medicine, Medical Parasitology Department professors Dr. Seray Töz and Prof. Dr. Yusuf Özbek.

**Conflict of Interest:** Author has no conflicts of interest to declare.

**Financial Disclosure:** The author declared that this study has received no financial support.

## KAYNAKLAR

1. Limoncu ME, Ok ÜZ. Taze dışkı örneğinin toplanması tespit edilmesi ve nakli. Korkmaz M, Ok UZ, editörler. Parazitolojide Laboratuvar, Yöntem-Yorum-Akreditasyon. İzmir: Meta Basım; 2011.p. 9-16.
2. Pietrzak-Johnston SM, Bishop H, Wahlquist S, Moura H, De Oliveira Da Silva N, Pereira Da Silva S, et al. Evaluation of commercially available preservatives for laboratory detection of helminths and protozoa in human fecal specimens. J Clin Microbiol 2000; 38: 1959-64.
3. Garcia LS, Shimizu RY. Evaluation of intestinal protozoan morphology in human fecal specimens preserved in Ecofix: comparison of Wheatley's trichrome stain and EcoStain. J Clin Microbiol 1998; 36: 1974-6.
4. Nace EK, Steurer FJ, Eberhard ML. Evaluation of Streck tissue fixative, a non formalin fixative for preservation of stool samples and subsequent parasitologic examination. J Clin Microbiol 1999; 37: 4113-9.
5. Garcia LS, Shimizu RY, Shum A, Bruckner DA. Evaluation of intestinal protozoan morphology in polyvinylalcohol preservative: comparison

- of zinc sulfate- and mercuric chloride-based compounds for use in Schaudinn's fixative. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 307-10.
6. Garcia LS, Shimizu RY, Brewer TC, Bruckner DA. Evaluation of intestinal parasite morphology in polyvinyl alcohol preservative: comparison of copper sulfate and mercuric chloride base for use in Schaudinn's fixative. *J Clin Microbiol* 1983; 17: 1092-5.
  7. Girginkardeşler N, Ok ÜZ. Kalıcı Boyalı Yayımlar. Korkmaz M, Ok UZ, editors. *Parazitolojide Laboratuvar, Yöntem-Yorum-Akreditasyon*. İzmir: Meta Basım; 2011. p. 29-35.
  8. Jensen B, Kepley W, Guarner J, Anderson K, Anderson D, Clairmont J, et al. Comparison of Polyvinyl Alcohol Fixative with Three Less Hazardous Fixatives for Detection and Identification of Intestinal Parasites. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1592-8.
  9. Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. *Resmi Gazete*; 02.04.2011-27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 15.07.2017)

# Kış Aylarında Evcil Kedi ve Köpeklerdeki Pire (Siphonaptera: Pulicidae) Enfestasyonları ile İlgili Antalya, Türkiye’den Bir Araştırma

A Research about Flea (Siphonaptera: Pulicidae) Infestation on Domestic Cats and Dogs in Winter Months, from Antalya, Turkey

Gökçe Coşkun , Hüseyin Çetin 

Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya, Türkiye

**Cite this article as:** Coşkun G, Çetin H. A Research about Flea (Siphonaptera: Pulicidae) Infestation on Domestic Cats and Dogs in Winter Months, from Antalya, Turkey. *Türkiye Parazit Derg* 2018; 42(4): 277-80.

## ÖZ

**Amaç:** Birçok evcil hayvan sahibi, kedi ve köpeklerini sadece ilkbahar ve yaz aylarında dış parazitlerden korumak için önlemler almaktadır. Ancak araştırmalar pirelerin (Siphonaptera: Pulicidae) kış aylarında da evcil hayvanlar üzerinde parazit olarak bulunabildiğini göstermiştir. Bu araştırmada, üç aylık bir çalışma döneminde Antalya, Muratpaşa’da ki bir veteriner kliniğine getirilen kedi ve köpeklerin üzerinde bulunan pirelerin tür kompozisyonları araştırılmıştır.

**Yöntemler:** 1 Aralık 2017 ve 28 Şubat 2018 tarihleri arasında toplam 50 evcil hayvan, pire varlığı yönünden incelenmiştir. Pirelerin türleri evcil hayvanlardan toplandıktan sonra tespit edilmiştir.

**Bulgular:** Evcil hayvanlarda 2 farklı türe ait 152 adet pire bulunmuştur. İncelenen evcil hayvanların % 46’sı kedi (23) ve % 54’ü köpektir (27). Yirmi iki kedi sadece *Ctenocephalides felis* ile enfestedir. Ondokuz köpek sadece *Ct. felis*, 5 köpek sadece *Ct. canis* ve 3 köpek hem *Ct. felis* hemde *Ct. canis* ile enfeste bulunmuştur.

**Sonuç:** Bu araştırma, pirelerin kış aylarında da hem kediler hem de köpekler üzerinde izlenmesi ve kontrol edilmesi gerektiğini göstermiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Kedi, köpek, ektoparazitler, pire, kış

**Geliş Tarihi:** 01.04.2018

**Kabul Tarihi:** 31.07.2018

## ABSTRACT

**Objective:** Many pet owners are taking precautions to protect their cats and dogs from ectoparasites only during the spring and summer months. However, some studies have shown that fleas can also be found as parasites on pets during winter. In this research, we investigated the species composition of fleas infesting cats and dogs that were brought to a veterinary clinic in Muratpaşa, Antalya during the 3-months survey period.

**Methods:** In total, 50 domestic animals were examined between December 1, 2017 and February 28, 2018. Species of fleas were identified after being collected from pets.

**Results:** Total 152 fleas, belonging to 2 different species, were recovered from pets. Of the domestic animals, 46% were cats (23) and 54% were dogs (27). Twenty two cats were infested with only *Ctenocephalides felis*. Nineteen dogs were infested with only *Ct. felis*, 5 dogs infested with only *Ct. canis*, and 3 dogs infested with both *Ct. felis* and *Ct. canis*.

**Conclusion:** This research showed that infestation with fleas should be monitored and controlled in both cats and dogs during winter months as well.

**Keywords:** Cat, dog, ectoparasites, flea, winter

**Received:** 01.04.2018

**Accepted:** 31.07.2018

## GİRİŞ

Pireler (Siphonaptera: Pulicidae) erginleri küçük (yaklaşık 2-8 mm), az çok oval yapılı, yanlardan basık, açıktan koyuya kahve renkli, kanatsız böceklerdir. Pirelerin dünya üzerinde 16 familya ve 238 cins içerisinde tanımlanmış 2574 türü bulunmaktadır. Ergin dişi ve erkek bireyleri memeli ve kuşlardan kan emen pirelerin veba, murin tifüs (endemik tifüs), epidemik tifüs ve pire kaynaklı benekli ateş gibi hastalıkların vektö-

rü olduğu bilinmektedir (1, 2). Pireler insan sağlığı açısından önemli olmaları ve büyük ekonomik kayıplara sebep olmaları yanı sıra evcil hayvanlardan kan emmeleri yoluyla da deride kaşıntı, kıl ve tüy dökülmesine neden olur ve aynı zamanda birçok hayvan hastalığının vektörlüğünü de yaparlar (3). Bazı küçük hayvanlardan özellikle yavru kedilerden çok sayıda pirenin kısa bir sürede kan emmesi kan kaybına ve sonucunda ölüme dahi neden olabilmektedir. Dünya genelinde *Ctenocephalides* cinsi pireler kedi ve köpeklerde en yaygın

**Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** Hüseyin Çetin E-mail: hçetin@akdeniz.edu.tr

DOI: 10.5152/tpd.2018.5971

©Telif hakkı 2018 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.turkiyeparazitolog.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2018 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.turkiyeparazitolog.org

olarak görülen ektoparazitlerdendir (4).

İnsan ve hayvan sağlığı açısından büyük önem sahip pirelerle mücadelede farklı yöntemler kullanılmaktadır. Pirelerin evcil hayvanların kılları arasında gizlenmesi ve yumurtlaması gibi davranışları sebebiyle kılların belli aralıklarla tıraş edilmesi pirelere karşı koruma sağlamaktadır. Şampuanlar, banyo solüsyonları, pire tasmaları, pire tozu, pire spreyleri, damlalar ve ağız yoluyla verilen insektisitler yardımıyla pire tespit edilen evcil hayvanları parazitlerinden temizlemek mümkündür. Larvaların ve yumurtaların bulunabileceği halı gibi yüzeylere insektisit uygulamak bir gün ile bir kaç ay arasında pirelerden korunma sağlayabilmektedir (5, 6).

Pireler tüm yıl boyunca yaşama şansı olan ektoparazit canlılardır. Kış aylarında dormant duruma geçerler ve sadece ve merkezi ısıtma, klima, kalorifer gibi sistemlerinin bulunduğu kapalı mekânlarda özellikle kedi ve köpek gibi evcil hayvanlardan kan emerek yaşamaya devam ederler. Oda koşullarının 18-26 °C sıcaklık ve %75-85 nem olduğu iç mekânlara yerleşen bir pire popülasyonunun tüm yıl boyunca aktif kalacağı öngörülmektedir. Bahar ve yaz aylarında ise pire popülasyonlarında ani artışlar gözlenmektedir. Bu artış bazen oldukça yüksek seviyelere ulaşabilir. Konutlar içerisinde evcil hayvanlarda bulunan ergin pireler o ortamdaki pire popülasyonunun yaklaşık %10'luk bir kesimini oluştururken geri kalan yaklaşık %90'lık kesimi olan yumurta, larva, pupa ve bir miktar ergin yaşam alanlarında bulunan halı, döşeme ve yatak gibi ortamlarda bulunabilmektedir (7).

Bu çalışmada, Antalya ili Muratpaşa ilçesinde faaliyet gösteren bir veteriner kliniğine pire şikayeti ile 1 Aralık 2017 ile 28 Şubat 2018 tarihleri arasında 3 ay süreyle getirilen kedi ve köpeklerde pire var olup olmadığı araştırılmış ve tespit edilen pirelerin hangi türlerden oluştuğunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

## YÖNTEMLER

Veteriner kliniğine pire şikâyeti ile getirilen kedi ve köpekler, deriye temas eden yüzeyleri plastik kaplama olan 1 cm<sup>2</sup>'de 30 adet 2 cm uzunluğunda diş bulunduran bir tarak yardımıyla taranmış ve beyaz bir zemin üzerine dökülen pireler pens yardımıyla toplanmıştır. Üzerinde pire tespit edilen her hayvandan 1-33 adet pire örneklenmiştir. Bu numuneler tür teşhisleri yapılmaya kadar %70 alkol içeren tüplere alınmış ve örnekler +4 derecede buzdolabında saklanmıştır. Köpeklerin ve kedilerin sahipli olup olmadıkları kayıt altına alınmıştır. Tür teşhisleri bir stereo mikroskop altında CDC teşhis anahtarları kullanılarak yapılmıştır (8).

## BULGULAR

Bu araştırma boyunca toplam 50 hayvan her biri yaklaşık 15 dakika süren muayene sırasında pirelerin varlığı veya yokluğu açısından görsel olarak incelenmiştir. İncelenen hayvanların % 46'sı (23 adet) kedilerden ve % 54'ü (27 adet) köpeklerden oluşmaktadır

**Tablo 1.** Aylara göre pire tespiti yapılan kedi ve köpek sayıları

	Aralık	Ocak	Şubat	Toplam	Sadece <i>Ct. felis</i>	Sadece <i>Ct. canis</i>	<i>Ct. felis</i> ve <i>Ct. canis</i> birlikte
Kedi	11	6	6	23	22	1	0
Köpek	10	7	10	27	19	5	3
Toplam	21	13	16	50	41	6	3

ve her bir hayvan en az bir pire türü tarafından enfekte bulunmuştur. Aralık ayında 21, Ocak ayında 13 ve Şubat ayında 16 evcil hayvanda pire tespit edilmiştir. Pire kontrolü yapılan hayvanların 46 tanesi sahipli iken, 4 tanesi sahipsiz hayvanlardan oluşmaktadır. Üzerinde pire tespit edilen evcil hayvanlardan 41 tanesi sadece *Ctenocephalides felis*, 6 tanesi *Ct. canis* ile bulaşık iken 3 evcil hayvan (sadece köpek) üzerinde her iki pire türü de tespit edilmiştir (Tablo 1).

Üzerinde pire tespit edilen toplam 23 kedinin 19'u melez, 2'si İnan ve 2'si Scottish ırklarındandır. Üzerinde pire tespit edilen toplam 27 köpeğin 11 farklı köpek ırkından oluştuğu ve en fazla Melez (11 adet) ırkından köpekte pire tespit edildiği görülmüştür (Tablo 2). Kedi ve köpeklerin büyük çoğunluğu 1-5 yaşları arasındadır (Tablo 3).

Toplam 50 evcil hayvandan toplanan 152 pirenin 136'sı (%89,47) *Ct. felis* ve 16'sı (%10,53) *Ct. canis*'tir. Pirelerin 19 adedi erkek, 133 bireyi dişi bireylerden oluşmaktadır. Kedilerden toplanan 95 pire örneğinin 94'ü (%98,94) *Ct. felis*, 1'i (%1,06) *Ct. canis*, köpeklerden toplanan 57 pire örneğinin 15'i (%10,64) *Ct. canis*, 42'si (%89,36) *Ct. felis* olarak belirlenmiştir. Üzerinde pire tespit edilen evcil hayvanlarının büyük çoğunluğunda sadece bir veya birkaç pire bireyi kayıt edilebilmiştir (Tablo 4).

## TARTIŞMA

Pireler tüm yıl boyunca aktif olabilen canlılar olmakla birlikte en yüksek oran, yaz, sonbahar ve ilkbahar aylarında, en düşük oran ise kış aylarında görülmektedir (9). Hatta yapılan bazı araştırmalarda bazı kış aylarında (Şubat ve Mart) pire enfestasyonları tespit edilememiştir (10). Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan bir araştırmada 24 veteriner kliniğine köpeklerini getiren toplam 478 kişiden %73'ü (350 kişi) köpeklerini 12 ay boyunca pire ve kenelere karşı korumalarının gerektiğini düşünüyorken, %17'lik bir grup (49 kişi) 6 ay veya daha az bir sürenin koruma için yeterli olduğunu düşünmektedir (11). Uygun olmayan koşullarda uzun süre pupa (kokon) evresinde kalabilen *Ct. felis* türü pirelerin ortam sıcaklığı 8°C'nin üzerine yükseldiğinde ortaya çıkan yetişkinlerinin yaklaşık yarısı 20 gün boyunca hayatta kalabilirler (12). Yaban hayvanlarının soğuğa karşı korunaklı inlerinde veya yuvalarında pireler uzun süre hayatta kalabilirler (7). Ülkemizde Erzurum ilinde 2009 yılı Ocak ayı içerisinde trafik kazası sonucu ölen üç adet kızıl tilki üzerinde tespit edilen dört pire türünden ikisinin evcil hayvanlar üzerinde sıklıkla görülen *Ct. canis* ve *Ct. felis* türleri olduğu saptanmıştır (13).

Macaristan'da yapılan bir çalışmada kedi ve köpeklerde pire varlığı yönünde yapılan çalışmalara katılan evcil hayvan sahiplerinin yarısından fazlası (%51,4'ü) çalışmanın yapıldığı yıl evcil hayvanları üzerinde pire kontrol ürünü kullanmadıklarını, kentsel alanda yaşayanların kırsal alanlarda yaşayanlara göre yaklaşık 5 kat daha fazla pire kontrol ürünleri kullandıklarını bildirmişlerdir. Az sayıda evcil hayvan sahibi ise konutlarındaki hayvanlara sokak hayvanla-

**Tablo 2.** Üzerinde pire tespit edilen kedi ve köpeklerin ırkları

Köpek	Sayısı
Cani corsa	1
Coccker	1
Dogo	1
French Bulldog	1
Golden	2
King Charles	1
Melez	11
Pug	1
Rott	1
Terrier	5
York Shire	2
Kedi	Sayısı
Melez	19
İran	2
Scottish	2

**Tablo 3.** Üzerinde pire tespit edilen kedi ve köpeklerin yaşları ve sayıları

	Yaş	Sayı
Köpek	<1	5
	1-5	19
	>5	3
Kedi	<1	8
	1-5	12
	>5	3

**Tablo 4.** Hayvanlar üzerindeki tespit edilen pirelerin enfestasyon yoğunluğu

Pire sayısı	Tespit edilen hayvan sayısı
1	25
2	8
3	5
4	5
5	3
6	1
8	1
14	1
33	1

rından pire bulaştığını düşündüklerini belirtmişlerdir (9). Ektoparazit canlılar olan pirelerin sokak hayvanlarında görülme olasılığının hayvanların düzenli kontrolleri ve aşılanmaları yapılmadığı için daha fazla görülme olasılığı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca yüz otuzdan fazla yaban hayvanı türü kedi pirelerini bulundurabilmektedir (14). Yaz veya kış aylarında evlerde bulunan hayvanların

çeşitli amaçlarla (dışkılama, yürüyüş, havalandırma vb.) konutlar dışına çıkarılmaları durumunda bu canlıların ve/veya sahiplerinin sokak hayvanları ile teması, sokak hayvanları üzerinde bulunabilecek pire gibi canlıların özellikle yumurta, larva ve erginlerinin konutlara taşınmasına neden olabilir.

Pire kontrolünde kullanılan ürünlerin başlıcaları topikal damla (spot-on) şeklinde deriye uygulanan, enjeksiyon yoluyla ve oral yolla verilen ürünlerden oluşmaktadır (15). Ayrıca pire koruyucu, tasmalar, şampuanlar ve spreyler de bulunmaktadır. Bunun yanı sıra evcil hayvanların kıllarının tıraş edilmesi fiziksel koruma sağlamaktadır. Hasta Hayvanlar için Halk Dispanserleri (PDSA-People's Dispensary for Sick Animals) istatistikleri, İngiltere'de kış aylarında pire kontrolünde kullanılan ürünlerin satışında yaklaşık %20'lik bir düşüş olduğunu göstermektedir (16). Bu durumun temel nedeni kış aylarında dış ortam koşullarının pireler için uygunsuz hale gelmesinden dolayı popülasyonlarının azalması sonucunda evcil hayvan sahiplerinin kış aylarında pire mücadelesi hususunda daha az duyarlı davranmalarıdır.

Genel olarak kedi ve köpeklerde görülen pire enfestasyonlarının oranı ve dağılımı coğrafik farklılıklar gösterebilmektedir. Örneğin Bond ve ark. (17) tarafından İngiltere'de yapılan bir çalışmada kedilerde, Kumsa ve Mekonnen (18) tarafından Hawassa, güney Etiyopya'da yapılan bir çalışmada ise köpeklerde pire dağılım ve enfestasyon oranlarını yüksek çıkmıştır. Ülkemizde 2000 yılı Mart-Ekim ayları arasında Elazığ ilinin kırsal kesimlerinde bulunan iki koyun çiftliğinde evcil hayvanlar (koyun, tavuk, horoz, kedi ve köpek) ve insanlar üzerindeki pire enfestasyonu yönünden incelenmiştir. Kontrol edilen beş kedi ve üç köpeğin tamamında pire tespit edilmiştir. Köpeklerde tespit edilen 29 pirenin 14'ü *Ct. canis*, 8'i *Ct. felis*; kedilerde tespit edilen 24 pirenin 8'i *Ct. canis*, 8'i *Ct. felis* türleri olarak rapor edilmiştir (19). Bu çalışmada pire tespit ettiğimiz toplam 50 evcil hayvanın %54'ü köpeklerden oluşmaktadır. Daha önce yapılan araştırmalarda köpekler üzerinde genel olarak *Ct. canis*'in dominant tür olduğu belirlenmesine rağmen bu çalışmada köpeklerde tespit edilen pirelerin büyük çoğunluğunun (%89,36) *Ct. felis* olması ilginç bir sonuçtur (20). Aynı konut içerisinde birden fazla evcil hayvan bulunması, sayılarının ve oranlarının farklı olması, köpeklerin sokaklarda daha fazla bulunması gibi nedenler pire türlerinde ki bu oran değişikliklerine etken olabilir.

Doksanlı yıllardan sonra belirgin şekilde görülen küresel iklim değişiklikleri sebebiyle ülkemizde kış ayları sıcaklık ortalamalarının geçmişe göre daha yüksek seyretmesi pirelerin aktif olmalarına katkı sağlamış olabilir. Meteoroloji Genel Müdürlüğü'nün 1929-2016 yılı sıcaklık ortalama değerlerine göre Antalya'da aylık ortalama sıcaklık değerleri Aralık, Ocak ve Şubat ayları için sırasıyla, 11,4 °C, 9,9 °C ve 10,5 °C derece olarak belirlenmiştir. Ancak Aralık 2017-Şubat 2018 tarihleri arasında yapılan ölçümlerde ise gerçekleşen sıcaklık ortalamaları geçmişe göre 1-4 °C arasında artış gösterme eğilimindedir. Bu sebeple özellikle kış aylarında dış ortamdaki sıcaklık ortalamalarının pirelerin gelişimi için uygun olduğu bölgelerde pirelerin aktivitelerinde bir artış söz konusu olabilir. Ayrıca kentsel alanda yaşayan kedi ve köpek dışındaki yabani kemirgenler vb. diğer birçok omurgalı hayvanın üzerinde bulunabilecek pirelerin insanlarla teması artmaktadır (21). Daha yüksek sıcaklık değerleri pirelerin daha kısa sürede gelişti-



mini tamamlamasına, daha fazla beslenme isteğine ve daha hızlı patojen yayılması anlamına gelmektedir. Evcil hayvanların veteriner hekimler tarafından sağlık kontrolleri yıl genelinde yapılmalı ve antiparaziter özelliği kanıtlanmış insektisitlerle korunmaları sağlanmalıdır (22).

## SONUÇ

Elde ettiğimiz sonuçlara göre evcil hayvanların kış aylarında dış doğal ortam koşullarında pire istilasına maruz kalma olasılıkları az olsa da, ısıtılmış/iklimlendirilmiş kapalı ortamlarda barınan hayvanların uygun sıcaklık ve nem sebebiyle kış aylarında pire istilasına maruz kalması muhtemeldir. Daha sıcak geçen kış ayları sebebi ile de evcil hayvan sahiplerinin tüm yıl boyunca ektoparazitlere yönelik koruyucu tedavi önlemleri almaları gerekmektedir.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir – G.C., H.Ç.; Tasarım – G.C., H.Ç.; Denetleme – G.C., H.Ç.; Kaynaklar – G.C., H.Ç.; Malzemeler – G.C., H.Ç.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – G.C., H.Ç.; Analiz ve/veya Yorum – G.C., H.Ç.; Literatür Taraması – G.C., H.Ç.; Yazıyı Yazan – G.C., H.Ç.; Eleştirel İnceleme – G.C., H.Ç.

**Teşekkür:** Bu çalışmada kedi ve köpeklerden pirelerin toplanması ve saklanması için yardımlarından dolayı Veteriner Hekim Hüseyin Akyüz, Ayçin Akkaya ve Gizem Cebeci'ye teşekkür ederiz.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Concept – G.C., H.Ç.; Design – G.C., H.Ç.; Supervision – G.C., H.Ç.; Resources – G.C., H.Ç.; Materials – G.C., H.Ç.; Data Collection and/or Processing – G.C., H.Ç.; Analysis and/or Interpretation – G.C., H.Ç.; Literature Search – G.C., H.Ç.; Writing Manuscript – G.C., H.Ç.; Critical Review – G.C., H.Ç.

**Acknowledgment:** We would like to thank Veterinarian Hüseyin Akyüz, Ayçin Akkaya and Gizem Cebeci for their assistance in collecting and storing fleas on cats and dogs.

**Conflict of Interest:** Authors have no conflicts of interest to declare.

**Financial Disclosure:** The authors declared that this study has received no financial support.

## KAYNAKLAR

1. Bitam I, Dittmar K, Parola P, Whiting MF, Raoult D. Fleas and flea-borne diseases, *Int J Infect Dis* 2010; 14: 667-76. [CrossRef]
2. Gülanber A, Siphonaptera (Pireler) (Insecta: Siphonapterida) Vektörükleri ve Mücadelesi, İçinde Vektör Artropodlar ve Mücadelesi, Editör; Yusuf Özbel, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:25 2017; 327-60.
3. Service MW. *Medical Entomology for Students*. Fifth Edition, 2012. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press. ISBN: 978-1-107-66818-8. [CrossRef]
4. Salant H, Mumcuoglu KY, Baneth G. Ectoparasites in urban stray cats in Jerusalem, Israel: differences in infestation patterns of fleas, ticks and permanent ectoparasites. *Med Vet Entomol* 2014; 28: 314-8. [CrossRef]
5. Hinkle NC, Koehler PG, Patterson RS. Residual effectiveness of insect growth regulators applied to carpet for control of cat flea (*Siphonaptera: Pulicidae*) larvae. *J Econ Entomol* 1995; 88: 903-6. [CrossRef]
6. Jacobs DE, Hutchinson MJ, Krieger KJ. Duration of activity of imidacloprid, a novel adulticide for flea control, against *Ctenocephalides felis* on cats. *Vet Rec* 1997; 140: 259-60. [CrossRef]
7. Rust MK, Dryden MW. The Biology, ecology, and management of the cat flea. *Annu Rev Entomol* 1997; 42: 451-73. [CrossRef]
8. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Pictorial Keys to Anthropods, Reptiles, Birds, And Mammals of Public Health Significance. U. S. Public Health Service, Atlanta, Georgia.
9. Farkas R, Gyurkovszky M, Solymosi N, Beugnet F. Prevalence of flea infestation in dogs and cats in Hungary combined with a survey of owner awareness. *Med Vet Entomol* 2009; 23: 187-94. [CrossRef]
10. Tavassoli M, Ahmadi A, Imani A, Ahmadiara E, Javadi S, Hadian M. Survey of Flea Infestation in Dogs in Different Geographical Regions of Iran. *Korean J Parasitol* 2010; 48: 145-9. [CrossRef]
11. Lavan RP, Tunceli K, Zhang D, Normile D, Armstrong R. Assessment of dog owner adherence to veterinarians' flea and tick prevention recommendations in the United States using a cross-sectional survey. *Parasit Vectors* 2017; 10: 284. [CrossRef]
12. Silverman J, Rust MK. Some Abiotic Factors Affecting the Survival of the Cat Flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *Environ Entomol* 1983; 12: 490-5. [CrossRef]
13. Aydın MF, Balkaya İ, Aktaş M, Dumanlı N. Erzurum İlinde Üç Kırmızı Tilkide (*Vulpes vulpes*) Kene (Ixodoidea) ve Pire (Siphonaptera) Türleri. *Türkiye Parazit Derg* 2011; 35: 110-3. [CrossRef]
14. Nicholas J, Clark NJ, Seddon JM, Şlapeta J, Wells K. Parasite spread at the domestic animal - wildlife interface: anthropogenic habitat use, phylogeny and body mass drive risk of cat and dog flea (*Ctenocephalides spp.*) infestation in wild mammals. *Parasit Vectors* 2018; 11: 8. [CrossRef]
15. Tuzer E, Muz MN, Bilgin Z, Erçin S, Tınar R. Fipronil Damlatma Çözeltisinin Kedi ve Köpeklerde Pirelere ve Köpeklerde Kenelere Etkisi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2010; 16 (3): 469-72.
16. PDSA-People's Dispensary for Sick Animals Animal Wellbeing (Paw) Report 2017. [https://www.pdsa.org.uk/media/3291/pdsa-paw-report-2017\\_printable-1.pdf](https://www.pdsa.org.uk/media/3291/pdsa-paw-report-2017_printable-1.pdf)
17. Bond R, Riddle A, Mottram L, Beugnet F, Stevenson R. Survey of flea infestation in dogs and cats in the United Kingdom during 2005. *Vet Rec* 2007; 160: 503-6. [CrossRef]
18. Kumsa, BE, Mekonnen S. Ixodid ticks, fleas and lice infesting dogs and cats in Hawassa, southern Ethiopia. *Onderstepoort J Vet Res* 2011; 78: 326. [CrossRef]
19. Aksın N, Erdoğan Z, Aksı NE. İki Koyun Çiftliğinde Yaşayan İnsan ve Hayvanlarda Bulunan Pire Türleri ve Bunların Kontrolleri. *Türkiye Parazit Derg* 2004; 28: 146-9.
20. Ahn KS, Huh SE, Seol SW, Kim HJ, Suh KH, Shin SS. *Ctenocephalides canis* is the dominant flea species of dogs in the Republic of Korea. *Parasit Vectors* 2018; 11: 196. [CrossRef]
21. Açıcı M, Demirtaş S, Umur Ş, Gürler AT, Bölükbaş CS. Infestations of flea species on small, wild mammals in the provinces of Aydın and Manisa in the Aegean Region, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 2017; 41: 449-52. [CrossRef]
22. Tuzer E, Muz MN, Bilgin Z, Erçin S, Tınar R. Fipronil Damlatma Çözeltisinin Kedi ve Köpeklerde Pirelere ve Köpeklerde Kenelere Etkisi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2010; 16: 469-72.

# Assessment of Entomological Remains from Soil Samples Collected from a Pig (*Sus scrofa domestica*) Carcass Decomposition Site after 13 Years

On Üç Yıl Sonra Domuz Leşinin (*Sus scrofa domestica*) Dekompozisyon Bölgesinden Toplanan Toprak Örneklerindeki Entomolojik Kalıntıların Değerlendirilmesi

Halide Nihal Açıkgöz<sup>1</sup> , Eser Ethem Ilgıt<sup>1</sup> , Meriem Taleb<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Ankara University Institute of Forensic Sciences, Ankara, Turkey

<sup>2</sup>University of Blida, Laboratory of Biotechnologies, Environment and Health, Faculty of Nature and Life Sciences, Blida, Algeria

**Cite this article as:** Açıkgöz HN, Ilgıt EE, Taleb M. Assessment of Entomological Remains From Soil Samples Collected From a Pig (*Sus scrofa domestica*) Carcass Decomposition Site After 13 Years. *Turkiye Parazit Derg* 2018; 42(4): 281-5.

## ABSTRACT

**Objective:** Carrion insects inhabiting the soil play an important role in forensic investigations because they may help to solve both active and cold cases. The aim of this study was to examine the entomofauna of forensic importance in soil samples removed after 13 years from a pig carrion decomposition site.

**Methods:** Soil samples were collected from an old carrion decomposition study site in Bâla, the Ankara Province. Four holes, approximately 40 cm deep and 35 cm width were excavated at the study site. The samples were collected and placed in ventilated cups. Each cup was labeled mentioning the excavation location, time, date, and name of the collector. Insects and their remains found in the soil were collected by sweeping the soil from the specimens using a brush. The insects were morphologically identified.

**Results:** A total of 635 specimens of Calliphoridae, Dermestidae, Cleridae, Staphylinidae, Histeridae, and Formicidae were identified. Flies such as *Chrysomya albiceps* (Wiedmann, 1819), and beetles such as *Dermestes frischii* (Kugelan, 1792), *Necrobia rufipes* (De Geer, 1775), and *Creophilus maxillosus* (Linnaeus, 1758), were identified as the species.

**Conclusion:** Our results show that soil samples still harbor entomological specimens after 13 years. This study, to the best of our knowledge, was the first of its kind in Turkey. Forensically, important insects and their remains may be identified in the soil long time after the corpse is buried. Consequently, cold cases may be solved using insects.

**Keywords:** Carcass, decomposition, entomofauna, forensic entomology, soil

**Received:** 06.03.2018

**Accepted:** 24.04.2018

**Available Online Date:** 24.09.2018

## ÖZ

**Amaç:** Toprakta yaşayan böcekler, aktif ve eski olguların çözülmesine yardımcı olabileceğinden, adli araştırmalarda önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmanın amacı, domuzun ölümünden 13 yıl sonra toprak örneklerinden çıkartılan adli önemi olan entomofaunayı incelemektir.

**Yöntemler:** Ankara ili Bâla ilçesinde on üç yıl önce ölen bir domuz leşi dekompozisyon çalışması alanında toprak örnekleri toplandı. Çalışma alanında yaklaşık 40 cm derinliğinde 35 cm genişliğinde 4 geniş delik kazıldı. Numuneler toplandı ve havalandırılmalı bardaklara yerleştirildi. Her bardağın üzerine yer, saat, tarih ve toplananın adı yazıldı. Topraktaki böcekler ve kalıntıları mikroskop altında toprağın bir fırça yardımıyla süpürülmesi ile toplandı ve morfolojik olarak tür tayini yapıldı.

**Bulgular:** Calliphoridae, Dermestidae, Cleridae, Staphylinidae, Histeridae ve Formicidae familyasına ait toplam 635 örnek tespit edildi. Sineklerden *Chrysomya albiceps* (Wiedmann, 1819), ve kınkanatlılardan ise *Dermestes frischii* (Kugelan, 1792), *Necrobia rufipes* (De Geer, 1775) ile *Creophilus maxillosus* (Linnaeus, 1758) türleri teşhis edildi.

**Sonuç:** Bu bulgular, on üç yıl sonra hala toprak numunelerinin entomolojik örnekleri barındırdığını göstermiştir. Sunulan çalışma Türkiyede ilk kez yapılmıştır. Sonuç olarak, adli önemi olan böceklerin ve kalıntılarının, ölüm yerinin toprağından uzun süre sonra bile tespit edilebileceğini ve aynı zamanda çözülmemiş eski adli vakaların da böceklerden yararlanılarak çözülebileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Ceset, dekompozisyon, entomofauna, adli entomoloji, toprak

**Geliş Tarihi:** 06.03.2018

**Kabul Tarihi:** 24.04.2018

**Çevrimiçi Yayın Tarihi:** 24.09.2018

5<sup>th</sup> EUROSIL International Congress, Istanbul, TURKEY. 16.10.2016-21.10.2016.

5. Uluslararası katılımlı avrupa toprak kongresi, İstanbul, TÜRKİYE 16.10.2016-21.10.2016.

**Address for Correspondence / Yazışma Adresi:** Halide Nihal Açıkgöz E.posta: nacikgoz@yahoo.com

DOI: 10.5152/tpd.2018.5917

©Copyright 2018 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.turkiyeparazitderg.org

©Telif hakkı 2018 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.turkiyeparazitderg.org web sayfasından ulaşılabilir.

## INTRODUCTION

Forensic entomology is the study of the arthropod development and colonization of corpses in the succession pattern to solve legal cases (1-3). It is commonly used to estimate the time between death and the corpse discovery. This period is called the postmortem interval (PMI) (4). When this interval is greater than 72 hours, forensic entomology methods can be more accurate in estimating the PMI than traditional medical techniques, and sometimes they are the only available techniques (4-6). After death, the odor emitted by the carcass attracts different insect species. Flies (Diptera) and beetles (Coleoptera) are the first to reach the carcass and are the most common species. Among dipteran species, blowflies (Diptera: Calliphoridae) are the initial colonizers of dead bodies (6-9). Arthropods associated with a carcass are generally classified into four ecological categories: necrophages, parasites and predators of the necrophages, omnivores, and adventive species (7). Arnaldos et al. (10) reported that the Formicidae species use the body as a shelter to obtain humidity and food and that they may be considered omnivorous. The Formicidae species belong mainly to the local fauna and may be present even before the body placement. Thus, these species are of lesser forensic importance than the necrophagous ones.

Body decomposition in a terrestrial environment alters the substrate beneath (11). This initiates a series of changes in vegetation and fauna, beginning a succession of arthropods affected by the carcass decomposition. Fluids that are a product of decomposition and associated carcass fauna are reported to change the soil to a depth of 14 cm, affecting mostly the upper layers. The soil that is directly beneath and surrounding the body represents a decompositional zone occupied by the carcass dwellers distinct from a surrounding area of approximately 10 cm. This provides an intermediate zone inhabited by both the carrion and regular soil-dwelling invertebrates (12).

Insects found on buried bodies in the soil for a short or long period are of a great forensic interest. Some arthropod species associated with decomposing bodies are not found on the re-

mains, but are distributed around, or even inhabiting the soil under the body. It is thus possible to prove whether the dead body was moved or not after death and to determine the primary and secondary crime scenes. Therefore, it is crucial to collect soil samples during criminal investigations (12).

In this context, the aim of this study was to examine the entomofauna of forensic importance in soil samples 13 years after death.

## METHODS

### The Study Area

A field trial with a decomposing carcass of a pig (*Sus scrofa domestica*) was conducted in Çavuşlu, Bâla, Ankara (39°40'59.0"N 33°00'13.1"E) during the years from 2003 to 2005. In January 2016, four holes, approximately 40 cm deep were excavated at the study site. The buried pig skeleton was found. The soil samples were collected and placed in polystyrene disposable cups. Each cup was labeled mentioning the excavation location, time, and date.

The collected samples were transferred to the Forensic Sciences Institute of Ankara University and examined under a Leica S8 APO stereo zoom microscope.

### Laboratory Study

The soil was dried on a sheet of paper in the laboratory. Insects and their remains found in the soil were collected by sweeping the soil from the specimens using a brush. They were then photographed (Canon PowerShot S60) (Figures 1-6) and morphologically identified using standard taxonomic keys (13, 14).

## RESULTS

In this study, we describe the entomofauna of forensic interest found in the soil samples recovered from an old decomposition study's location. A total number of 635 specimens of Calliphoridae, Dermestidae, Cleridae, Staphylinidae, Histeridae, and Formicidae were found. The identification results of insect species and their numbers are presented in Table 1. We noticed that the soil samples were still harboring entomological spec-



**Figure 1.** Diptera Pupae. A: *Chrysomya albiceps* pupa; B: Fannidae sp. pupa.



**Figure 2.** *Dermestes frischii* adult. A: ventral view; B: dorsal view.



Figure 3. *Dermestes* sp. larva.



Figure 5. *Creophilus maxillosus* adult.



Figure 4. *Necrobia rufipes* adult. A: dorsal view B: ventral view.

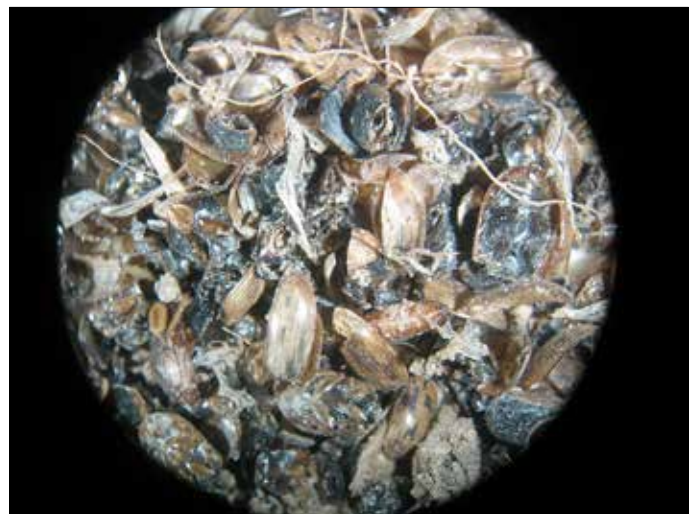


Figure 6. *Coleoptera elytra*.

imens after 13 years. Overall, 28.2% of the specimens were identified at the species level, and they included *Chrysomya albiceps* (Wiedmann, 1819), *Dermestes frischii* (Kugelan, 1792), *Necrobia rufipes* (De Geer, 1775), and *Creophilus maxillosus* (Linnaeus, 1758).

#### DISCUSSION

*Necrobia rufipes* is a slow-developing species depending on temperature. It is known to be the predator of other insects and cannibal in the presence of other species in large numbers. This predatory behavior also occurs in the third larval instar of the *Chrysomya albiceps* species (9, 15, 16). *Creophilus maxillosus* is a scavenger and can be found on carcasses, and it is also the predator of carrion maggots (17-19). This predatory behavior is observed when the large numbers of Diptera larvae are present in the soil. *Dermestes frischii* is a species widely distributed all over the world. It is usually found in dry fish and legumes. Lefebvre and Gaudry (20) report that the dermestids arrive to animal carcasses in the third wave, during the advanced decay stage.

Carter and Tibbett (21) state that the soil is a passive environment, influenced by the surroundings. Animal carcasses and plant cover mixed into the soil cause chemical and microbiological disturbances in the soil structure. The return of the original soil structure takes a long time (21). These findings support our results as the soil preserved the specimens for years. It might not have been possible to recover the samples in case of the lack of information about the body's site. At a depth of 40 cm, some of the specimens were found buried in the soil due to rainfall and soil accumulation. Merritt et al. (22) discovered many arthropods in a grave opened 28 years after death. Some of them were reported to be Collembola (springtails), Acarina (mites) from the Glycyphagidae family, and Diptera pupae of the Phoridae family. Anderson and van Laerhoven (23) likewise stated that even 271 days after death, the vegetation and soil fauna had not returned to normal. Our results are in agreement with these findings. Based on these observations, it may be proved that a body was removed from its original location when necrophagous insects or their remains are not found in the soil samples.



**Table 1.** Insect species and their remains identified from the soil samples.

Order	Family	Species	Stage/insect part	Absolute abundance	Ecological category
Diptera	Calliphoridae	<i>Chrysomya albiceps</i> (Wiedmann, 1819)	Larvae	4	Necrophagous
			Pupae	144	
Diptera remains			Heads	130	
			Wings		
			Legs		
			Larvae		
			Pupae		
			Pupariums		
Coleoptera	Dermestidae	<i>Dermestes frischii</i> (Kugelan, 1792)	Adult	15	Saprophagous
			Larvae	11	
	Cleridae	<i>Necrobia rufipes</i> (De Geer, 1775)	Adults	5	Saprophagous
			Adults	11	
	Histeridae	<i>Saprinus</i> sp.	Adults		Predator
Coleoptera remains			Adults parts	305	
			Larvae		
			Larval exuviae		
			Elytra		
			Wings		
			Legs		
			Hymenoptera		
Total				630	

## CONCLUSION

It is mandatory to collect soil to solve active and cold forensic cases. Insects of forensic interest and their remains can be identified from the soil long time after death. This practice may contribute greatly when determining whether a dumped body was shredded by scavenger vertebrates or removed from its original place.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Concept – H.N.A.; Design – H.N.A., M.T.; Supervision – H.N.A.; Resources – H.N.A., M.T.; Materials – H.N.A.; Data Collection and/or Processing – H.N.A.; Analysis and/or Interpretation – H.N.A., M.T.; Literature Search – H.N.A., M.T.; Writing Manuscript – H.N.A., M.T., E.E.I.; Critical Review – H.N.A., M.T.

**Conflict of Interest:** Authors have no conflicts of interest to declare.

**Financial Disclosure:** The authors declared that this study has received no financial support.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir – H.N.A.; Tasarım – H.N.A., M.T.; Denetleme – H.N.A.; Kaynaklar – H.N.A., M.T.; Malzemeler – H.N.A.; Veri Toplanması

ve/veya İşlemesi – H.N.A.; Analiz ve/veya Yorum – H.N.A., M.T.; Literatür Taraması – H.N.A., M.T.; Yazıyı Yazan – H.N.A., M.T., E.E.I.; Eleştirel İnceleme – H.N.A., M.T.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

## REFERENCES

- Catts E, Haskell N. Analyzing entomological data. In: Catts E, Haskell N, editors. Entomology and Death - A Procedural Guide. Clemson, South Carolina: Joyce's Print Shop; 1990. p. 125.
- Wells JD, Lamotte L. The Role of a PMI-Prediction Model in Evaluating Forensic Entomology Experimental Design, the Importance of Covariates, and the Utility of Response Variables for Estimating Time Since Death. *Insects* 2017; 8: 47. [\[CrossRef\]](#)
- Verma K, Rejcek P. Assessment of post mortem interval, (PMI) from forensic entomotoxicological studies of larvae and flies. *Entomol Ornithol Herpetol* 2013; 1: 1-4.
- Joseph I, Mathew DG, Sathyan P, Vargheese G. The use of insects in forensic investigations: An overview on the scope of forensic entomology. *J Forensic Dent Sci* 2011; 3: 89-91. [\[CrossRef\]](#)
- Sharma R, Kumar Garg R, Gaur JR. Various methods for the estimation of the post mortem interval from Calliphoridae: A review. *Egypt J Forensic Sci* 2015; 5: 1-12. [\[CrossRef\]](#)



6. Amendt J, Richards C, Campobasso C, Zehner R, Hall M. Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Sci Med Pathol* 2011; 7: 379-92. [\[CrossRef\]](#)
7. Gennard D. *Forensic Entomology: An Introduction*. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd.; 2012.
8. Brooks JW. Postmortem changes in animal carcasses and estimation of the postmortem interval. *Vet Pathol* 2016; 53: 929-40. [\[CrossRef\]](#)
9. Klekovska D, Slavevska-Stamenković V, Smiljkov S, Hinić J, Rebok K, Janeska B. Forensic use of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819): the first cases indicating postmortem interval for human corpses in Republic of Macedonia. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 2017; 5: 320-3.
10. Arnaldos MI, García MD, Romera E, Presa JJ, Luna A. Estimation of postmortem interval in real cases based on experimentally obtained entomological evidence. *Forensic Sci Int* 2005; 149: 57-65. [\[CrossRef\]](#)
11. Tibbett M, Carter D. *Soil analysis in Forensic Taphonomy chemical and biological effects of buried human remains*: CRC Press; 2008. [\[CrossRef\]](#)
12. Pastula E, Merritt R. Insect arrival pattern and succession on buried carrion in Michigan. *J Med Entomol* 2013; 50: 432-9. [\[CrossRef\]](#)
13. Smith K. *A manual of forensic entomology*. Oxford: University Printing House; 1986. 1-102 p.
14. Auber L. *Atlas des coléoptères de France, Belgique, Suisse. Tome 1, Généralités, carabes, staphylins, dytiques, scarabées*. Paris: N. Boubée; 1999.
15. Gredilha R, Lima A. First record of *Necrobia rufipes* (De Geer, 1775) (Coleoptera; Cleridae) associated with pet food in Brazil. *Braz J Biol* 2007; 67: 187. [\[CrossRef\]](#)
16. Faria LDB, Godoy WAC. Prey choice by facultative predator larvae of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96: 875-8. [\[CrossRef\]](#)
17. Wang Y, Yang JB, Wang JF, Li LL, Wang M, Yang LJ, et al. Development of the forensically important beetle *Creophilus maxillosus* (Coleoptera: Staphylinidae) at constant temperatures. *J Med Entomol* 2017; 54: 281-9.
18. Frątczak K, Matuszewski S. Instar determination in forensically useful beetles *Necrodes littoralis* (Silphidae) and *Creophilus maxillosus* (Staphylinidae). *Forensic Sci Int* 2014; 241(Suppl C): 20-6. [\[CrossRef\]](#)
19. Greene G. Rearing techniques for *Creophilus maxillosus* (Coleoptera: Staphylinidae), a predator of fly larvae in cattle feedlots. *J Econ Entomol* 1996; 89: 848-51. [\[CrossRef\]](#)
20. Lefebvre F, Gaudry E. Forensic entomology: a new hypothesis for the chronological succession pattern of necrophagous insect on human corpses. *Annales de la Société entomologique de France (NS)* 2009; 45: 377-92. [\[CrossRef\]](#)
21. Carter D, Tibbett M. *Cadaver decomposition and soil: Processes*. Tibbett M, Carter D, editors. Boca Raton, USA: CRC Press; 2008. [\[CrossRef\]](#)
22. Merritt R, Snider R, De Jong J, Benbow M, Kimbirauskas R, Kolar R. Collembola of the grave: A cold case history involving arthropods 28 years after death. *J Forensic Sci* 2007; 52: 1359-61. [\[CrossRef\]](#)
23. Anderson G, van Laerhoven S. Initial studies on insect succession on carrion in Southwestern British Columbia. *J Forensic Sci* 1996; 41: 617-25. [\[CrossRef\]](#)

# Molecular Identification and Clinicopathological Findings of *Hepatozoon* sp. Infection in a Cat: First Report from Turkey

Bir Kedide *Hepatozoon* sp. Enfeksiyonunun Moleküler İdentifikasyonu ve Klinikopatolojisi: Türkiye'den İlk Rapor

Gülten Emek Tuna<sup>1</sup> , Serkan Bakırcı<sup>2</sup> , Ceren Dinler<sup>1</sup> , Gizem Battal<sup>3</sup> , Bülent Uluş<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Department of Internal Diseases, Adnan Menderes University School of Veterinary Medicine, Aydın, Turkey

<sup>2</sup>Department of Parasitology, Adnan Menderes University School of Veterinary Medicine, Aydın, Turkey

<sup>3</sup>Therapy Pet Hospital, İzmir, Turkey

**Cite this article as:** Tuna GE, Bakırcı S, Dinler C, Battal G, Uluş B. Molecular Identification and Clinicopathological Findings of *Hepatozoon* sp. Infection in a Cat: First Report from Turkey. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2018; 42(4): 286-9.

## ABSTRACT

*Hepatozoon* is a genus of protozoa belonging to the phylum Apicomplexa. Ticks are the vectors for the members of this genus. The protozoans infect a wide variety of mammals, birds, reptiles, and amphibians. The domestic and wild felids are also susceptible to *Hepatozoon* infection. A five-year-old female cat was presented to the Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine Animal Hospital, with a 1-month history of inappetence and weight loss. In a physical examination, weakness, depression, anorexia, lymphadenopathy, icteric mucous membranes, abdominal distension, and fever were detected. Laboratory analysis revealed anemia, neutrophilic leukocytosis, and increased serum total bilirubin and indirect bilirubin concentrations. Hepatozoonosis was diagnosed by the observation of *Hepatozoon* spp. gamonts within neutrophils in Giemsa-stained blood smears and confirmed by polymerase chain reaction (PCR). This is the first report about the molecular identification of hepatozoonosis in a cat from Turkey.

**Keywords:** Cat, *Hepatozoon* sp., PCR, Turkey

**Received:** 02.06.2018

**Accepted:** 08.08.2018

## ÖZ

*Hepatozoon* türleri, keneler tarafından bulaştırılan ve çok sayıda memeli, kuş, sürüngen ve amfibiyenleri enfekte eden Apicomplexa filumuna ait protozoalardır. Evcil ve vahşi kedigiller de *Hepatozoon* türlerine duyarlıdır. Beş yaşında dişi bir kedi, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi'ne bir aydır devam eden iştahsızlık ve kilo kaybı şikayeti ile getirildi. Fiziksel muayenede güçsüzlük, depresyon, zayıflama, lenfadenopati, ikerik müköz membranlar, abdominal distansiyon ve ateş tespit edildi. Laboratuvar analizleri anemi, nötrofilik lökositoz, artmış serum total bilirubin ve indirekt bilirubin konsantrasyonlarını ortaya koydu. Hepatozoonosis tanısı, Giemsa boyalı periferik kan yaymalarındaki nötrofiller içerisindeki *Hepatozoon* gametositlerinin görülmesiyle konuldu ve PCR ile teyit edildi. Bu olgu, Türkiye'de bir kedide hepatozoonosis'in moleküler tespitinin ortaya konulduğu ilk rapordur.

**Anahtar Kelimeler:** Kedi, *Hepatozoon* sp., PCR, Türkiye

**Geliş Tarihi:** 02.06.2018

**Kabul Tarihi:** 08.08.2018

## INTRODUCTION

*Hepatozoon* species are parasites from the phylum of Apicomplexa with a definitive host (a blood-sucking invertebrate) and an intermediate host (a vertebrate) (1-3). There are more than 340 species of *Hepatozoon* and about 46 of them infect mammals (2, 3). Despite a few differences in the ecology and biology of these protozoa, the primary route of *Hepatozoon* species transmission to the vertebrate hosts is represented by the ingestion of the invertebrate host carry-

ing mature oocysts (1, 4). Although the main vector of *Hepatozoon* spp. is the ixodid ticks, other blood-sucking invertebrates, fleas, and mosquitoes have the potential to transmit the infection. However, the vectors of feline hepatozoonosis are not exactly known (1).

Feline hepatozoonosis has been described from various countries, including Brazil, France, India, Israel, Nigeria, Portugal, Thailand, South Africa, Spain, USA, and Italy (3, 4). Three *Hepatozoon* species have been reported in felines:

**A part of the study was presented at the International Turkish Veterinary Internal Medicine Congress.**

**Bu çalışmanın bir kısmı Uluslararası Türk Veteriner Dahiliye Kongresi'nde sunulmuştur.**

**Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Gülten Emek Tuna E.mail: emektuna@adu.edu.tr

DOI: 10.5152/tpd.2018.5886

©Copyright 2018 Turkish Society for Parasitology - Available online at [www.turkiyeparazitolog.org](http://www.turkiyeparazitolog.org)

©Telif hakkı 2018 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine [www.turkiyeparazitolog.org](http://www.turkiyeparazitolog.org) web sayfasından ulaşılabilir.

*Hepatozoon felis*, *H. canis*, and *H. silvestris* (2, 4, 5). A small number of epidemiological surveys have also been published (4, 6-8). Depending on the cat lifestyle, geographical area, diagnostic method used, and type of samples tested, the prevalence of infection was found to range from 0.6% to 36.8% using different methods across various regions (2-5).

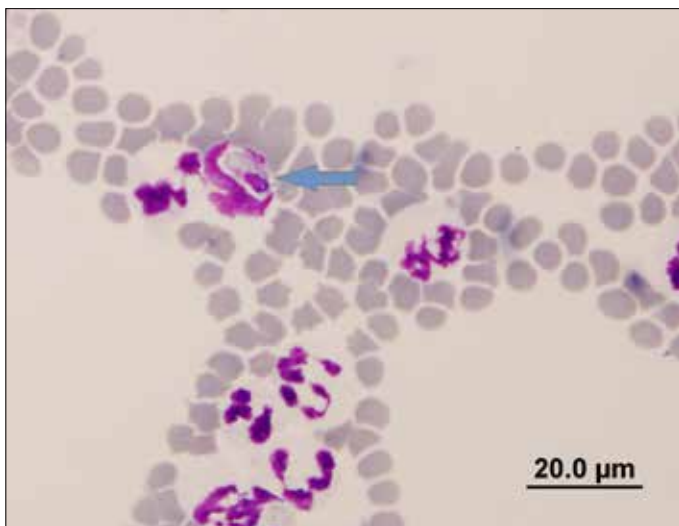
Two forms of the parasite have been found in the cat: intracellular gamonts in neutrophils and monocytes and meronts in several tissues (3). Hepatozoonosis is usually diagnosed by detecting the gamonts in blood smears and by identifying meronts in biopsy specimens (3). However, the parasitemia degree is low in cats (less than 1%) (9). Hence, it is often overlooked in blood smears. In recent years, with the development of molecular tech-

niques, PCR has been started to be used for the diagnosis of *Hepatozoon* spp. in cats. Molecular methods are more sensitive and specific than the blood smear method for the detection of *Hepatozoon* spp. (1, 3).

In Turkey, although hepatozoonosis is widespread in dogs (10-13), feline hepatozoonosis has not yet been documented. This case is the first report of molecular identification of *Hepatozoon* spp. infection in a domestic cat from Turkey.

### CASE REPORT

A five-year-old female cat was presented to the Veterinary Teaching Hospital, Adnan Menderes University, with a 1-month history of inappetence and weight loss. The cat was living indoors with access to the outdoors. Vaccination and antiparasitic treatment program of the cat were irregular. The cat was fed with commercial food and did not have any serious health problems until 3 weeks ago. Three weeks before the presentation, the cat was



**Figure 1.** *Hepatozoon* spp. gamont in neutrophils from Giemsa stained peripheral blood smear. Scale bar=20 μm



**Figure 2.** PCR amplification of a partial sequence of the *Hepatozoon* spp. from the cat  
1: Marker, 2: Sample, 3 and 4: positive control

**Table 1.** Hemato-biochemical findings of the cat naturally infected with *Hepatozoon* spp.

Parameters	Values
WBC ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	59.10
Lymphocytes ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	0.50
Monocytes ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	2.83
Neutrophils ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	54.38
Lymphocytes (%)	0.8
Monocytes (%)	4.4
Neutrophils (%)	92.0
RBC ( $\times 10^6$ cells/ $\mu$ L)	3.84
Hemoglobin (g/dL)	6.4
Hematocrit (%)	18.19
MCV (fL)	47
MCH (p/g)	16.5
MCHC (g/dL)	34.9
Platelets ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	771
Glucose (mg/dL)	75
AST (U/L)	13
ALT (U/L)	21
ALP (U/L)	170
GGT (U/L)	9
Total protein (g/dL)	6
Albumin	2.4
Direct Bilirubin (mg/dL)	1.9
Total Bilirubin (mg/dL)	4.76
Urea (mg/dL)	42
Creatinine (mg/dL)	0.75

WBC: white blood cells; RBC: red blood cell; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; GGT: gamma-glutamyltransferase

treated for a hepatic/post hepatic icterus in a private clinic, but no improvement was observed. In a physical examination of the cat presented to our hospital, weakness, depression, anorexia, fever (40.5°C), lymphadenopathy, tachycardia, icteric mucous membranes, and abdominal distension were observed.

Three blood samples were collected from the cephalic vein for hematological, biochemical, and molecular examinations and for the detection of feline leukemia virus (FeLV) antigen and antibodies to feline immunodeficiency virus (FIV). The hematological abnormalities were moderate anemia and neutrophilic leukocytosis (Table 1). The serum biochemical abnormalities included elevated direct and total bilirubin concentrations (Table 1). The FIV antigen test by using rapid diagnostic commercial test kit (Fassisi® FeLFIV, Germany) was positive. To assess the cause of the abdominal distension, abdominal radiography and ultrasonography were performed. The radiography revealed increased soft tissue density in the proximal abdomen and numerous dilated bowel loops filled with gas and feces. The ultrasonography of the cranial abdomen showed marked hepatomegaly and a normal gallbladder structure. Caudal abdominal ultrasonography was unremarkable. Giemsa-stained blood smears were prepared and examined under the light microscope. The blood smears revealed *Hepatozoon* spp. gamonts within the neutrophils (Figure 1). The gamonts measured  $9.72 \pm 0.80 \mu\text{m}$  in length and  $4.17 \pm 0.09 \mu\text{m}$  in width. The slides were also used to examine leukocyte differentiation, erythrocyte morphology, and other infectious agents.

Written informed consent was obtained from cat's owner who participant in this case. PCR was performed to confirm *Hepatozoon* sp. infection (Figure 2). The DNA was extracted from each of two ethylenediaminetetraacetic acid-containing blood samples using the Promega Wizard genomic DNA extraction kit (Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions. Two microliters of extracted DNA were used for PCR amplification. Primers HepF (5'-ATA-CAT-GAG-CAA-AAT-CTC-AAC-3') and HepR (5'-CTT-ATT-ATT-CCA-TGC-TGC-AG-3'; Thermo Electron GmbH, Germany), which amplify a 666 bp fragment of the 18S rRNA gene of *Hepatozoon* spp., were used according to Inokuma et al., (14). The PCR product was electrophoresed on a 1.5% agarose gel and visualized under ultraviolet light.

Following the diagnosis, intravenous fluid therapy, doxycycline (5 mg/kg/once a day), lactulose (5 mL/cat, PO, twice a day), ursodeoxycholic acid (10 mg/kg once a day), B complex vitamins (1.0 mL/cat, once a day), and vitamin C (200 mg/cat, once a day) were prescribed. Prescribed drugs were not administered by the cat owner because the cat had escaped and she died. A postmortem pathological examination could not be performed.

## DISCUSSION

Tick-borne diseases are caused by a vast number of agents, including viruses, bacteria, and parasites. Although these diseases are more common in dogs, they are rarely reported in cats because cats are more resistant to tick-borne diseases. This situation is related to the specific behavior of cats and the mechanical removal of ticks from their body surface during grooming. Also, cats are likely to have innate resistance or adaptation to infec-

tion, restriction of the disease progression, or the transmission of the infectious agents (15, 16).

*Hepatozoon* infection in a domestic dog was first described by the Nevzat (17) in Turkey. The first clinical case of *H. canis* infection in a dog was reported by Voyvoda et al. (18). Several epidemiological surveys have revealed a high prevalence of *H. canis* in dogs in Turkey (10-13). The studies indicated that the prevalence of *H. canis* infection in dogs varies as 22.3-54.3%. Although canine hepatozoonosis caused by *H. canis* occurs commonly, *Hepatozoon* spp. in cats have not been reported in Turkey. We report the first case of *Hepatozoon* sp. infection in a cat in Turkey in this case.

Feline hepatozoonosis is usually associated with outdoor access where contact with ticks is more frequent compared to strictly indoor cats (2, 3, 5). In our case, we found no ticks on clinical examination, but since the cat lived in outdoor access, she might have had contact with ticks. The transmission of *Hepatozoon* in cats is not yet fully understood. However, Aktas (19) detected *H. felis* DNA in *Rhipicephalus sanguineus* tick in Turkey. Unlike other tick-borne protozoan and bacterial disease, *Hepatozoon* infection in a dog occurs by the ingestion of the infected ticks, and it is presumed that cats are infected by the same route (15).

In cats, the infection has a low virulence, mostly subclinical, and there is scarce clinical information on the disease (2, 5, 20). As in dogs with hepatozoonosis, the identification of a characteristic clinical syndrome in feline hepatozoonosis is difficult. The most common clinical findings of feline hepatozoonosis are nonspecific, including fever, anorexia, weakness, weight loss, lymphadenopathy, lethargy, and icterus (2, 14, 15). The clinical signs of the cat presented here were similar to those reported for cats with *Hepatozoon* sp. infection by other investigators (9, 20). The presence of co-infections with FeLV or FIV, other causes of immunosuppression, and other vectorborne pathogens have frequently been described in feline hepatozoonosis (5, 21). Similar with those reports, FIV and possible immunosuppression related to FIV could also play an important role in this case. A few studies have indicated that co-infections may enhance the virulence of *Hepatozoon* spp. (9, 22). Also, immunosuppression may increase the degree of parasitemia (2, 23).

In the present case, the results of laboratory tests revealed neutrophilic leukocytosis, moderate anemia, and bilirubinemia. Anemia and leukocytosis with neutrophilia in our case were similar with those previously reported (3, 9), and those alterations could be related to secondary necrosis and inflammation in the spleen, lymph nodes, liver, and lungs because of meronts observed in many tissues, such as the skeletal muscle, myocardium, lung, liver, pancreas, bone marrow, and lymph node (3, 9). Elevated serum total and direct bilirubin levels detected in our case may be related to the presence of developmental stages of the agent in the liver and hemolysis.

Nonspecific and broad clinical findings of the disease make it difficult to confirm the diagnosis based exclusively on clinical assessment. Hence, definitive diagnosis of feline hepatozoonosis is mainly performed by the determination of *Hepatozoon* spp. gametocytes within neutrophils and monocytes in stained blood smears. Because of low parasitemia, PCR should be considered

the diagnostic test of choice for confirming *Hepatozoon* infection (3). In this case, the diagnosis was confirmed by the detection of gamonts in Giemsa-stained blood smears and by PCR.

## CONCLUSION

This case is the first molecular identification of *Hepatozoon* sp. in a cat from Turkey. This infection should be considered in cats with inappetence, weight loss, anemia, icterus, and leukocytosis. Further studies are needed to understand hepatozoonosis in cats in Turkey.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Concept – G.E.T., B.U.; Design – G.E.T.; Supervision – B.U.; Resources – G.E.T., G.B.; Materials – G.E.T., S.B.; Data Collection and/or Processing – S.B., C.D., G.B.; Analysis and/or Interpretation – G.E.T., S.B.; Literature Search – C.D., G.B.; Writing Manuscript – G.E.T., B.U.; Critical Review – G.E.T., S.B., B.U.

**Conflict of Interest:** Authors have no conflicts of interest to declare.

**Financial Disclosure:** The authors declared that this study has received no financial support.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir – G.E.T., B.U.; Tasarım – G.E.T.; Denetleme – B.U.; Kaynaklar – G.E.T., B.U.; Malzemeler – G.E.T., S.B.; Veri Toplanması ve/veya İşlenmesi – S.B., C.D., G.B.; Analiz ve/veya Yorum – G.E.T., S.B.; Literatür Taraması – C.D., G.B.; Yazıyı Yazan – G.E.T., B.U.; Eleştirel İnceleme – G.E.T., S.B., B.U.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

## REFERENCES

1. Baneth G. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Vet Parasitol* 2011; 181: 3-11. [CrossRef]
2. Baneth G, Sheiner A, Eyal O, Hahn S, Beaufils JP, Anug Y, et al. Redescription of *Hepatozoon felis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) based on phylogenetic analysis, tissue and blood from morphology, and possibly transplacental transmission. *Parasit Vectors* 2013; 6: 102. [CrossRef]
3. Lloret A, Addie DD, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, et al. Hepatozoonosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* 2015; 17: 642-4. [CrossRef]
4. Giannelli A, Latrofa MS, Nachum-Biala Y, Hodžić A, Greco G, Attanasi A, et al. Three different *Hepatozoon* species in domestic cats from southern Italy. *Ticks Tick Borne Dis* 2017; 8: 721-4. [CrossRef]
5. Díaz-Regañón D, Villaescusa A, Ayllón T, Rodríguez-Franco F, Baneth G, Calleja-Bueno L, et al. Molecular detection of *Hepatozoon* sp. and *Cytauxzoon* sp. in domestic and stray cats from Madrid, Spain. *Parasit Vectors* 2017; 10: 112. [CrossRef]
6. Jittapalpong S, Rungphisutthipongse O, Maruyama S, Schaefer JJ, Stich RW. Detection of *Hepatozoon canis* in stray dogs and cats in Bangkok, Thailand. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1081: 479-88. [CrossRef]
7. Tabar MD, Altet L, Francino O, Sánchez A, Ferrer L, Roura X. Vector-borne infections in cats: Molecular study in Barcelona area (Spain). *Vet Parasitol* 2008; 151: 332-6. [CrossRef]
8. Vieira RFC, Biondo AW, Guimarães AMS, Santos AP, Santos RP, Dutra LH, et al. Ehrlichiosis in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20: 1-12. [CrossRef]
9. Baneth G, Aroch I, Tal N, Harrus S. *Hepatozoon* species infection in domestic cats: A retrospective study. *Vet Parasitol* 1998; 79: 123-33. [CrossRef]
10. Karagenc TI, Pasa S, Kirli G, Hosgor M, Bilgic HB, Ozon YH, et al. A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean coast of Turkey. *Vet Parasitol* 2006; 135: 113-9. [CrossRef]
11. Aktas M, Ozubek S, Altay K, Balkaya I, Utuk AE, Kırbas A, et al. A molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* in domestic dogs in Turkey. *Vet Parasitol* 2015; 209: 264-7. [CrossRef]
12. Aktas M, Ozubek S. A survey of canine haemoprotozoan parasites from Turkey, including molecular evidence of an unnamed *Babesia*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2017; 52: 36-42. [CrossRef]
13. Orkun O, Koç N, Sürsal N, Çakmak A, Nalbantoğlu S, Karaer Z. Molecular Characterization of Tick-Borne Blood Protozoa in Stray Dogs from Central Anatolia Region of Turkey with a High-Rate *Hepatozoon* Infection. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2017; 24: 227-32.
14. Inokuma H, Okuda M, Ohno K, Shimoda K, Onishi T. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. *Vet Parasitol* 2002; 106: 265-71. [CrossRef]
15. Shaw SE, Birtles RJ, Day MJ. Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. *J Feline Med Surg* 2001; 3: 193-209. [CrossRef]
16. Oliveira LS, Mourão LC, Oliveira KA, Agostini MM, Oliveira AC, Almeida MR, et al. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in cats in Brazil. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 53-4. [CrossRef]
17. Nevzat A. Bizde ilk defa görülen bik (*Hepatozoon canis*) vak'ası. *Türk Baytarlar Cemiyeti Mecmuası* 1933; 3: 5.
18. Voyvoda H, Pasa S, Unver A. Clinical *Hepatozoon canis* infection in a dog in Turkey. *J Small Anim Pract* 2004; 45: 613-7. [CrossRef]
19. Aktas M. A survey of ixodid tick species and molecular identification of tick-borne pathogens. *Vet Parasitol* 2014; 200: 276-83. [CrossRef]
20. Perez RR, Rubini AS, O'Dwyer LH. The first report of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) in domestic cats from São Paulo state, Brazil. *Parasitol Res* 2004; 94: 83-5. [CrossRef]
21. Maia C, Ferreira A, Nunes M, Vieira ML, Campino L, Cardoso L. Molecular detection of bacterial and parasitic pathogens in hard ticks from Portugal. *Ticks Tick Borne Dis* 2015; 5: 409-14. [CrossRef]
22. Kubo M, Miyoshi N, Yasuda N. Hepatozoonosis in two species of Japanese wild cat. *J Vet Med Sci* 2006; 68: 833-7. [CrossRef]
23. Beaufils JP, Martin-Granel J, Jumelle P. *Hepatozoon* spp. parasitemia and feline leukaemia virus infection in two cats. *Feline Pract* 1998; 26: 10-3.

# Bir Mongolian Gerbilde (*Meriones Unguiculatus*) *Dentostomella translucida* Schulz ve Krepkorgorskaja, 1932

*Dentostomella translucida* (Gerbil Pinworm) Infection in Mongolian Gerbil (*Meriones Unguiculatus*) Schulz and Krepkorgorskaja, 1932

Adnan Ayan<sup>1</sup> , Metin Pekağırbaş<sup>2</sup> , Süleyman Aypak<sup>2</sup> , Tülin Karagöç<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Ana Bilim Dalı, Van, Türkiye

<sup>2</sup>Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Ana Bilim Dalı, Aydın, Türkiye

**Cite this article as:** Ayan A, Pekağırbaş M, Aypak S, Karagöç T. *Dentostomella Translucida* (Gerbil Pinworm) Infection in Mongolian Gerbil (*Meriones Unguiculatus*) Schulz and Krepkorgorskaja, 1932. Türkiye Parazit Derg 2018; 42(4): 290-3.

## ÖZ

Son yıllarda, evde beslenebilen hayvanlar grubunda sayılmaya başlanan ancak daha çok deney hayvanı olarak bilinen Mongolian gerbillerin (*Meriones unguiculatus*) popüleritesi ve kullanımı giderek artmaktadır. Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi bünyesinde bulunan Deney hayvanları üretim merkezinde, ölen bir gerbilin yapılan nekropsisinde *Dentostomella translucida* (Oxyuroidea) tespit edilmiştir. Mongolian gerbiller, kıl kurdu olarak da ifade edilen *D.translucida*'nın başlıca doğal konaklarıdır. Nekropside ince bağırsaklardan 26 adet parazit toplanarak mikroskopta incelenmiş ve ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümlere göre dişi parazitlerin 15,6-25,4 mm (ort: 18,3), erkek parazitlerin 10,2-16,8 mm (ort: 13,3) uzunluğunda oldukları, ortalama özofagus uzunluğunun dişilerde 397,3 mµ, erkeklerde 325,3 mµ olduğu, dişilerde vulvanın ön uca yakın ve ortalama 8,7 mm, erkeklerde ise spikülümün tek ve ortalama 342 mµ uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kloaka çevresinde 7 adet papil gözlenmiştir. Postmortem organ muayenesi yapılan gerbilin rektumundan da dışkı alınarak incelenmiş ve tespit edilen yumurtaların iğ şeklinde ve hafif asimetric, 117-128 X 45-49 mµ (ort: 120x48 mµ) çapında olduğu görülmüştür. Gerbillerin spesifik paraziti olarak bilinen *D. translucida*'nın bulunduğu hayvandan koloninin diğer üyelerine kolayca bulaşabilmesi, gerbil yetiştiriciliği yapılan ünitelerde varlığının kontrolünü gerektirir.

**Anahtar Kelimeler:** Gerbil, helmint, nematod, *Dentostomella translucida*, Türkiye

**Geliş Tarihi:** 08.05.2018

**Kabul Tarihi:** 13.07.2018

## ABSTRACT

The popularity of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) as pets as well as experimental animals is continuously increasing. Mongolian gerbils are the main natural hosts of the nematode *Dentostomella translucida*, also referred to as pinworm, threadworm, or seatworm. *D. translucida* (Oxyuridae) was recently detected in the necropsy of a gerbil housed at the experimental animal production center of Adnan Menderes University Faculty of Veterinary Medicine. Mongolian gerbils are the main natural hosts of *D. translucida*, also referred to as pinworm. During necropsy in this animal, 26 parasites were collected from the small intestine and microscopically examined. The length of the female and male parasites was determined as 15.6-25.4 (mean, 18.3) and 10.2-16.8 (mean, 13.3) mm, respectively. The mean esophageal length in the female and male parasites was 397.3 and 325.3 mµ, respectively. The vulva of the females was close to the front end and was approximately 8.7 mm in length. The males had a single spiculum of approximately 342 mµ in length. There were seven papillae around the cloaca. During postmortem examination, eggs were also detected in feces collected from the gerbil's rectum. The eggs were spindle-shaped, slightly asymmetric, and had a diameter of 117-128 x 45-49 mµ (mean, 120 x 48 mµ). *D. translucida*, which is a parasite specific to gerbils, may easily affect other members of the animal colony. Thus, controlling its presence in gerbil breeding units is essential.

**Keywords:** Gerbil, helminth, nematode, *Dentostomella translucida*, Turkey

**Received:** 08.05.2018

**Accepted:** 13.07.2018

## GİRİŞ

Son yıllarda, evde beslenebilen hayvanlar grubunda sayılmaya başlanan ancak daha çok deney hayvanı olarak bilinen Mongolian gerbillerin (*Meriones unguiculatus*) popüleritesi

ve kullanımı giderek artmaktadır. Bilimsel çalışmalarda sıklıkla kullanılan deney hayvanlarının sağlıklı olmaları, yapılacak denemelerin başarısını direkt ya da dolaylı olarak etkilemektedir. Hayvanlarda yaygın olarak rastlanılan parazitler enfeksi-

**Bu çalışma 19. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Uluslararası Ekinokokkozis Sempozyumunda Poster bildirisi olarak sunulmuştur (5-9 Ekim 2015, Erzurum). This study has been presented at the 19<sup>th</sup> National Parasitology Congress and International Echinococcosis Symposium (October 5-9, 2015, Erzurum).**

**Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** Metin Pekağırbaş E.mail: metinpekagirbas@gmail.com

DOI: 10.5152/tpd.2018.6032

©Telif hakkı 2018 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.turkiyeparazitolog.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2018 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.turkiyeparazitolog.org



yonlar, organ ve dokulardaki yoğunluklarına bağılı olarak değişen derecelerde patolojilere neden olabilmektedir. Bu nedenle denemelerin sonuçlarına etki edebilecek parazitler enfeksiyonlarının varlığı yapılacak hayvan deneyleri öncesinde mutlaka tespit edilmesi ve gerekli tedavi uygulanmalıdır.

Mongolian gerbiller, kıl kurdu olarak da ifade edilen *Dentostomella translucida*'nın başlıca doğal konaklarıdır. Gerbil kıl kurtları, Oxyuroidea üstfamilyasına bağılı olup, yaşam döngülerinde ara konağa ihtiyaç duymazlar. Dışkıyla çıkan yumurtaların ağız yoluyla alınması kemirgenler için tipik bir enfeksiyon şeklidir. Erişkin ve genç parazitler gerbillerin ince bağırsağının proksimal kısmında, bazen de mide de bulunabilmektedir. *Dentostomella translucida*'nın prepatent süresi 25-29 gündür (1).

Birçok kemirgen kıl kurdu enfeksiyonunda olduğu gibi, *D. translucida* enfeksiyonları da asemptomatiktir. Bağışıklık düzeyinin, büyüme hızının ve elektrolit dengesinin bozulması kıl kurdu enfeksiyonlarının bildirilen birkaç etkisidir (2). Ayrıca kıl kurdu enfeksiyonları çevreyi ve kafesleri kontamine ederek tüm gerbil kolonisine bulaşabilmektedir. Enfeksiyon varlığı, tedaviyle birlikte detaylı bir sanitasyon uygulama gerekliliğini de ortaya çıkarabilir. Tüm bu etkiler, beraberinde araştırma maliyetlerinin artışına da neden olabilmektedir. Bunlara ek olarak diğer kemirgen türlerine de bulaşma ihtimali, tespit edildiğinde kesinlikle tedavi edilmesini gerektirmektedir (3).

Ryzhikov ve ark. (4) parazitin Asya ülkelerinden Kazakistan, Özbekistan ve Türkmenistan'da saptandığını bildirmişlerdir. Yapılan diğer çalışmalarda Brezilya ve Amerika'da pet olarak kullanılan gerbillerde de parazitin varlığı bildirilmiştir (5).

Yapılan çalışma tüm Dünya'da sıklıkla bilimsel çalışmalarda kullanılan Mongolian gerbillerin, denemeler öncesinde parazit enfeksiyonları açısından kontrolünün önemini ortaya koymaktadır.

## OLGU SUNUMU

Çalışmanın materyalini Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi bünyesindeki Deney Hayvanları Üretim Merkezinde bulunan gerbillerden biri oluşturmuştur. Üretim merkezinde bilinmeyen sebeple ölen bir gerbilin, ölüm nedenine yönelik yapılan nekropsisi sırasında bağırsaklarında parazitlere rastlanılmıştır.

Toplanan parazitler öncelikle küçük bir beherde fizyolojik tuzlu su (FTS) içinde, zarar vermeden çalkalanarak yapışan yabancı maddelerin ayrılması sağlanmıştır. FTS döküldükten sonra yeni eriyik konmuş, bu işlem su temizlenene kadar sürdürülmüştür. Daha sonra fazla FTS dökülmüş, beher dibinde bir iğne yardımı ile birbirinden uzaklaştırılan parazitlerin üzerine kaynama derecesine yakın sıcaklıkta % 70'lik etil alkol konularak tespit işlemi yapılmıştır. Parazitler daha sonra özel saklama solüsyonuna (92 kısım % 70'lik etil alkol, 5 kısım gliserin ve 3 kısım % 10'luk formol) aktarılarak, tür teşhisleri yapıncaya kadar burada saklanmıştır. Teşhis işleminde, parazitler laktofenol (2 kısım gliserin, 1 kısım fenol, 1 kısım laktik asit, 1 kısım distile su) (6) alınarak parazitlerin şeffaflaşması sağlanmış, dişi ve erkek parazitler incelenip ilgili literatürlerden yararlanılarak tür tayinine gidilmiştir (7).

Organ muayenesi yapılan gerbilin aynı zamanda rektumundan dışkı alınmış ve Fülleborn'un flotasyon yöntemi (6) ile kontrol edilip, nekropsi bulguları ile dışkı bakışı sonuçları karşılaştırılmıştır.

Nekropsisi yapılan gerbilin ince bağırsaklarında 20'si dişi, 6'sı erkek olmak üzere toplam 26 adet parazit toplanmıştır. Bu parazitlerin mikroskopik incelemelerinde morfolojik olarak *D. translucida*'nın özellikleri ile uyumlu oldukları tespit edilmiştir (Resim 1,2,3). Yapılan ölçümlerde dişi parazitlerin 15,6-25,4 mm (ort: 18,3), erkek parazitlerin 10,2-16,8 mm (ort: 13,3) boy aralığında oldukları, ortalama özofagus uzunluğunun dişilerde 397,3 µm, erkeklerde 325,3 µm, vulvanın ön uca yakın ve ortalama 8,7 mm, spikülümün tek ve ortalama 342 µm uzunluğunda olduğu görülmüştür. Ayrıca kloaka çevresinde 7 adet papil tespit edilmiştir. (Resim 4,5)

Rektumdan alınan dışkı ile yapılan Fülleborn flotasyon metodu ile tespit edilen yumurtalar iğ şeklinde ve hafif asimetric olup 117-128 X 45-49 µm (ort: 120x48 µm) çapındadır. (Resim 6)

Çalışmada hasta onam formu ve etik kurul onayına ihtiyaç bulunmamaktadır.

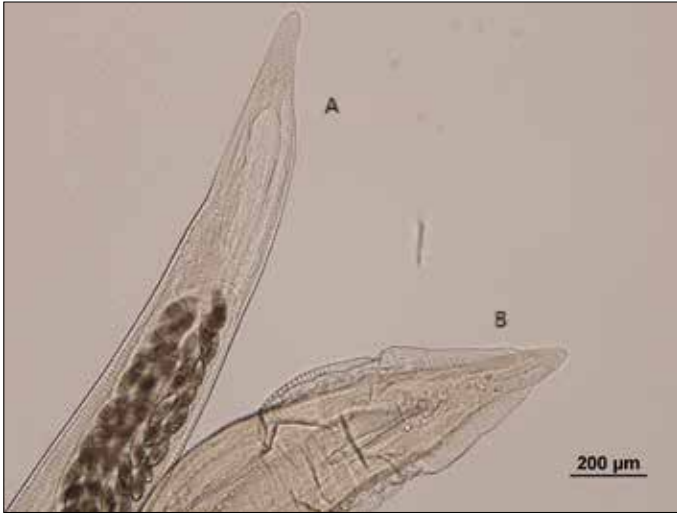
## TARTIŞMA

*Dentostomella translucida* gerbil kılkurdu olarak bilinmektedir. Petter ve Quentin (8) e göre *D. translucida*, Gerbillidae ailesinin spesifik bir nematodudur. Bu parazit Mongolian gerbillerden başka Great gerbil (*Rhombomys opimus*) (1) Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) (9) ve African giant ratlarda (*Cricetomys gambianus*) (10) tespit edilmiştir.

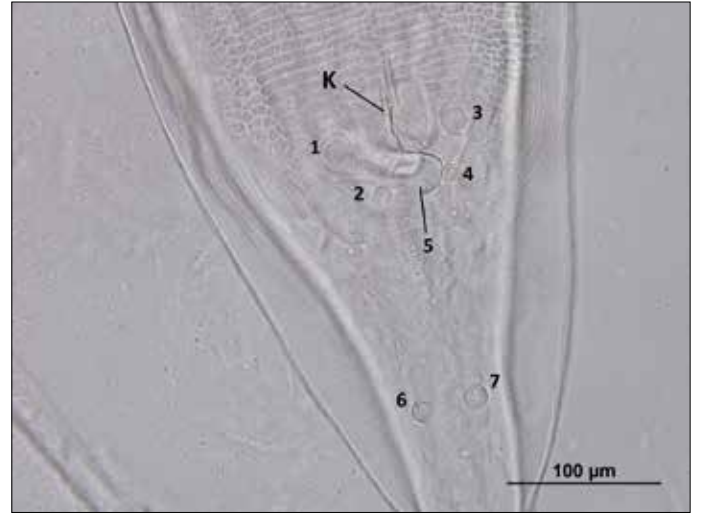
Schulz ve Krepkorgorskaja (11) Kazakistan'ın Lichtenstein bölgesinde büyük gerbillerde (*Rhombomys opimus*) *D. translucida*'yı ilk defa tanımlamışlardır. Schulz ve Landa (12) ile Shleikher ve Samsonova (13) ise Kazakistan ve Özbekistan'ın yayla ve çöl bölgelerindeki büyük gerbillerde bu paraziti sık görülen birkaç nematod türünden biri olarak bildirmişlerdir. Chitwood (14) ile Kuntz ve Myers (15) Yemen ratlarında da (*Myomys fumatus yemeni*) *D. translucida*'yı tanımlamışlardır. *D. translucida* Suriye hamster'larında da tespit edilmiştir (3).

ABD ve Brezilya'da pet gerbillerde doğal enfeksiyon bildirilmiştir (1,5). Avrupa ülkelerinde, Mongolian gerbiller genellikle pet hayvanı olarak kullanılmaktadır. Bu yüzden gerbillerde helmintler yönünden çok fazla araştırma bulunmamaktadır. Yapılan çalışmada (16) Avrupa'da da nematodun bulunması *D. translucida*'nın doğal konağı ile sıkı sıkıya ilişkide olduğunu, ayrıca konağın habitatındaki değişikliklerin bile konak parazit ilişkisini etkilemediğini düşündürmüştür.

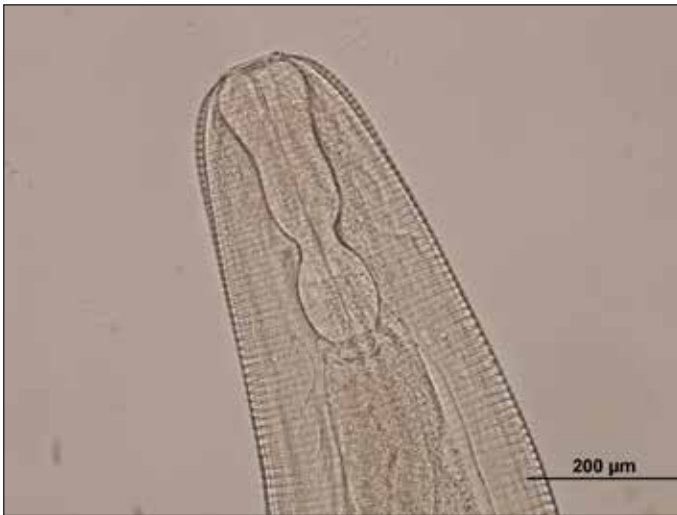
Türkiye'de Burgu ve ark. (17) doğal enfekte bir gerbilde *D. translucida*'yı tespit etmişlerdir. Bu çalışma dışında Türkiye'de gerbillerde bugüne kadar herhangi bir parazit bildirimine rastlanılmamıştır. Gerçekleştirilen bu çalışma ile uzun bir aradan sonra bu parazitin ikinci kez ülkemizde varlığı gösterilmiştir. Dünyada gerbillerde oldukça yaygın olduğu bilinen bu parazite Türkiye'de henüz ikinci kez rastlanılmış olması, bu hayvanların yeterince yaygın kullanılmamış olması ve parazitlerinin de ihmal edilmiş olması ile açıklanabilir. İnsanlara bulaşma potansiyeli ve deney hayvanı fizyolojisine etkileri hakkında henüz detaylı bir bilgi olmamakla birlikte pet ve deney hayvanlarının parazitlerden arı olmaları tercih edilmektedir. Parazit direkt yaşam döngüsüne sahiptir ve enfekte hayvanların dışkıları ile kontamine ettikleri çevreden enfekte yumurtaların ağız yolu ile alınmasıyla bulaşma gerçekleşmektedir.



**Resim 1. a, b.** Erişkin *D.translucida*'lara ait arka uçlar; a) Dişi, b) Erkek



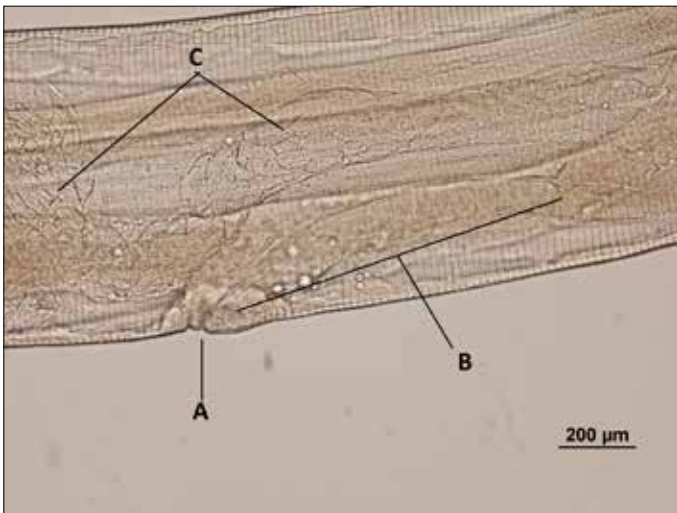
**Resim 4.** Erişkin erkek *D.translucida* arka uç; Kloaka (K) ve çevresinde 7 papil



**Resim 2.** Erişkin *D.translucida* ön uç



**Resim 5.** Erişkin erkek *D.translucida* arka uç, yandan görüntü



**Resim 3. a-c.** Erişkin dişi *D.translucida*; a) Vulva, b) Ovajektör, c) Yumurtalarla dolu uterus



**Resim 6.** *D.translucida* yumurtası

Gerbillerin spesifik paraziti olarak bilinen *D. translucida*'nın bulunduğu hayvandan koloninin diğer üyelerine kolayca bulaşabilmesi, gerbil yetiştiriciliği yapılan ünitelerde varlığının kontrolünü gerektirir.

## SONUÇ

Deney hayvanı olarak kullanılan kemirgenlerin paraziter enfeksiyonları bilimsel çalışmaların sonuçlarını etkileyebilmektedir. Söz konusu parazit ile mücadelede çevresel dekontaminasyon pahalı ve zaman alıcı olmasına rağmen eradikasyonun önemli bir parçasıdır. Parazit hakkındaki bilgi eksikliği ve gerbillerde bu parazitin yoğun olarak bulunduğu da düşünüldüğünde, parazit ile mücadelede doğal enfekte veya enfekte edilmiş gerbiller üzerinde antelmantik ilaç denemelerinin uygulanması ve paraziti elimine edebilen potansiyel ajanların tespit edilmesinin faydalı olabileceği düşünülmektedir.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir – A.A., M.P.; Tasarım – S.A., M.P.; Denetleme – S.A., T.K., M.P.; Kaynaklar – A.A., S.A., M.P.; Malzemeler – T.K., S.A.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – M.P., A.A.; Analiz ve/veya Yorum – A.A., M.P., S.A., T.K.; Literatür Taraması – A.A., M.P., S.A., A.A.; Yazıyı Yazan – A.A., M.P., S.A., T.K.; Eleştirel İnceleme – S.A., T.K., M.P.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Concept – A.A., M.P.; Design – S.A., M.P.; Supervision – S.A., T.K., M.P.; Resources – S.A., M.P.; Materials – T.K., S.A. - Data Collection and/or Processing – A.A., M.P.; Analysis and/or Interpretation – A.A., M.P., S.A., T.K.; Literature Search – M.P., S.A., A.A.; Writing Manuscript – A.A., M.P., S.A., T.K.; Critical Review – S.A., T.K., M.P.

**Conflict of Interest:** Authors have no conflicts of interest to declare.

**Financial Disclosure:** The authors declared that this study has received no financial support.

## KAYNAKLAR

1. Wilkerson JD, Brooks DL, Derby M, Griffey SM. Comparison of practical treatment methods to eradicate pinworm (*Dentostomella translucida*) infections from Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Contemp Top Lab Anim Sci* 2001; 40: 31-6.
2. Wagner M. The effect of infection with the pinworm (*Syphacia muris*) on rat growth. *Lab Anim Sci* 1988; 38: 476-8.

3. Greve JH. *Dentostomella translucida*, a nematode from the golden hamster. *Lab Anim Sci* 1985; 35: 497-8.
4. Ryzhikov KM, Gvozdev EV, Tokobaev MM, Schaldybin LS, Macaberdze GV, Merkusheva IV, et al. Key to the helminth fauna of rodents in the USSR. *Nematodes. Publ House Nauka, Moscow (In Russian);* 1979.
5. Pinto RM, Gomes DC, Menezes RC, Muniz-Pereira LC, Noronha D. First natural helminth infection in the Mongolian gerbil *Meriones unguiculatus* (Rodentia, Muridae), parasitized with *Dentostomella translucida* (Nematoda, Heteroxynematidae) in the neotropical region. *Braz J Biol* 2003; 63: 173-5. [\[CrossRef\]](#)
6. Thienpont D, Rochette F, Vanparijs OFL. *Diagnosing Helminthiasis by Coprological Examination. 2nd Ed. Belgium. Janssen Research Foundation;* 1986.
7. Yi JK, Heckmann RA. Morphological Characteristics of *Dentostomella translucida*, A Nematode (Oxyuroidea) Found in Mongolian Gerbils. *Great Basin Nat* 1988; 48: 206-15.
8. Petter AJ, Quentin JC. Keys to genera of the Oxyuroidea. In: Eds. R.C. Anderson, A.G. Chabaud and S. Willmott. *CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates. No. 4. Commonwealth Agricultural Bureaux, Bucks, England* 1976; p. 30.
9. Tantelean MV, Quispe M, Angulo JT, Enrique SM. *Dentostomella translucida* (Nematoda, Oxyuroidea, Heteroxynematodae) in *Mesocricetus auratus* of Peru. *Peru J Parasitol* 2011; 19: 73-6.
10. Olude M, Ajayi OL, Adebayo AO, Akande FA, Olugbogi EI. Intestinal Intussusception due to Concurrent Infections with *Hymenolepis nana* and *Dentostomella translucida* in an African Giant Rat (*Crictomys gambianus*): A Case Report. *Science World Journal* 2010; 5: 21-3. [\[CrossRef\]](#)
11. Schulz RE, Krepkorgorskaja TA. *Dentostomella translucida* n. sp. (Nematoda, Oxyurinae) aus einem Nagetier (*Rhombomysopimus* Licht) (in German). *Zool Anz* 1932; 97: 330-4.
12. Schulz RE, Landa DM. Parasitic worms of the great gerbil (*Rhombomysopimus* Licht) (in Russian). *Vestnik Mikrobiol Epidemiol Parasitol* 1934; 13: 305-15.
13. Shleikher EI, Samsonova AV. Helminth fauna of the great gerbil (*Rhombomysopimus*) of Uzbekistan. Contributions to Helminthology. Published to Commemorate 75th Birthday of K. I. Skrjabin. *Acad Sci USSR, Moscow* 1954; p. 804 (English translation, 1966. Washington, D.C., U.S. Department of Commerce.)
14. Chitwood MB. *Dentostomella grundmanni* n. sp. (Nematoda: Oxyuridae) from *Eutamiasquadri vittatus* (Say, 1823). *Proc Helminthol Soc Wash* 1963; 30: 70-2.
15. Kuntz RE, Myers BJ. Helminths of vertebrates and leeches taken by the U.S. Naval Medical Mission to Yemen, Southwest Arabia. *Can J Zool* 1968; 46: 1071-5. [\[CrossRef\]](#)
16. Zalesny G, Hildebrand J, Popiotek M, Okulewicz A. *Dentostomella translucida* Schulz et Krepkorgorskaja, 1932 (Nematoda, Heteroxynematidae), a new species for the European nematofauna. *Acta Parasitologica* 2008; 53: 219-21. [\[CrossRef\]](#)
17. Burgu A, Alabay M, Oge H. Gerbil (*Meriones unguiculatus*) *Dentostomella translucida* Schulz ve Krepkorgorskaja, 1932. *Ankara Univ Vet Fak Derg* 1992; 39: 291-9.

## 42. Cilt Dizini

### 42<sup>nd</sup> Volume Index

#### HAKEM LİSTESİ - REVIEWER LIST

*Mart 2018 - Aralık 2018*

*March 2018 - December 2018*

A. Tümay GÜRLER	Ferda SEVİNÇ	Mehmet Salih Gürel	Sema ERTUĞ
Abdullah İNCİ	Filiz GÜNAY	M. Emin Limoncu	Semra Özçelik
Ahmet GÖKÇEN	Funda AL	Meral AYDENİZÖZ	Seray Töz
Ahmet ÖZBİLGİN	Gönül DİNÇ	Mucide AK	Serdar PAŞA
Ali Ahmet KİLİMCİOĞLU	Gülay VURAL	Munir Aktaş	Serkan BAKIRCI
Alparslan YILDIRIM	Hamza AVCIOĞLU	Mustafa Necati MUZ	Serpil DEĞERLİ
Aynur GÜLANBER	Hande Dağcı	Münir AKTAŞ	Serpil NALBANTOĞLU
AYSEN GARGILI	Hatice ÇİÇEK	Nadim Yılmaz	Sırrı Kar
Ayşe ÇAKMAK	Hatice Ertabaklar	Nazmiye ALTINTAŞ	Songül DELİBAŞ
Ayşegül TAYLAN ÖZKAN	Hatice ÖGE	Nevin Turgay	Soykan Özkoç
Bilal DİK	Hüseyin Bilgin Bilgiç	Orçun ZORBOZAN	Şinasi UMUR
Çiler AKISÜ	Kader YILDIZ	Önder DÜZLÜ	Uğur USLU
Engin ARAZ	Kirami Ölgen	Özgür KURT	Yaşar Ali ÖNER
Ergün KÖROĞLU	Kosta MUMCUOĞLU	Özlem MİMAN	Zeynep TAŞ
Esin GÜVEN	Mehmet HARMAN	Özlem Tünger	
Fatih Mehmet Şimşek	Mehmet KARAKUŞ	Sami ŞİMŞEK	