

— TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY —

Özgün Araştırmalar / Original Investigations

Malaria in Antalya

Antalya'da Sıtma

Önder Ser; Antalya, Turkey

Trypanosoma Türlerinin in vitro Kültürü

In vitro cultivation of Trypanosoma species

Ahmet Özbilgin, İbrahim Çavuş, Alicem Nuraydın, Yener Özel; Manisa, Türkiye

Kutanöz Leishmaniasis Pentavalan Direnci

Cutaneous Leishmania Pentavalent Resistance

Ahmet Özbilgin, İbrahim Çavuş, Tuğba Kaya, Ahmet Yıldırım, Mehmet Harman; Manisa, Hatay, Diyarbakır, Türkiye

Zoonotic Parasites Ova in Playground

Oyun Alanlarında Zoonoz Parazit Yumurtası

Mehmet Fatih Aydın; Karaman, Türkiye

Demodex Kaynaklı Blefarit Olguları

Blepharitis Caused by Demodex

Mehtap Demirkazık, İsmail Soner Koltaş; Adana, Türkiye

Sivas İlinde İnsanlarda Patojen Bağırsak Parazitleri

Pathogenic Intestinal Parasites in Human in Sivas Province

Ahmet Duran Ataş; Sivas, Türkiye

Nigella sativa'nın Antihelmintik Aktivitesi

Antihelminthic Activity of Nigella sativa

Necati Özpinar; Hatay, Türkiye

E. bieneusi Moleküler Karakterizasyonu

Molecular Characterization of E. bieneusi

Tuğba Bilgin, Sadullah Usluğ, Gupse Kübra Karademir, Mübeccel Okur, Gamze Yetişmiş, Alparslan Yıldırım; Kayseri, Türkiye

Molecular Characterization of O. ovis

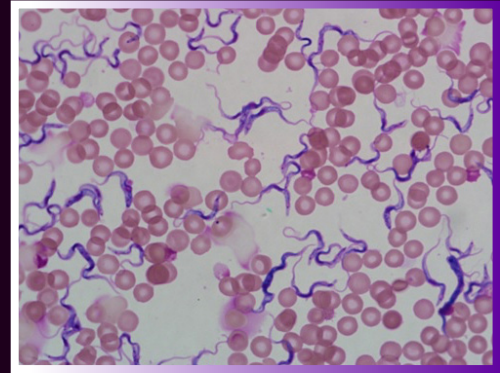
O. ovis'in Moleküler Karakterizasyonu

Gupse Kübra Karademir, Sadullah Usluğ, Mübeccel Okur, Abdullah İnci, Alparslan Yıldırım; Kayseri, Turkey

Göç Öncesi ve Sonrası Hatay'daki KL Olguları

Before and after migration CL cases in Hatay

Gülhaz Çulha, Tuğba Kaya, Asena Çiğdem Doğramacı; Hatay, Türkiye



■ **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, School of Medicine, Ege University, İzmir, Turkey
yusuf.ozbel@ege.edu.tr
yusuf.ozbel@gmail.com
ORCID No: 0000-0001-8335-1997

Baş Editör / Editor-in-Chief

Yusuf Özbel

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
Department of Parasitology, School of Medicine, Ege University, İzmir, Turkey
yusuf.ozbel@ege.edu.tr
yusuf.ozbel@gmail.com
ORCID No: 0000-0001-8335-1997

Biyoistatistik Editörü / Biostatistical Consultant

Aliye Mandıracıoğlu

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
Department of Public Health Care, Faculty of Science, Ege University, İzmir, Turkey
aliye.mandiracioglu@ege.edu.tr
ORCID No: 0000-0002-0873-4805

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

Ziya Alkan

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
Department of Parasitology, School of Medicine, Ege University, İzmir, Turkey
m.ziya.alkan@ege.edu.tr
ORCID No: 0000-0003-3738-4768

Nermin Şakru

Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye
Department of Microbiology, School of Medicine, Trakya University, Edirne, Turkey
nsakru@yahoo.com
ORCID No: 0000-0002-1312-7233

Seray Töz

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
Department of Parasitology, School of Medicine, Ege University, İzmir, Turkey
seray.ozensoy.toz@ege.edu.tr
ORCID No: 0000-0001-5957-8665

Nevin Turgay

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
Department of Parasitology, School of Medicine, Ege University, İzmir, Turkey
nevin.turgay@ege.edu.tr
ORCID No: 0000-0003-4517-3223

Özlem Miman

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
Department of Parasitology, School of Medicine, Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey
ozlem.miman@deu.edu.tr
ORCID No: 0000-0003-3415-4959



Galenos Yayınevi Kurucusu ve Sahibi/
Galenos Publishing House Owner and Publisher
Derya Mor
Erkan Mor

Genel Yayın Koordinatörü/Publication
Coordinator
Burak Sever

Web Koordinatörleri/Web Coordinators
Turgay Akpınar
Fuat Hocalar

Grafik Departmanı/Graphics Department
Ayda Alaca
Çiğdem Birinci
Gülşah Özgül

Finans Koordinatörü/Finance Coordinator
Sevinç Çakmak

Proje Koordinatörleri/Project Coordinators
Pınar Akpınar
Gamze Aksoy
Saliha Tuğçe Evin
Melike Eren
Hatice Sever
Duygu Yıldırım

Proje Asistanları/Project Assistants
Rabia Palazoğlu
Gülşah Akın
Özlem Çelik
Ece Büşra Türkmen

Araştırma&Geliştirme/Research&Development
Mevlûde Özlem Akgüney
Mert Can Köse

Yayınevi İletişim/Publisher Contact

Address: Molla Gürani Mah. Kaçamak Sk. No: 21/1
34093 İstanbul, Turkey
Telefon/Phone: +90 (212) 621 99 25
Faks/Fax: +90 (212) 621 99 27
E-posta/E-mail: info@galenos.com.tr/
yayin@galenos.com.tr
Web: www.galenos.com.tr
Publisher Certificate Number: 14521
Publishing Date: March 2020
E-ISSN: 2146-3077

Üç ayda bir yayımlanan süreli yayındır.
International scientific journal published quarterly.



İ. Cüneyt Balcıoğlu

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı,
Manisa, Türkiye
Department of Parasitology, School of Medicine, Celal Bayar
University, Manisa, Turkey
drcbal@yahoo.com

Songül Delibaş

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim
Dalı, İzmir, Türkiye
Department of Parasitology, School of Medicine, Dokuz Eylül
University, İzmir, Turkey
songul.bdelibas@deu.edu.tr

Mert Döşkaya

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir,
Türkiye
Department of Parasitology, School of Medicine, Ege University,
İzmir, Turkey
mert.doskaya@ege.edu.tr
ORCID No: 0000-0001-6868-008X

Özgür Kuru

Gülhane Askeri Tıp Akademisi Parazitoloji Anabilim Dalı,
Ankara, Türkiye
Department of Parasitology, Gulhane Military Medical
Academy, Ankara, Turkey
okoru@gata.edu.tr

Özgür Kurt

Acıbadem Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul,
Türkiye
Department of Microbiology, School of Medicine, Acıbadem
Üniversitesi, İstanbul, Turkey
oz1605@hotmail.com
ORCID No: 0000-0001-5575-588X

■ Biyoloji/Biology**Hüseyin Çetin**

Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Antalya,
Türkiye
Akdeniz University Faculty of Science, Department of
Biology, Antalya, Turkey
hçetin@akdeniz.edu.tr
ORCID No: 0000-0002-9758-6356

■ Veteriner Parazitoloji / Veterinary Parasitology**Atıla Akça**

Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim
Dalı, Kars, Türkiye
Department of Parasitology, School of Veterinary Medicine,
Kafkas University, Kars, Turkey
atilaakca@hotmail.com
ORCID No: 0000-0002-7903-3950

Ayşen Gargılı

Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik
Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
Department of Nursing, Faculty of Health Sciences,
Marmara University, İstanbul Turkey
agargili@yahoo.com
ORCID No: 0000-0001-6677-1498

Veli Yılğör Çırak

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji
Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye
Department of Parasitology, Faculty of Veterinary
Medicine, Uludağ University, Bursa, Turkey
vcirak@uludag.edu.tr
ORCID No: 0000-0003-0570-2514

Tülin Karagenc

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi,
Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye
Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine,
Adnan Menderes University, Aydın, Turkey
tulinkaragenc@yahoo.com

Bayram Şenlik

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji
Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye
Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine,
Uludağ University, Bursa, Turkey
bsenlik@uludag.edu.tr
ORCID No: 0000-0003-2964-2245

Sami Şimşek

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim
Dalı, Elazığ, Türkiye
Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine,
Fırat University, Elazığ, Turkey
ssimsek@firat.edu.tr
ORCID No: 0000-0002-3567-326X

Ahmet Doğanay

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji
Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine,
Ankara, Turkey
doganay@veterinary.ankara.edu.tr

■ Uluslararası Danışma Kurulu /International Advisory Board

Tümay Güler

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, İstanbul, 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, School of Medicine, Celal Bayar University, Manisa, Turkey

Ahmet Üner

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

Ali Ahmet Kilimcioğlu

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

Ali Aydoğdu

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

A. İhsan Diker

Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinik Öncesi Bilimler Bölümü Parazitoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye
Balıkesir University Faculty of Veterinary Medicine Department of Pre-Clinical Sciences Department of Parasitology, Balıkesir, 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

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

Anıl İça

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

A. Onur Girişgin

Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinik Öncesi Bilimler Bölümü Parazitoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye
Bursa Uludağ University Faculty of Veterinary Medicine Department of Pre-Clinical Sciences Department of Parasitology, Bursa, 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, İstanbul University, İstanbul, 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, School 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, School of Medicine, Hitit University, Çorum, Turkey

Ayşegül Ünver

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

Aytül Önal

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

Bahadır Gönenc

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



Bariş Sarı

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

Bayram Ali Yukarı

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 and Letters, Ege University, Bornova, Turkey

Bijen Kivçak

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
Niğde 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, İstanbul University, İstanbul, Turkey

Çağrı Büke

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

Chizu Sanjoba

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

Çiğdem Banu Çetin

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

Çiler Akisü

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

M. Emin Limoncu

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek YO, Manisa, Türkiye
Department of Parasitology, School of Medicine, Ege University, İzmir, Turkey

Derya Dirim Erdoğan

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
Vocational school of Health Care Services, Celal Bayar University, Manisa, Turkey

Emrah Şimşek

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Klinik Öncesi Bilimler Bilim Dalı, Kayseri, Türkiye
emrahsimsekerciyes.edu.tr

Engin Araz

Gülhane Askeri Tıp Akademisi Parazitoloji Anabilim 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, School of Medicine, Harran University, Şanlıurfa, Turkey

Ferda Sevinç

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, School of Medicine, Celal Bayar University, Manisa, Turkey

Gökman Zafer Pekmezci

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinik Öncesi Bilimler Bölümü Su Ürünleri ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye
Ondokuz Mayıs University Faculty of Veterinary Medicine Department of Pre-Clinical Sciences Department of Water and Diseases, Samsun, Turkey

Gülay 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, School of Medicine, Mustafa Kemal University, Hatay, Turkey

Gürol Cantürk

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adli Tıp Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
Department of Forensic Medicine, School 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 Avcioğlu

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, School 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, School 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 Ertağlar

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye
Department of Parasitology, School 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 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, İzmir, Turkey

İ. Soner Koltuş

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

A. İhsan Diker

Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Klinik Öncesi Bilimler Bölümü, Balıkesir, Türkiye
ihсандiker@yahoo.com

İhsan Yaşa

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



İsmet Özel

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

İzzet Şahin

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı,
Kayseri, Türkiye
Department of Parasitology, School 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
Urmia Tıp Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji ve
Mikoloji Anabilim Dalı, Urmia, İran

Kirami Ölgen

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

Kor Yereli

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim
Dalı, Manisa, Türkiye
Department of Parasitology, School 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,
School 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

Cemal Oğuz

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

Fatih Şimşek

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

Özkan Arslan

Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim
Dalı, Kars, Türkiye

Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine,
Kafkas University, Kars, Turkey

Mehmet Ziya Alkan

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

Mehmet Harman

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri ve Zührevi Hastalıklar
Anabilim Dalı, Diyarbakır
Department of Dermatology, Faculty of Medicine
University of Dicle, 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, İstanbul, 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, School of Medicine, İnönü
University, Malatya, Turkey

Metin Korkmaz

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

Mucide Ak

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

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

Mustafa Demirci

Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
Department of Microbiology, School of Medicine, Katip Çelebi University, İzmir, Turkey

Mustafa Kaplan

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye
Department of Parasitology, School of Medicine, Fırat 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

Mustafa Yılmaz

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

Münir Aktaş

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

Naciye Güllük 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, Fırat University, Sivas, Turkey

Nazir Dumanlı

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

Nazmiye Altıntaş

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

Nermin Şakru

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

Nevin Turgay

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Department of Parasitology, School of Medicine, Ege University, İzmir, Turkey

Nihal Doğan

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

Nilgün Daldal

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

Nogay Girginkardeşler

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye
Department of Parasitology, School 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 Sarımehtemoğlu

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, School of Medicine, Uludağ University, Bursa, Turkey

A. Onur Girişgin

Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Klinik Öncesi Bilimler Bölümü, Bursa, Türkiye
onurgirisgin@gmail.com

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, School of Medicine, Acıbadem Üniversitesi, İstanbul, Turkey

Özlem Miman

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

Özlem Tünger

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye
Department of Microbiology, School 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 School of Medicine, Ege University, İzmir, Turkey

Renate Radek

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

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, Fırat 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, School 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 Özçelik

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

Seray Töz

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

Soner Uzun

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

Songül Delibaş

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

Tuğrul Dereli

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

Ülgen Z. Ok

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

Ümit Çimli Aksoy

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

Veli Yılgör 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 School of Medicine, İstanbul University, İstanbul, 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, School 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

Gökmen Zafer Pekmezci

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Klinik Öncesi Bilimler Bilim Dalı, Samsun, Türkiye
zpekmezci@omu.edu.tr

Zati Vatanserver

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, School of Medicine, Cumhuriyet University, Sivas, Turkey

Zeynep Taş

Yüzünü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye
Department of Parasitology, School of Medicine, Yüzünü Yıl University, Van, Turkey



AMAÇ 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, J-Gate, ROOT INDEXING, TÜBİTAK ULAKBİM TR Dizin Türk Medline ve Türkiye Atıf Dizini 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 / yusuf.ozbel@gmail.com

Açık Erişim Politikası

Dergide açık erişim politikası uygulanmaktadır. Açık erişim politikası Budapest Open Access Initiative (BOAI) <http://www.budapestopenaccessinitiative.org/> kuralları esas alınarak uygulanmaktadır.

Açık Erişim, "[hakem değerlendirmesinden geçmiş bilimsel literatürün], İnternet aracılığıyla; finansal, yasal ve teknik engeller olmaksızın, serbestçe erişilebilir, okunabilir, indirilebilir, kopyalanabilir, dağıtılabılır, basılabilir, taranabilir, tam metinlere bağlantı verilebilir, dizinlenebilir, yazılıma veri olarak aktarılabilir ve her türlü yasal amaç için kullanılabilir olması"dır. Çoğaltma ve dağıtım üzerindeki tek kısıtlama yetkisi ve bu alandaki tek telif hakkı rolü; kendi çalışmalarının bütünlüğü üzerinde kontrol sahibi olabilmeleri, gerektiği gibi tanınmalarının ve alıntılanmalarının sağlanması için, yazarlara verilmelidir.

Baskı İzinleri

CC BY-NC-ND lisansı altında yayınlanan materyalin ticari amaçlı kullanım (satış vb.) için telif hakkı sahibi ve yazar haklarının korunması için izin gereklidir. Baskı izinleri için başvurular Editör ofisine yapılmalıdır.



AIMS AND SCOPE

Turkish Journal of Parasitology (Turkiye 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 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, J-Gate, ROOT INDEXING, TUBITAK ULAKBIM TR, Turkish Medline and Turkish Citation 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://turkiyeparazitolderg.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://turkiyeparazitolderg.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 Özbel, 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 / yusuf.ozbel@gmail.com

Open Access Policy

This journal provides immediate open access to its content on the principle that making research freely available to the public supports a greater global exchange of knowledge.

Open Access Policy is based on the rules of the Budapest Open Access Initiative (BOAI) <http://www.budapestopenaccessinitiative.org/>. By "open access" to peer-reviewed research literature, we mean its free availability on the public internet, permitting any users to read, download, copy, distribute, print, search, or link to the full texts of these articles, crawl them for indexing, pass them as data to software, or use them for any other lawful purpose, without financial, legal, or technical barriers other than those inseparable from gaining access to the internet itself. The only constraint on reproduction and distribution, and the only role for copyright in this domain, should be to give authors control over the integrity of their work and the right to be properly acknowledged and cited.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.



YAZIM KURALLARI

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 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 biçimlendirilmiştir. Türkiye Parazitoloji Dergisi'nin editöryel ve yayın süreçleri, "[Principles of Transparency and Best Practice in Scholarly Publishing \(doaj.org/bestpractice\)](#)" ilkelerine uygun olarak yürütülmektedir.

Özgünlük, yüksek bilimsel kalite ve atıf 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 verilmemesi için yapılmış olanlar açık olarak makalede belirtilmelidir.

Bütün makalelerin benzerlik tespiti denetimi, iThenticate yazılımı aracılığıyla yapılmaktadır.

Yayın Kurulu, dergimize gönderilen çalışmalar hakkındaki intihal, atıf 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 katkılarının 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 lütuf yazarlığın 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,

YAZIM KURALLARI

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 Editöryel 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 kararı 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.turkiyeparazitolderg.org adresinden erişebileceğiniz 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 yayınlanmış 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 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, tanısal 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.turkiyeparazitolderg.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 hazırlanmamış 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.turkiyeparazitolderg.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 amacını taşımaktadır. Yazarları, dergi tarafından seçilip davet edilir. Özet, anahtar sözcük, tablo, şekil, resim ve diğer görseller kullanılmaz.



YAZIM KURALLARI

Derleme: Yazının konusunda birikimi olan ve bu birikimleri uluslararası literatüre yayın ve atıf sayısı olarak yansıtmış 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 numaralandırılmıdır. 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 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, asteriskler 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 özette 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 sıraylanıma 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, Zieskiewicz 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.

YAZIM KURALLARI

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](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 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 / yusuf.ozbel@gmail.com



INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Turkish Journal of Parasitology (Turkiye Parazitoloj 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 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).

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) 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). 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
1. Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; AND
1. Final approval of the version to be published; AND
1. 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://turkiyeparazitolderg.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

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

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://turkiyeparazitolderg.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.

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://turkiyeparazitolderg.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://turkiyeparazitolderg.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.



INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

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

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

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

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*. 34th 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: Bengisson 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 Özbel, 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 / yusuf.ozbel@gmail.com



İÇİNDEKİLER/CONTENS

ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / ORIGINAL INVESTIGATIONS

- 1 Evaluation of Malaria Cases Detected in Antalya Province between 2012 and 2017
Antalya İlinde 2012-2017 Yılları Arasında Saptanan Sıtma Olgularının Değerlendirilmesi
Önder Ser; Antalya, Turkey
- 7 Afrika Uyku Hastalığı Etkeni *Trypanosoma brucei rhodesiense* ve Amerika Chagas Hastalığı Etkeni *Trypanosoma cruzi*'nin Farklı Besiyerlerinde Üretilmesi ve Yeni Besiyerinin Denenmesi
The Production of *Trypanosoma brucei rhodesiense*, Cause of African Sleeping Sickness, and *Trypanosoma Cruzi*, Cause of American Chagas Disease, on Different Medias and Testing a New Media
Ahmet Özbilgin, İbrahim Çavuş, Alicem Nuraydın, Yener Özel; Manisa, Türkiye
- 12 Pentavalent Antimonial Bileşiklere Dirençli Vahşi *Leishmania* İzolatlarının Leishmaniasis Tedavisinde Kullanılan İlaçlara Karşı *in vitro* Dirençlerinin Karşılaştırılması
Comparison of *in vitro* Resistance of Wild *Leishmania* Isolates, Which are Resistant to Pentavalent Antimonial Compounds, Against Drugs Used in the Treatment of Leishmaniasis
Ahmet Özbilgin, İbrahim Çavuş, Tuğba Kaya, Ahmet Yıldırım, Mehmet Harman; Manisa, Hatay, Diyarbakır, Türkiye
- 17 Presence of *Toxocara* spp. and Other Zoonotic Parasites Ova in Children's Playground in Karaman, Turkey
Türkiye'nin Karaman İlinde Çocuk Oyun Parklarında *Toxocara* spp. ve Diğer Zoonoz Parazitlerin Yumurtalarının Varlığı
Mehmet Fatih Aydın; Karaman, Türkiye
- 21 *Demodex* Kaynaklı Blefarit Olguları
Blepharitis Caused by *Demodex*
Mehtap Demirkazık, İsmail Soner Koltaş; Adana, Türkiye
- 25 Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde 2006-2018 Yılları Arasında Saptanan Patojenik Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı
The Distribution of Pathogenic Intestinal Parasites in Sivas Cumhuriyet University Faculty of Medicine Research and Application Hospital between 2006-2018
Ahmet Duran Ataş; Sivas, Türkiye
- 31 Antihelmintik Aktivite için Bir Model Organizma: *Caenorhabditis elegans* ve *Nigella sativa*
A model Organism for Antihelminthic Activity: *Caenorhabditis elegans* and *Nigella sativa*
Necati Özpinar; Hatay, Türkiye
- 36 Sağlıklı Sığırlarda *Enterocytozoon bieneusi*'nin Moleküler Prevalansı ve Filogenetik Karakterizasyonu
Molecular Prevalence and Phylogenetic Characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in Healthy Cattle
Tuğba Bilgin, Sadullah Usluğ, Gupse Kübra Karademir, Mübeccel Okur, Gamze Yetişmiş, Alparslan Yıldırım; Kayseri, Türkiye



İÇİNDEKİLER/CONTENS

- 43 **Molecular Characterization and Phylogenetic Analyses of *Oestrus ovis* Larvae Causing Human Nasopharyngeal Myiasis Based on CO1 Barcode Sequences**
İnsan Naso-pharyngeal Myiasis'ine Neden Olan *Oestrus ovis* Larvalarının CO1 Barkod Sekanslarına Göre Moleküler Karakterizasyonu ve Filogenetik Analizi
Gupse Kübra Karademir, Sadullah Usluğ, Mübeccel Okur, Abdullah İnci, Alparslan Yıldırım; Kayseri, Turkey
- 48 **Hatay'da Göç Öncesi ve Sonrası Saptanan Kutanöz Leishmaniasis Olgularının Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Genotiplendirilmesi**
Genotyping of Cutaneous Leishmaniasis Cases Detected Before and After Migration with Real-Time Polymerase Chain Reaction in Hatay
Gülnoz Çulha, Tuğba Kaya, Asena Çiğdem Doğramacı; Hatay, Türkiye

DERLEME / REVIEW

- 52 **Changes in the Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Northeastern Iran**
Kuzeydoğu İran'da Kutanöz Leishmaniasisin Epidemiyolojisindeki Değişimler
Bibi Razieh Hosseini Farash, Seyed Ali Akbar Shamsian, Masoud Mohajery, Abdolmajid Fata, Fatemeh Sadabadi, Fariba Berenji, Pietro Mastroeni, Elham Poustchi, Elham Moghaddas, Ghodrattollah Salehi Sangani, Gholamreza Farnoosh; Mashhad, Tehran, Iran, Cambridge, United Kingdom

OLGU SUNUMLARI / CASE REPORTS

- 58 ***Enterobius vermicularis* Infestation Mimicking Rectal Malignancy**
Rektal Maligniteyi Taklit Eden *Enterobius vermicularis* Enfestasyonu
Ozan Akıncı, Nuray Kepil, Yusuf Ziya Erzin, Abdullah Kağan Zengin; Hakkari, İstanbul, Turkey
- 61 **A Rare Cause of Hemoptysis: Oropharyngeal Leech**
Nadir Bir Hemoptizi Nedeni: Orofaringeal Sülük
İdris Çıldır; Karaman, Turkey
- 64 **Bir Kaplumbağada (*Testudo graeca*) *Angusticaecum holopteron* (Rudolphi, 1819) Olgusu**
A Case of *Angusticaecum holopteron* (Rudolphi, 1819) in a Turtle (*Testudo graeca*)
Ceylan Ceylan, Bilal Dik, Onur Ceylan; Konya, Türkiye



EDİTÖRDEN

Bu sayımızı, Aralık 2019'da Çin'in Wuhan kentinde başlayıp şu anda 155 ülkeyi etkisi altına alarak 200 binden fazla olguya, 10 bine yakın ölüme yol açan yeni tip Coronavirüs'ün sebep olduğu COVID-19 hastalığı ile hem küresel hem de ulusal boyutta yürütülen mücadele günlerinde çıkartıyoruz. Şimdiye kadar görülmemiş bir şekilde Avrupa ve Türkiye'deki tüm okullar ve üniversiteler kapatıldı, insandan insana bulaş nedeniyle kişilerin birbirinden uzak durması ve evlerinden çıkmamaları gerekiyor. Avrupa ülkelerinde başlatılan tüm ülke karantinasının ülkemize de gelmek üzere olduğunu düşünüyoruz.

Bu sayımızda, dokuz özgün araştırma makalesi, bir derleme ve üç olgu sunumu olmak üzere 13 makale ile çıkarmaktayız. Özgün araştırmalar arasında; Antalya ilinde geriye dönük sıtma olgularının incelenmesi, leishmaniasis tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı direnç durumunun belirlenmesi, çocuk oyun alanlarında Toxocara yumurtalarının varlığının incelenmesi, sağlıklı sığırlarda E. bienewisi'nin prevalansının belirlenmesi ve bir myiasis larvasının moleküler karakterizasyonunun yapılması gibi konularda gerçekleştirilen çalışmalar yer almaktadır.

Derleme makalemizde ise İran'da kutanöz leishmaniasisin değişen epidemiyolojisi konusu ele alınmıştır. Olgu sunumlarında ise ilginç bulacağınızı düşündüğümüz üzere üç farklı konuda olguya detaylı olarak yer verilmiştir.

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

Evaluation of Malaria Cases Detected in Antalya Province between 2012 and 2017

Antalya İlinde 2012-2017 Yılları Arasında Saptanan Sıtma Olgularının Değerlendirilmesi

Önder Ser

Antalya Provincial Directorate of Health, Public Health Laboratory, Antalya, Turkey

Cite this article as: Ser Ö. Evaluation of Malaria Cases Detected in Antalya Province between 2012 and 2017. Türkiye Parazitoloj Derg 2020;44(1):1-6.

ABSTRACT

Objective: Malaria is an important infectious disease that is transmitted by female mosquitoes of the genus *Anopheles* infected with parasites of the genus *Plasmodium*. In this research, it was aimed to contribute to the ongoing studies on malaria control in Antalya.

Methods: In this study, malaria data between 2012-2017 obtained from Antalya Provincial Directorate of Health were used. The patients with malaria were evaluated in terms of the years and months they were detected in, age group, gender, parasite species which were detected and their sources.

Results: During the 6-year period, a total of 1905 blood samples were surveyed and 36 (1.89%) patients were reported. The most patients occurred in June and August (5 patients in each month, 13.89%). Of the patients, 94.44% (34 patients) were 15 years old and over. By gender, 83.33% (n=30) of patients were male, 16.67% (n=6) were female. The disease agent responsible for most of the patients with malaria was *P. falciparum* (80.55%, 29 patients), followed by *P. vivax* (11.11%, 4 patients), *P. ovale* (5.56%, 2 patients) and *P. malariae* (2.78%, 1 patient). All patients with malaria were from abroad.

Conclusion: For malaria control, studies on the early diagnosis and treatment of the disease and the integrated mosquito control programs should be uninterruptedly maintained.

Keywords: *Anopheles*, Antalya, epidemiology, malaria, *Plasmodium*

ÖZ

Amaç: Sıtma, *Plasmodium* cinsi parazitlerle enfekte olmuş *Anopheles* cinsi dişi sivrisinekler tarafından bulaştırılan önemli bir enfeksiyon hastalığıdır. Bu araştırmada, Antalya ilinde sıtma mücadelesine yönelik sürdürülecek çalışmalara katkı sunulması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Bu çalışmada, Antalya İl Sağlık Müdürlüğü'nden elde edilen 2012-2017 yıllarına ait sıtma verileri kullanılmıştır. Sıtma olguları yıllara, aylara, yaş gruplarına, cinsiyete, parazit türlerine ve kaynaklarına göre değerlendirilmiştir.

Bulgular: Altı yıllık bu dönemde, toplam 1905 kan örneği incelenmiş ve 36 (%1,89) sıtma olgusu rapor edilmiştir. Olguların en fazla Haziran ve Ağustos aylarında [(beşer olgu %13,89)] meydana geldiği görülmüştür. Olguların %94,44 oranında (34 olgu) 15 yaş ve üzeri kişilerde görüldüğü tespit edilmiştir. Olguların %83,33'ü (30 olgu) erkek, %16,67'si (6 olgu) kadındır. Sıtma olgularının çoğundan sorumlu hastalık etkeni *P. falciparum* (%80,55, 29 olgu) olup, bunu *P. vivax* (%11,11, 4 olgu), *P. ovale* (%5,56, 2 olgu) ve *P. malariae* (%2,78, 1 olgu) takip etmektedir. Sıtma olgularının tamamı yurt dışı kaynaklıdır.

Sonuç: Sıtmanın kontrolü için, hastalığın erken tanı ve tedavisine yönelik çalışmaların ve entegre sivrisinek mücadelesinin kesintisiz olarak sürdürülmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Anopheles*, Antalya, epidemiyoloji, sıtma, *Plasmodium*

INTRODUCTION

Malaria is the most important vector-borne infectious disease that significantly affects community health throughout history. The disease, which is common in tropical and subtropical regions, is caused by

genus *Plasmodium*, one-celled intracellular protozoan parasites (1). Malaria parasites that cause disease in humans throughout the world are *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* and *P. knowlesi*. *Plasmodium falciparum*, which is common in Africa, causes the most severe and most fatal malaria cases.



Received/Geliş Tarihi: 11.06.2019 Accepted/Kabul Tarihi: 13.11.2019

Address for Correspondence/Yazar Adresi: Önder Ser, Antalya Provincial Directorate of Health, Public Health Laboratory, Antalya, Turkey
Phone/Tel: +90 242 346 64 68 E-mail/E-Posta: onderser62@hotmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0002-0615-4962

Plasmodium vivax is the most common species worldwide, but is less dangerous. *Plasmodium malariae*, *P. ovale* and *P. knowlesi* are less common species than the others (2).

Malaria parasites are transmitted from one human to another by a female mosquito of the genus *Anopheles* who has sucked blood from a person infected with parasites of the genus *Plasmodium*. In addition, it is known that these parasites can pass from a pregnant woman to her fetus and they can also be transmitted by blood transfusion, organ transplantation and contaminated medical materials (3-5).

Around 70 species of *Anopheles*, which are represented by approximately 470 species in the worldwide, are capable of transmitting human malaria parasites, of which about 40 species are known to be the dominant vector of malaria parasites (6,7). *Anopheles sacharovi* and *An. superpictus* are the major vectors in malaria transmission in Turkey (2,8).

According to 2017 malaria report of the World Health Organization (WHO); In 2016, an estimated 216 million cases of malaria were detected globally and approximately 90% of cases were reported in the WHO African Region. Indigenous malaria cases from 91 countries were reported in 2016. It is indicated that an estimated 445 thousand deaths from malaria occurred worldwide in 2016 and 91% of deaths occurred in the WHO African Region. 80% of global malaria burden and deaths occurred in 15 countries, all of which, excluding India, are sub-Saharan African countries. *Plasmodium falciparum* is the most common malaria parasite in sub-Saharan Africa, constituting 99% of estimated malaria cases in 2016 (9).

Clinical features of malaria vary with parasite species, parasitemia level and patient's immune status. Following the bite by an infected female mosquito of the genus *Anopheles*, an incubation period of 7-30 days begins. After this period, non-specific symptoms such as malaise, fatigue, nausea, vomiting, anorexia, headache, myalgias and joint pain lasting several days is seen. Then, the typical malaria paroxysms begin with chills, rigors, high fever and sweating (4,10).

Examination of thin and thick blood smears by a light microscope is accepted as the gold standard for the diagnosis of malaria parasites. At the same time, various rapid diagnostic tests are frequently used to assist with microscopic diagnosis or in field surveys where there is no microscopic diagnosis. In addition to these methods, serologic diagnostic methods and molecular diagnostic methods such as polymerase chain reaction (PCR) are used in the diagnosis of malaria parasites (11,12).

Artemisinin-based combined therapy is particularly effective for the treatment of uncomplicated malaria cases caused by *P. falciparum*. Although there are a number of research projects aimed at developing vaccines against especially *P. falciparum*, there is still no licensed available vaccine that can protect people from malaria parasites (13,14).

There are two main strategies for the control of malaria. The first strategy is the control of vector mosquitoes, the second is the early diagnosis and treatment of patients. Furthermore, people who will travel to the countries where the malaria is endemic should be informed about the disease and prevention methods. Also, it is necessary to give chemoprophylaxis against malaria parasites and provide personal protective measures (such as the use of mosquito nets and repellent products) against mosquitoes to these people (1,2).

Antalya province, the fifth most populated city in Turkey in terms of population, is an important tourism and agricultural center. In this study, it was aimed to evaluate the general condition of malaria cases in Antalya province and to contribute to the ongoing studies on malaria control.

METHODS

In this study, malaria data between 2012 and 2017 obtained from Antalya Provincial Directorate of Health were used. In this period, blood samples were taken by using active and passive surveillance methods for the diagnosis of malaria in Antalya province. The laboratory diagnosis of blood samples was made by the Antalya Provincial Directorate of Health, Public Health Laboratory. In the laboratory, thin smear and thick drop blood preparations were stained with Giemsa and examined under a light microscope. Furthermore, the blood samples were investigated by rapid diagnostic tests. Blood samples that were difficult to diagnose were sent to Microbiology Reference Laboratory in Ankara for confirmation. In this center, in addition to both methods, detection and species identification of malaria parasites were carried out using the molecular diagnosis method (PCR). Malaria cases diagnosed in this way were evaluated retrospectively according to years, months, age groups, genders, parasite species and their sources. The ethics committee approval was not obtained due to the retrospective nature of the study.

RESULTS

According to the data obtained, a total of 1905 blood samples were examined for the diagnosis of malaria in the six-year period between 2012 and 2017 in Antalya province. In 36 of them, malaria parasite was found and the rate of positivity was 1.89%. By gender, while 83.33% (30 cases) of malaria cases were male, 16.67% (six cases) were female. The disease agent responsible for most of the malaria cases was *P. falciparum* (80.55%, 29 cases), followed by *P. vivax* (11.11%, four cases), *P. ovale* (5.56%, two cases) and *P. malariae* (2.78%, one case). Two of the three cases of *P. vivax* were seen as recurrence from the same patient (Table 1).

Malaria cases detected in between 2012 and 2017 were in the 4-71 years age range and 94.44% of the cases (34 cases) were found in people 15 years old and over. While no positive case was detected in 0-1 and 10-14 age groups, one case was detected in each of the 1-4 and 5-9 age groups (Table 2).

All of the detected malaria cases in Antalya province between 2012 and 2017 were from abroad and no indigenous cases of malaria were observed in this period. It was determined that 35 (97.22%) of the patients had a travel history to African countries and one (2.78%) to India or they came from these countries (Table 3). 31 of malaria patients (86.11%) are citizens of the Republic of Turkey, these patients consist of individuals who have gone to African countries to work or individuals in their families. The remaining five (13.89%) patients are citizens of the following countries; Tanzania (two), Democratic Republic of the Congo (one), Cameroon (one) and Chad (one), these people came to Turkey for work and holidays.

Examination of the distribution of malaria cases by months showed that the most cases occurred in June and August, in

Table 1. The number of examined blood samples, the number of positive cases, the distribution of cases by gender, and the species of parasites according to years in Antalya between 2012 and 2017

Years	The number of examined blood samples	The number of positive cases	The distribution of cases by gender		The species of parasites			
			Male	Female	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>
2012	1269	9	7	2	6	3*	0	0
2013	340	3	3	0	3	0	0	0
2014	126	5	3	2	4	0	1	0
2015	36	9	7	2	7	0	1	1
2016	85	4	4	0	4	0	0	0
2017	49	6	6	0	5	1	0	0
Total	1905	36	30	6	29	4	2	1

*Two of the three cases of *P. vivax* were seen as recurrence from the same patient

Table 2. Distribution of examined blood samples and positive cases by age groups and years in Antalya between 2012 and 2017

The number of examined blood samples and positive cases by years		Age groups					Total
		0-1	1-4	5-9	10-14	15+	
2012	The number of examined blood samples	0	12	22	21	1214	1269
	The number of positive cases	0	1	1	0	7	9
2013	The number of examined blood samples	0	1	4	0	335	340
	The number of positive cases	0	0	0	0	3	3
2014	The number of examined blood samples	1	0	0	0	125	126
	The number of positive cases	0	0	0	0	5	5
2015	The number of examined blood samples	1	4	1	0	30	36
	The number of positive cases	0	0	0	0	9	9
2016	The number of examined blood samples	0	0	0	1	84	85
	The number of positive cases	0	0	0	0	4	4
2017	The number of examined blood samples	0	0	1	2	46	49
	The number of positive cases	0	0	0	0	6	6
Total	The number of examined blood samples	2	17	28	24	1834	1905
	The number of positive cases	0	1	1	0	34	36

Table 3. Distribution of the parasites responsible for malaria cases according to their sources and years in Antalya between 2012 and 2017

Source of parasites	Years						Total
	2012	2013	2014	2015	2016	2017	
Democratic Republic of the Congo	2			1			3
Ghana	4	2					6
Nigeria	2		1	2			5
Liberia	1						1
Gabon		1			1		2
Equatorial Guinea			2	1			3
Burkina Faso			1				1
Mali			1				1
Tanzania				2	2		4
Uganda				1			1
Cameroon				1			1
Niger				1			1
Kenya					1		1
Sierra Leone						2	2
Ivory Coast						1	1
Ethiopia						1	1
India						1	1
Chad						1	1
Total	9	3	5	9	4	6	36

which there were five cases each (13.89%). The lowest number of cases occurred in March, October and December in which there was one case each (2.78%). However, malaria cases have been observed in all months during the six-year period. According to seasons, the most cases were found in summer (13 cases) followed by autumn and winter (eight cases for each one) and spring (seven cases) (Figure 1).

DISCUSSION

All of the detected malaria cases in Antalya province between 2012 and 2017 were from abroad which means that no indigenous malaria cases were observed in this period. The last indigenous case of malaria in Antalya province was reported in 2008 (1). All of the detected malaria cases have been imported cases since 2009. Similarly, indigenous cases of malaria were not reported in Turkey in 2010 and 2011. However, in 2012, the malaria epidemic occurred in Savur district of Mardin province, located in the Southeastern Anatolia Region of Turkey (15). According to WHO data, Turkey is currently among the countries that do not have indigenous malaria cases (9). It is thought that this positive development in terms of malaria result from depending on the progress in the health sector in Turkey the development of services for early diagnosis and treatment of the disease and effective vector control activity carried out by the Ministry of Health and municipalities (1,16). However, lack of an effective vaccine to protect people from malaria parasites, development of resistance in parasites against some drugs used in the treatment and development of resistance in mosquitoes to many insecticides used for vector control are serious risks for malaria control. Beside, increasing travel abroad for business, tourism and educational purposes due to the ease of transportation and large numbers of migrants arriving in our country due to the wars in our region are other important risk factors. In addition, there is a risk of malaria in our country which should not be ignored due to some factors such as many regions of Turkey have suitable ecological features for *Anopheles* mosquitoes and important effects of global warming and climate changes on vector and parasites (16-20).

In this study, *P. falciparum* was the causative agent of the vast majority of malaria cases (80.55%). In accordance with our results, in the study performed in Elazığ province, the disease agent in 15 (88%) of 17 malaria cases detected in the years 2011-

2017 were *P. falciparum*, the other two (12%) were *P. vivax*. All of these cases were imported and the majority of patients had a travel history to African countries (20). Similarly, in the studies carried out in recent years in Bursa, Hatay and Manisa provinces, it has been reported that *P. falciparum* was responsible for the vast majority of malaria cases and patients had a travel history especially to African countries (19,21,22). In our study, it is thought that *P. falciparum* is high rate of causative agent among malaria cases due to the fact that all of the cases are from abroad and these patients had a travel history to African countries where the most common cases of malaria by *P. falciparum* are found in throughout the world or they came from these countries to Antalya. In the previous study in Antalya province, 66 malaria cases were detected between 2001 and 2011 and the species of parasite responsible for the disease in 57 (86%) of these cases was *P. vivax* and in nine (14%) was *P. falciparum* (1). Similarly, in previous studies in Adana, Mersin and Şanlıurfa provinces, *P. vivax* was responsible for the majority of malaria cases (18,23,24). The findings of these studies are different from the findings obtained from our study. It was reported that most cases were seen in Southeastern Anatolia Region and Çukurova basin of Mediterranean Region in the years which found indigenous cases of malaria in Turkey (4). *Plasmodium vivax* was the parasite species responsible for the indigenous malaria cases in our country in this period, but imported malaria cases caused by *P. falciparum* have been frequently seen in recent years (2). In the light of this information, it is understandable to see difference between findings of our study and above studies. Because above studies were conducted in the period of the indigenous cases of malaria in Turkey. In addition, most of the detected cases in above studies were indigenous cases that caused by *P. vivax*.

Although malaria affects both males and females without considering gender differences, the majority of malaria patients (83.33%) were males in our study. In the previous study conducted on the epidemiology of malaria in Antalya province between 2001 and 2011, a large majority (74%) of the cases was males (1). In addition, the results of similar studies in Bursa (two studies), Çorum, Elazığ, Hatay, İstanbul, Kayseri, Kocaeli, Manisa and Mersin provinces were found to be consistent with the results of our study (10,17,19-23,25-27). This situation can be attributed to the higher rate of males among Turkish citizens that have gone to countries where malaria is seen as endemic, especially from Antalya province for business, or among foreign nationals who come from these countries for business and tourism purposes.

When the malaria cases in our study were examined according to age groups, it was seen that 94.44% (34 cases) of the cases were in people 15 years old and over group. In the previous study conducted in Antalya province, 52 (78.8%) of 66 malaria cases between 2001 and 2011 were reported to be in the 15 years old and over (1). Likewise, most of the malaria cases in the studies carried out in Adana, Bursa (two studies), Çorum, Hatay, Kayseri, Manisa, Mersin and Şanlıurfa provinces were reported to be in the 15 years old and over group (10,17-19,21-24,26). This situation is thought to be because of the fact that individuals in the 15

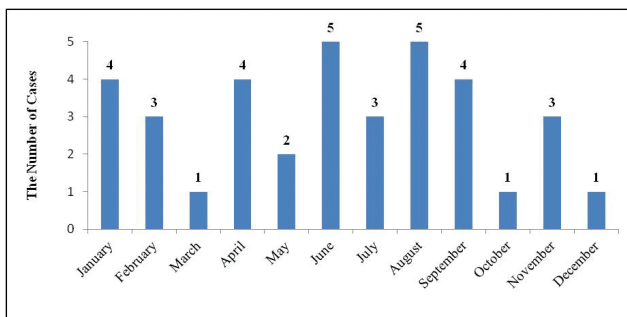


Figure 1. Distribution of malaria cases by months in Antalya between 2012 and 2017

years old and over group travel more for business, education and tourism purposes, and they stay longer in outdoor areas compared to the other age groups during the active hours of mosquitoes.

There was a seasonal distribution of malaria cases in Turkey in the years of occurrence of indigenous malaria cases, depending on the climatical characteristics of our country. In these years, malaria cases were mostly seen in the period between April and November, when mosquitoes were active seasonally, especially in summer and autumn, while the least cases were seen in winter (4,16). In addition, people spend more time in outdoor environments and travels also increase in these months (1,23). In the previous study conducted in Antalya province, malaria cases were detected the highest in September (17 cases, 25.8%) and the least in February (one case, 1.5%) between 2001 and 2011. The seasonal distribution of cases was seen as follows, autumn (27 cases), summer (18 cases), spring (13 cases) and winter (eight cases), respectively (1). It was reported that the least cases were found in winter in the studies carried out in Adana (2002-2012), Mersin (2002-2011) and Şanlıurfa (2001-2011) provinces where indigenous malaria cases were detected intensively (18,23,24). Since the indigenous malaria cases have not been seen and all of cases have been imported from abroad, the seasonal distribution of malaria cases has been partially altered in Turkey in recent years. Currently, the seasonal distribution of malaria cases is thought to be dependent on international travel to countries where malaria is endemic. It is seen that the results of our study are compatible with this situation. For these reasons, it should be kept in mind malaria cases can be found throughout the year, and especially in winter months, patients who apply to health institutions with complaint of fever and with a travel history to countries where malaria is endemic should be evaluated in terms of malaria.

CONCLUSION

As a result of effective studies for control of malaria in Antalya and throughout Turkey, indigenous cases of malaria have not been observed in recent years. However, the climate, nature and human activities in Antalya provide a suitable environment for mosquitoes. In addition, intense population mobility due to factors such as tourism, education and migration increases the risk of malaria. For malaria control, studies on the early diagnosis and treatment of the disease and the integrated mosquito control programs should be uninterruptedly continued. Furthermore, people who will travel to the countries where the malaria is endemic should be informed about the disease and prevention methods and should be provided chemoprophylaxis for these people by Republic of Turkey Ministry of Health, Directorate General of Health for Border and Coastal Areas, Travel Health Centers.

* Ethics

Ethics Committee Approval: The ethics committee approval was not obtained due to the retrospective nature of the study.

Informed Consent: Retrospective study.

Peer-review: Internally peer-reviewed.

Financial Disclosure: The author declares that this study received no financial support.

Acknowledgements: The author thanks the staff of Antalya Provincial Directorate of Health, Infectious Diseases Unit and Kepez District Directorate of Health, Malaria Unit for their help in obtaining of the data used in the study.

REFERENCES

1. Ser Ö, Çetin H. Evaluation of malaria cases in Antalya between 2001 and 2011. *Turkiye Parazitol Derg* 2012;36:4-8.
2. World Health Organization. World malaria report 2011. Geneva: WHO Press; 2011.
3. Verra F, Angheben A, Martello E, Giorli G, Perandin F, Bisoffi Z. A systematic review of transfusion-transmitted malaria in non-endemic areas. *Malar J* 2018;17:36.
4. Akdur R. Sıtma eğitim notları. Ankara: Cem Web Ofset Ltd Şti 1997.
5. Mejia GA, Alvarez CA, Pulido HH, Ramirez B, Cardozo C, Suárez Y, et al. Malaria in a liver transplant recipient: A case report. *Transplant Proc* 2006;38:3132-4.
6. Service M. Medical entomology for students. 5th ed. New York: Cambridge University Press; 2012.
7. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, et al. A global map of dominant malaria vectors. *Parasit Vectors* 2012;5:69.
8. Alten SB, Çağlar SS, Özer N. Malaria and its vectors in Turkey. *European Mosq Bull* 2000; 7: 27-33.
9. World Health Organization. World malaria report 2017. Geneva: WHO Press; 2017.
10. İnanç T, Kuk S, Yazar S. The epidemiology of malaria in Çorum between 2006 and 2011. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2012;18:A97-A99.
11. Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg* 2007;77:119-27.
12. Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S. Malaria diagnosis: A brief review. *Korean J Parasitol* 2009;47:93-102.
13. World Health Organization. A global brief on vector-borne diseases. Geneva: WHO Press; 2014.
14. World Health Organization. World malaria report 2016. Geneva: WHO Press; 2016.
15. Eskiocak M, Karababa AO, Ceylan A, Saka G, Çiçek M. Mardin-Savur ilçesi sıtma salgınına inceleme ve değerlendirme raporu. 1. baskı. Ankara: Türk Tabipleri Birliği Yayınları 2012. ISBN 978-605-5867-67-6.
16. Özbilgin A, Topluoglu S, Es S, Islek E, Mollahaliloğlu S, Erkoc Y. Malaria in Turkey successful control and strategies for achieving elimination. *Acta Trop* 2011;120:15-23.
17. Uyar Y, İnanç T, Serkan S, Kuk S, Yazar S. The epidemiology of Malaria in Kayseri between 2001 and 2013. *Turkiye Parazitol Derg* 2015;39:86-9.
18. Yentür-Doni N, Yıldız-Zeyrek F, Seyrek A, Şimşek Z, Gürses G, Topluoğlu S. Evaluation of epidemiological data of malaria between 2001-2011 in Sanliurfa, Turkey. *Mikrobiyol Bul* 2016;50:307-14.
19. Çulha G, Yıldız-Zeyrek F, Önlen Y, Yentür-Doni N. Determination of imported malaria cases in Hatay by the use of molecular methods. *Mikrobiyol Bul* 2018;52:206-13.

20. Sağmak-Tartar A, Akbulut A. Epidemiological, Clinical, and Laboratory Evaluation of Plasmodium falciparum Malaria Cases Followed in Fırat University Hospital: A 6-Year Retrospective Analysis. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2018;42:1-5.
21. Aksoy-Gökmen A, Pektaş B, Öncel K, Özdemir OA, Çavuş İ, Özbilgin A. The investigation of malaria cases in Manisa between 2008-2012. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2014;38:151-4.
22. Alver O, Ener B. The Epidemiology of Malaria in Bursa between 2013 and 2014. *Türk Hijyen ve Biyoloji Dergisi* 2018;75: 37-42.
23. Aydın MF, Sahin A. Malaria epidemiology in Mersin province, Turkey from 2002 to 2011. *Iranian J Parasitol* 2013;8:296-301.
24. Kuşçu F, Öztürk DB, Gül S, Babayiğit ML. The epidemiology of malaria in Adana between 2002 and 2012. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2014;38:147-50.
25. Arslan F, Mert A, Batirel A, Inan A, Balkan II, Nazlıcan O, et al. Imported Plasmodium falciparum malaria in Istanbul, Turkey: risk factors for severe course and mortality. *Trop Doct* 2013;43:129-33.
26. Alver O, Atıcı E, Göröl G. The epidemiology of malaria in Bursa-2009-2012. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2014;38:81-4.
27. Sargın-Altunok E, Aynioğlu A, Azak Karali E, Mutlu B, Willke A. Plasmodium falciparum malaria of foreign-origin in Kocaeli Province: Assessment of 16 cases. *Klinik Dergisi* 2016;29:86-89.

Afrika Uyku Hastalığı Etkeni *Trypanosoma brucei rhodesiense* ve Amerika Chagas Hastalığı Etkeni *Trypanosoma cruzi*'nin Farklı Besiyerlerinde Üretilmesi ve Yeni Besiyerinin Denenmesi

The Production of Trypanosoma Brucei Rhodesiense, Cause of African Sleeping Sickness, and Trypanosoma Cruzi, Cause of American Chagas Disease, on Different Medias and Testing a New Media

Ahmet Özbilgin, İbrahim Çavuş, Alicem Nuraydın, Yener Özel

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

Cite this article as: Özbilgin A, Çavuş İ, Nuraydın A, Özel Y. Afrika Uyku Hastalığı Etkeni *Trypanosoma brucei rhodesiense* ve Amerika Chagas Hastalığı Etkeni *Trypanosoma cruzi*'nin Farklı Besiyerlerinde Üretilmesi ve Yeni Besiyerinin Denenmesi. Türkiye Parazitoloj Derg 2020;44(1):7-11.

ÖZ

Amaç: Uyku hastalığı olarak da bilinen insan Afrika trypanosomiasisi, "*Glossina*"ların (çeçe sineği) insanı sokması ile bulaşan ve *Trypanosoma b. rhodosiense* ve *Trypanosoma b. gambiense*'nin etken olduğu bir parazit hastalığıdır. Parazit kültürleri, bilimsel çalışmalar için büyük önem arz etmektedir. Parazitin aksenik kültürlerde üretilmesi parazit biyokimyası, immünolojik, fizyolojik ve moleküler çalışmalarda büyük avantaj sağlamaktadır. Bu çalışmada *Trypanosoma b. rhodosiense* ve *Trypanosoma cruzi*'yi bol miktarda üretecek besiyerinin saptanması ve yeni bir besiyerinin oluşturulması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışmamızda, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Parazit Bankası'nda saklanan *Trypanosoma b. rhodosiense* ve *Trypanosoma cruzi* suşlarının, sıvı azot tankından uygun koşullar altında çıkarılarak Besiyeri 1, Besiyeri 2, Besiyeri 3 ve yeni geliştirilen besiyerine (4) ekimleri yapılmıştır. Besiyerlerindeki üreme yoğunlukları zamana bağlı olarak Thoma lamında sayılmış ve Sidak's multiple comparisons testi uygulanarak istatistiksel analizi yapılmıştır.

Bulgular: Bu çalışma sonucunda gerek tanı gerek etken madde taramalarında, moleküler çalışmalarda, metabolik analizlerde ve ilaç çalışmalarında kullanılacak *Trypanosoma b. rhodosiense* ve *Trypanosoma cruzi*'yi bol miktarda üretecek en iyi besiyerinin 4 No'lu besiyeri olduğu kanısına varılmıştır.

Sonuç: Bu çalışma, Türkiye'de *Trypanosoma* türlerinin üretilmesi ile ilgili yapılan ilk çalışmalardan biri olup Afrika Uyku hastalığı ve Chagas hastalığı ile etkenlerini çalışanlara temel oluşturmak amacıyla planlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Trypanosoma b. rhodosiense*, *Trypanosoma cruzi*, besiyeri, tripanosomiasis, Türkiye

ABSTRACT

Objective: Human African trypanosomiasis, also known as sleeping sickness, is a parasitic disease in which *Glossina* is transmitted by human intervention and *Trypanosoma b. rhodosiense* and *Trypanosoma b. gambiense* are the causative agents. Production of parasites in axenic cultures provides great advantage in parasite biochemistry, immunological, physiological and molecular studies. In this study, it is aimed to determine the medium which will produce in vigorous amount of *Trypanosoma b. rhodosiense* and *Trypanosoma cruzi* and to establish a new medium.

Methods: In this study, *Trypanosoma b. rhodosiense* and *Trypanosoma cruzi* strains stored in Manisa Celal Bayar University Parasite Bank will be removed from liquid nitrogen tank under suitable conditions, planted in Medium I, Medium II, Medium III and newly developed medium. Reproductive densities of the media will be statistically analyzed on Thoma lamina depending on the time, using the Sidak's multiplequality test.

Results: As a result of this study, it has been concluded that the best medium, to produce abundantly *Trypanosoma b. rhodosiense* and *Trypanosoma cruzi* strains, to be used in diagnosis and active substance screenings, molecular studies, metabolic analyzes and drug studies is the medium IV.

Conclusion: This study is one of the first studies related to the production of *Trypanosoma* species in Turkey and planned to provide a basis for the studies of African sleeping disease, Chagas disease and their agents.

Keywords: *Trypanosoma b. rhodosiense*, *Trypanosoma cruzi*, medium, trypanosomiasis, Turkey



Geliş Tarihi/Received: 22.11.2019 Kabul Tarihi/Accepted: 30.11.2019

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Yener Özel, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

Tel/Phone: +90 544 325 73 52 E-Posta/E-mail: yener_ozel@hotmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0001-6618-8251

GİRİŞ

Uyku hastalığı olarak da bilinen insan Afrika trypanosomiasisi, *Glossina*'ların (çeçe sineği) insanı sokması ile bulaşan *Trypanosoma brucei rhodesiense* ve *Trypanosoma brucei gambiense*'nin etken olduğu bir parazit hastalığıdır. *Trypanosoma brucei gambiense*, Batı ve Orta Afrika'da yer alan 24 ülkede görülmektedir. Afrika Uykusu hastalığı olarak bildirilen olguların %97'sinin etkenidir. *Trypanosoma brucei rhodesiense*, Doğu ve Güney Afrika'da yer alan 13 ülkede görülmektedir. Rapor edilen olguların %3'ünün etkenidir (1,2). Chagas hastalığı, Amerikan trypanosomiasisi olarak bilinen *Triatoma* cinsi böceklerin insanı sokması ile bulaşan ve *Trypanosoma cruzi*'nin etken olduğu bir parazit hastalığıdır. Genellikle vektör kaynaklı olarak 21 Latin Amerika ülkesinde görülmektedir. Dünya genelinde çoğu Latin olan 8 milyon insan enfekte durumdadır. Her yıl 10,000'den fazla insanın hayatını kaybettiği ve 25 milyondan fazla kişinin ise risk altında olduğu tahmin edilmektedir (3). Afrika Uykusu hastalığının ve Chagas hastalığının tanısında kullanılan özellikle serolojik testlerin az duyarlı olması enfeksiyonlarda yanlış tanıya yol açmaktadır. Etken parazitlerin bol miktarda üretilmesi amacı ile aksenik kültürlerde parazitlerin üretilmesi gereksinimi vardır. Parazit kültürleri, bilimsel çalışmalar için büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmada *Trypanosoma b. rhodesiense* ve *Trypanosoma cruzi*'yi kısa sürede ve bol miktarda üretecek besiyerinin saptanması ve yeni bir besiyerinin oluşturulması amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Besiyerlerinin Hazırlanması

Besiyeri 1: Temiz bir balon joje içinde 200 mL distile su ile 10 g Bacto et sığır ekstreği 55 °C'ye ayarlanmış su banyosunun içerisine 1 saat bekletilmiştir. Sonrasında 5 g Bacto pepton ve 1,4 g sodyum klorid eklenmiş ve pH 7,2'ye ayarlanmıştır. Karışım iki balon jojeye ayrılarak birine 1 g agar eklenmiş ve her iki karışımda 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Agar içeren besiyeri 50 °C'ye geldiğinde besiyeri içerisine 0,2 mL steril dekroz solüsyonu ve 5 mL tavşan kanı konulmuş ve steril cam tüplere içerisine 5 mL olacak şekilde yatık olarak katılaştırılmıştır. Cam tüp içerisinde donan besiyerinin katı formu üzerine 3 mL agar içermeyen sıvı formdaki besiyerinden eklenerek kullanılmaya hazır hale getirilmiştir.

Besiyeri 2: İki adet balon joje içinde 100 mL distile su içine 1,5 g Bacto triptose, 1 g liver broth, 0,2 g glukoz, 0,4 g sodyum klorid, 0,04 g potasyum klorid, 0,5 g sodyum fosfat tartılarak eklenmiş ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Besiyerinin katı fazını oluşturacak jojelerin birine ek olarak 0,2 g agar ilave edilmiştir. Agar içeren ve yaklaşık 50 °C'ye soğutulan besiyerine 15 mL at serumu ve 2 mL 1/3 oranında eritrosit ile hazırlanmış hemogloblin süspansiyonu eklenmiştir. Steril cam tüplere 5 mL dağıtılarak yatık olarak soğumaya bırakılmıştır. Besiyerinin sıvı fazı için agar içermeyen besiyerine 6 mL at serumu ve 0,8 mL hemogloblin solüsyonu ilave edilmiş ve cam tüp içerisinde donan besiyerinin katı formu üzerine 3 mL eklenerek kullanılmaya hazır hale getirilmiştir.

Besiyeri 3: Besiyerinin katı fazı için, temiz bir balon içerisine 0,3 g meat ekstrat, 0,5 g Bacto pepton, 0,8 g sodyum klorid ve 1,5 g agar 100 mL distile su içerisinde çözündürülmüş ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Yaklaşık 50 °C'ye soğutulan besiyerine 35 mL tavşan kanı eklenmiş ve steril cam tüplere 5

mL dağıtılarak yatık olarak soğumaya bırakılmıştır. Sıvı faz için ise, temiz bir balon içerisine 8 g sodyum klorid, 0,02 g potasyum klorid, 0,03 g monopotasyum fosfat, 0,02 g kalsiyum klorür ve 0,25 g glukoz 90 mL distile su içerisinde çözündürülerek pH 7,2-7,4 arasında ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Katı faz üzerine sıvı fazdan 3 mL eklenerek besiyeri kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Besiyeri 4: Temiz bir balon içerisine 0,3 g meat ekstrat, 0,7 g maya ekstrat, 0,3 g fruktoz, 0,4 g sodyum klorid, 0,3 g Bacto pepton ve 3 g agar 100 mL distile su ile çözündürülmüş ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Yaklaşık 50 °C'ye soğutulan besiyerine 10 mL tavşan kanı eklenmiş ve steril cam tüplere 5 mL dağıtılarak yatık olarak soğumaya bırakılmıştır. Besiyerlerini kullanmadan önce sıvı faz olarak RPMI 1640+ %10 fetal bovine serum içeren sıvı besiyerinden 3 mL eklenerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Besiyerlerinin Üreme Kapasitelerinin Karşılaştırılması

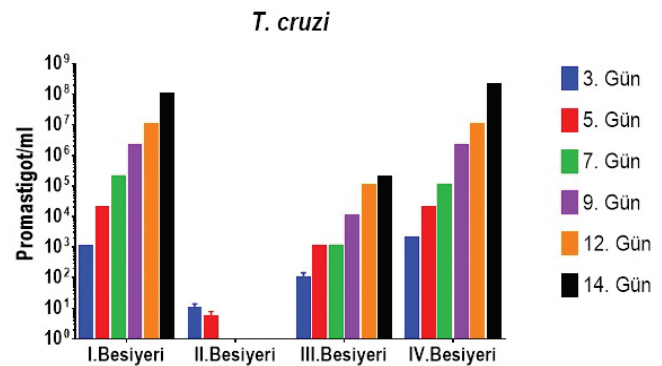
Manisa Celal Bayar Üniversitesi Parazit Bankası'nda sıvı azot tankında saklanan *Trypanosoma brucei rhodesiense* (ATCC PRA 407) ve *Trypanosoma cruzi* (ATCC 50825) suşları uygun koşullarda sıvı azot tankından çıkarılmıştır. Parazitler her bir besiyerinden 3 adet olmak üzere besiyerlerine ekimleri yapılarak *Trypanosoma brucei rhodesiense* suşu içeren besiyerleri 37 °C'lik etüve, *Trypanosoma cruzi* suşu içeren besiyerleri 27 °C'lik etüve inkübasyon için konulmuştur. Besiyerlerinde bulunan parazitlerin canlılık oranları 3., 5., 7., 9., 12. ve 14. günlerde Thoma lamı ile hesaplanarak besiyerlerinin üreme kapasiteleri karşılaştırılmıştır.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için Sidak's multiple comparisons testi uygulanmıştır.

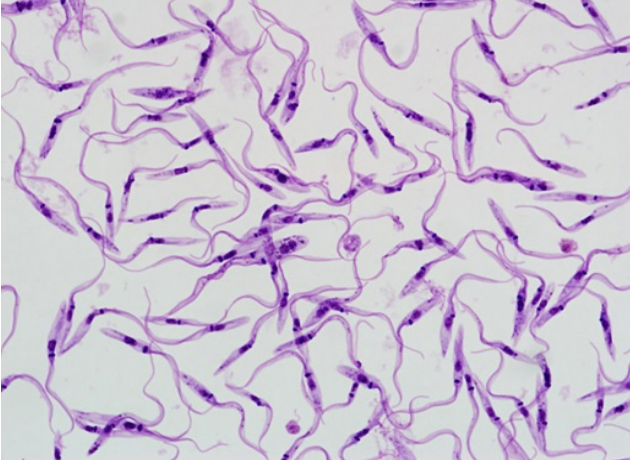
BULGULAR

Trypanosoma cruzi'de 2 no'lu besiyerinde parazitlerin canlılıklarını 7. güne kadar sürdürdükleri daha sonra amastigot haline dönüşerek öldükleri gözlenmiştir (Grafik 1). Birinci, 3. ve 4. besiyerlerinde ise parazitlerin 12. güne kadar hızla artarak epimastigot formunda üredikleri (Şekil 1 ve 2), 12. ve 14. günde ise amastigot haline dönüşerek üremedikleri görülmüştür (Şekil 3). Birinci, ve 4. besiyerinde epimastigotların hareketlerinin daha hızlı olduğu ve daha çok ürediği gözlenmiş. On ikinci ve 14.

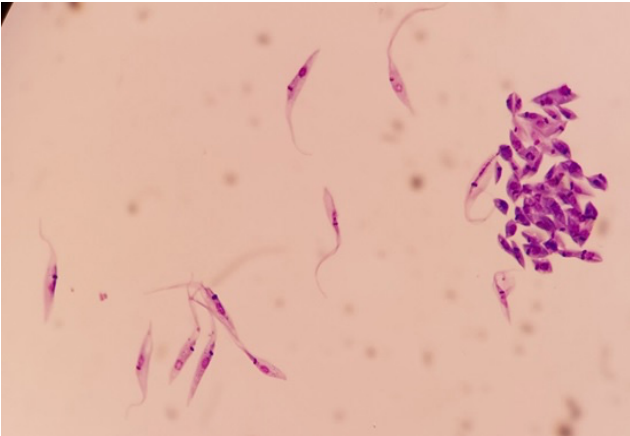


Grafik 1. *Trypanosoma cruzi* besiyerlerindeki üreme grafiği

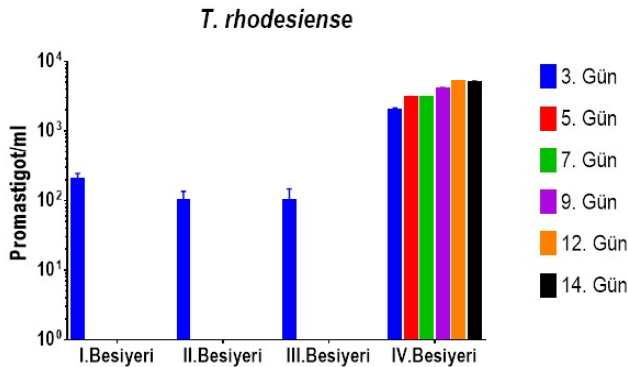
günde epimastigotların daha az sayıda amastigota dönüştüğü görülmüştür. *Trypanosoma b. rhodosiense*'de ise 1., 2. ve 3. besiyerlerine yapılan ekimlerde ilk 3 gün parazitlerin canlı kaldığı ancak üreme fazına girmedikleri daha sonra tripamastigot olarak öldüğü görülürken (Grafik 2), 4. besiyerinde ise 9. güne kadar üredikleri daha sonra 12. ve 14. günlerde üremelerini durdurarak tripamastigot formunda öldükleri saptanmıştır (Şekil 4).



Şekil 1. Besiyerinde üreyen giemsa ile boyalı *Trypanosoma cruzi* epimastigotları (X100)



Şekil 2. Besiyerinde 12. günde giemsa ile boyalı amastigot formuna dönüşmeye başlayan *Trypanosoma cruzi* epimastigotları (X100)



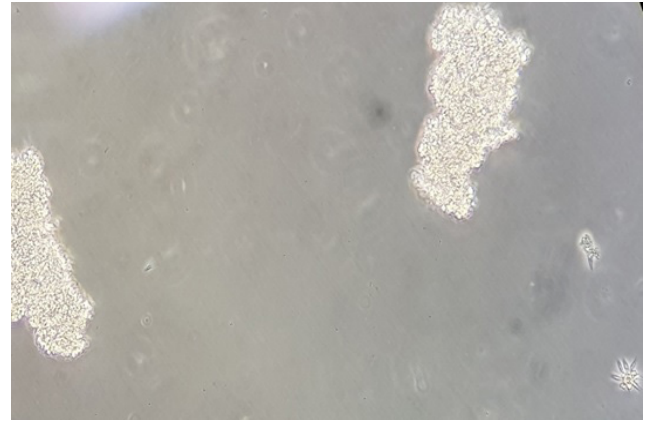
Grafik 2. *Trypanosoma brucei rhodosiense* besiyerlerindeki üreme grafiği

Trypanosoma b. rhodosiense ve *Trypanosoma cruzi* suşlarının Besiyeri 1, Besiyeri 2, Besiyeri 3 ve yeni geliştirilen (4) besiyerindeki üreme yoğunlukları zamana bağlı olarak Sidak's multiple comparisons testi uygulandığında;

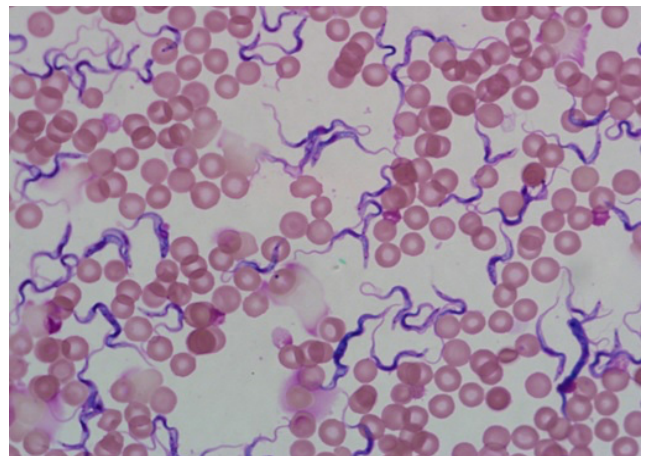
Trypanosoma cruzi için 1. günden 7. güne kadar her dört besiyerinde üreme hızı yönünden anlamlı bir fark görülememiştir ($p > 0,05$). Dokuzuncu ve 12. günlerde ise 1 no'lu besiyeri 2 no'lu ve 3 no'lu besiyerine göre, 4 no'lu besiyeri 2 no'lu besiyerine, Besiyeri 4 Besiyeri 3'e göre üreme yoğunluğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). On dördüncü gün ise Besiyeri 2 ve Besiyeri 3 dışındaki diğer besiyerilerindeki üreme yoğunluğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). *Trypanosoma b. rhodosiense* için ise 3. günde Besiyeri 2 ve Besiyeri 3 arasındaki üreme yoğunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken ($p > 0,05$), diğer besiyerleri arasında üremede anlamlı bir fark görülmüştür ($p < 0,05$). Beşinci, 7., 9., 12. ve 14. günlerde ise Besiyeri 1, Besiyeri 2, Besiyeri 3 ile Besiyeri 4 arasındaki üreme yoğunluğu istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p < 0,05$) diğerleri besiyerleri arasındaki üreme yoğunluğu anlamsız bulunmuştur ($p > 0,05$).

TARTIŞMA

Trypanosoma türlerinin kültürasyonunda, besiyeri ortamının standardizasyonu ve parazitin beslenme gereksinimleri ile



Şekil 3. Besiyerinde 14. günde amastigot formuna dönüşmüş boyasız *Trypanosoma cruzi* epimastigotları (X40)



Şekil 4. Besiyerinde üreyen giemsa ile boyalı *Trypanosoma b. rhodosiense* tripamastigotları (X100)

ilgili yeterli bilgi olmaması *in vitro* çalışmalarda zorluklar yaratmaktadır. Patojen özellikteki Afrika *trypanosomalarının* üretilmesinde denenen üç tip besiyerinde bir miktar başarı sağlanmıştır. Parazitler, kan içeren bifazik besiyerlerinde, hem besiyerinin sıvı fazında (4) hem de agar yüzeyinde koloni oluşturabilmektedirler (5). Parazitler, sıvı besiyerlerinde (6), sıklıkla kırmızı kan hücrelerin yüzeyinde toplanırlar. Ponselle ve Weinman tarafından biraz daha yoğun besiyerleri geliştirilmiştir. Ancak bu tip besiyerlerinde üremenin besiyerinin hangi bölgesinde olduğu belirtilmemiştir. Pek çok araştırmacı, tasarladıkları besiyerlerinin formülasyonunda insan kanı kullanmayı tercih etmiştir. Bu karşılık hayvan kanı kullanan araştırmacılar ise, bu kanın sürekli alt-kültürleri sürdürüp sürdürmeyeceği konusunda yeterli veriyi ortaya koyamamışlardır (7). *Brucei* grubunda bulunan türlerin üretilmesinin diğer *trypanosoma* türlerinden daha zor olduğu kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarla diğer *trypanosoma* türleri, çeşitli besiyerlerinde üretilmiş, beslenme kinetikleri ve metabolik özellikleri araştırılmıştır (8,9) fakat *T. brucei*'in üretilmesi konusunda yeterli başarı sağlanmadığı için çok az fizyolojik bilgi edinilmiştir.

Trypanosomatid türlerinin üretilmesi için kullanılan bazı besiyerlerinde (10,11), %10-30 oranında fetal buzağı serumu (FCS) kullanılmaktadır. FCS, yapısı tam olarak tanımlanmamış, değişken bir içeriğe sahip ve oldukça pahalı bir destekleyicidir. Birçok araştırmacı, FCS'ye alternatif olarak amino asitler, vitaminler, hormonlar ve sığır serum albümini gibi maddeleri besiyeri ortamına eklemiştir (12-14).

Trypanosoma brucei gambiense; *Trypanosoma brucei brucei* ve *Trypanosoma brucei rhodesiense* ile çok yakından ilişkili olmasına rağmen, sınırlı konak çeşitliliğinin olması, normal insan serumuna direnç göstermesi, insanda ve hayvan modellerinde farklı virülans özellikleri sergilemesi gibi temel mekanizmaları anlayamamış özelliklere sahiptir (15).

Trypanosoma brucei gambiense'nin kan dolaşımı formundaki tripomastigotların *in vitro* kültürasyonu için, çeşitli besiyeri bileşenleri, hayvan serumu, besleyici hücre katmanlarının ve bunların kombinasyonlarını kullanan çeşitli yöntemler tarif edilmiştir (16,17). Hirumi ve Hirumi (18) çalışmalarında, *T. Brucei*'nin sürekli kültürasyonu için (Hirumi'nin modifiye Iscove ortamı, HMI-9) aksenik besiyeri formülasyonu geliştirmişlerdir. Araştırmacılar, parazitlerin besiyerine uyum sağlama sürecinde, geniş çaplı bir hücre ölümüne uğradığını ve dolayısıyla sürekli kültürasyon öncesinde parazitlerin bir seleksiyona maruz kaldığını rapor etmişlerdir. Vassella ve Boshart (19), tarafından yapılan bir çalışmada sıvı aksenik kültürlerin aksine, katı HMI-9-agaroz plakları kullanılarak yapılan ilk kültürlerde parazitlerin büyük çaplı hücre ölümüne maruz kalmadığı bildirilmiştir.

Vassella ve ark. (20), yüksek molekül ağırlıklı ve düşük erime noktali agaroz veya metilselüloz içeren HMI-9 besiyerinin, çeşitli pleomorfik yapıdaki *T. b. brucei* suşlarında anormal hücre bölünmesi veya inhibisyon olmadan üreyebildiğini bildirmiştir. Ayrıca bu besiyeri kültürasyonu ve kriyostabilizasyon haricinde kan dolaşımı formundaki tripomastigotların dönüşümünde de etkilidir (21). Ancak, metilselüloz içeren besiyeri ortamında *T. b. gambiense*'in aksenik olarak *in vitro* kültürasyonu gerçekleştirilememiştir. Van Reet ve ark. (22), tarafından yapılan bir çalışmada, HMI-9 besiyerine metilselüloz ve insan serumu ilavesiyle non-gambiense ve gambiense suşlarının sürekli kültürasyonu araştırılmıştır. Araştırmacılar denenen besiyerinde *T. b. gambiense* dışındaki türlerin sıvı besiyerlerine göre daha iyi uyum sağladığını, *T. b. gambiense* suşlarının *in vitro* kültürasyonunda ise

insan serumunun kritik rol oynadığını bildirmişlerdir.

Chagas hastalığının tanısında kan kültürü ve ksenodiyagnoz gibi yöntemler oldukça spesifiktir ancak kronik Chagas hastalığında gözlenen düşük parazitemi nedeniyle bu testlerin duyarlılığı düşüktür (23). *T. rangeli*'nin periferik kanda doğrudan gösterimi ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır (24). Bu metodların tanısal duyarlılığı ile ilgili literatürde yeterli veri bulunmamaktadır. Serolojik testler yüksek duyarlılığa sahiptir ancak *T. cruzi* ve *T. rangeli* antijenlerinin %60'ı homoloji gösterdiği için özgüllükleri yoktur ve sıklıkla çapraz reaksiyona yol açmaktadır. Bu durum endemik bölgelerde Chagas hastalığının spesifik tanısını zorlaştırmaktadır (25).

Leishmania donovani'nin (26) *in vitro* üretilmesi ve morfolojik dönüşümü için besiyeri ortamına vektörün idrarında bulunan sodyum urat, ürik asit ve sisteik asidin eklenmesi, insan idrarının kullanımını da motive etmiştir. Ferreira ve ark. (27) yaptığı bir çalışmada, *T. cruzi* ve *T. Rangeli*'nin *in vitro* kültürasyonunda karaciğer infüzyonu triptoz ortamına insan idrarı ekleyerek besiyerinin performansını araştırmıştır. Araştırmacılar, hastalardan parazit izolasyonunda insan idrarının besiyeri duyarlılığını artırdığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen deneysel ve istatistiksel veriler incelendiğinde, gerek tanı gerek etken madde taramalarında, moleküler çalışmalarda, metabolik analizlerde ve ilaç çalışmalarında kullanılabilir, *Trypanosoma b. rhodosiense* ve *Trypanosoma cruzi*'yi kısa sürede ve bol miktarda üretecek en iyi Besiyerinin 4 no'lu Besiyeri olduğu kanısına varılmıştır.

SONUÇ

Afrika Uyku hastalığının ve Chagas hastalığının tanısında kullanılan özellikle serolojik testlerin az duyarlı olması enfeksiyonlarda yanlış tanıya yol açmaktadır. Bu hastalıkların doğru ve zamanında tanı konması hasta sağlığı açısından büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle yeni tanı kitlerinin geliştirilmesi ayrıca etken parazitlerin vektör ve konak üzerindeki biyokimyasal, immünolojik ve fizyolojik etkilerinin değerlendirilebilmesi için yapılacak çalışmalarda bol miktarda etken parazite ihtiyaç duyulmaktadır. Etken parazitlerin bol miktarda üretilmesi amacı ile aksenik kültürlerde parazitlerin üretilmesi gereksinimi vardır. Parazit kültürleri, bilimsel çalışmalar için büyük önem arz etmektedir. Parazitin aksenik kültürlerde kısa sürede ve bol miktarda üretilmesi, parazit biyokimyasının, immünolojisinin, fizyolojisinin aydınlatılmasında ve moleküler tabanlı çalışmalarda büyük avantaj sağlayacaktır.

* Etik

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma için Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Sağlık Bilimleri Etik Kurulu'ndan 18/01/2018-E6260 tarih ve sayılı etik kurul onayı alınmıştır.

Hasta Onayı: Çalışmada kullanılan parazit suşları, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Parazit Bankası'nda saklanan ATCC suşlarıdır. Hastadan izole edilmemiştir, bu nedenle hasta onamına gerek yoktur.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu içinde olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

* Yazarlık Katkıları

Konsept: A.Ö., Dizayn: A.Ö., İ.Ç., Y.Ö., Veri Toplama veya İşleme: A.Ö., İ.Ç., Y.Ö., A.N., Analiz veya Yorumlama: A.Ö., İ.Ç., Y.Ö., Yazan: İ.Ç., Y.Ö.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2018-004 numaralı proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness). www.who.int [Internet]. (cited 2019 February 5). Available from: URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness))
2. Franco JR, Simarro PP, Diarra A, Jannin JG. Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clin Epidemiol* 2014;6:257-75.
3. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010;375(9723):1388-402.
4. Novy FG, McNeal WJ. On the Cultivation of *Trypanosoma brucei*. *J Infect Dis* 1904;1:1-30.
5. Weinman D. Cultivation of African sleeping sickness trypanosomes on improved, simple, cell-free medium. *Proc Soc Exp Biol Med* 1946;63:456-8.
6. Razgha A. Über die Züchtung der menschenpathogenen Trypanosomen. *Zeitschrift für Parasitenkd* 1929;2:55-66. Available from: URL: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF02120353.pdf>
7. Reichenow E. Die Züchtung der pathogenen Trypanosomen. *Arch Schiffsu Tropenhyg* 1934;38:292-302.
8. Brutsaert P, Henrard C. L'hémoculture comme moyen auxiliaire de diagnostic de la maladie du sommeil. *CR Soc Biol* 1938;127:1469-72.
9. Chang SL. Studies on Hemoflagellates. IV. Observations Concerning some Biochemical Activities in Culture and expiration of Three Species of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis* 1948;82:109-18.
10. Hendricks LD, Wood DE, Hajduk ME. Haemoflagellates: commercially available liquid media for rapid cultivation. *Parasitology* 1978;76:309-16.
11. Childs GE, McRoberts MJ, Moussa MA. Systems for the *in vitro* large-scale propagation of New World *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol* 1979;73:395-6.
12. Chaudhuri G, Ghoshal K, Pal S, Sen S, Banerjee AB. A new medium for large scale production of *Leishmania donovani* promastigotes for biochemical studies. *Indian J Med Res* 1986;84:457-60.
13. O'Daly JA, Rodriguez MB. Differential growth requirements of several *Leishmania* spp. in chemically defined culture media. *Acta Trop* 1988;45:109-26.
14. Kar K, Mukerji K, Naskar K, Bhattacharya A, Ghosh DK. *Leishmania donovani*: a chemically defined medium suitable for cultivation and cloning of promastigotes and transformation of amastigotes to to promastigotes. *J Protozool* 1990;37:277-9.
15. Gibson WC. Will the real *Trypanosoma b. gambiense* please stand up. *Parasitol Today* 1986;2:255-7.
16. Hirumi H, Doyle JJ, Hirumi K. African trypanosomes: cultivation of animal-infective *Trypanosoma brucei* *in vitro*. *Science* 1977;196(4293):992-4.
17. Duzenko M, Ferguson MA, Lamont GS, Rifkin MR, Cross GA. Cysteine eliminates the feeder cell requirement for cultivation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms *in vitro*. *J Exp Med* 1985;162:1256-63.
18. Hirumi H, Hirumi K. Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers. *J Parasitol* 1989;75:985-9.
19. Vassella E, Boshart M. High molecular mass agarose matrix supports growth of bloodstream forms of pleomorphic *Trypanosoma brucei* strains in axenic culture. *Mol Biochem Parasitol* 1996;82:91-105.
20. Vassella E, Krämer R, Turner CM, Wankell M, Modes C, van den Bogaard M, et al. Deletion of a novel protein kinase with PX and FYVE-related domains increases the rate of differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol* 2001;41:33-46.
21. McCulloch R, Vassella E, Burton P, Boshart M, Barry JD. Transformation of Monomorphic and Pleomorphic *Trypanosoma brucei*. *Methods Mol Biol* 2004;262:53-86.
22. Van Reet N, Pyana PP, Deborggraeve S, Büscher P, Claes F. *Trypanosoma brucei gambiense*: HMI-9 medium containing methylcellulose and human serum supports the continuous axenic *in vitro* propagation of the bloodstream form. *Exp Parasitol* 2011;128:285-90.
23. Luz ZM, Coutinho MG, Caçado JR, Krettli AU. [Hemoculture: sensitive technique in the detection of *Trypanosoma cruzi* in chagasic patients in the chronic phase of Chagas disease]. *Rev Soc Bras Med Trop* 1994;27:143-8.
24. D'Alessandro-Bacigalupo A, Saravia NG. *Trypanosoma rangeli*. *Parasit Protozoa* 1992;2;1-54.
25. Saldaña A, Sousa OE. *Trypanosoma rangeli*: epimastigote immunogenicity and cross-reaction with *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol* 1996;82:363-6.
26. Howard MK, Sayers G, Miles MA. *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes: transformation *in vitro*, lectin agglutination, complement resistance, and infectivity. *Exp Parasitol* 1987;64:147-56.
27. Ferreira KA, Lemos-Júnior PE, Lages-Silva E, Ramírez LE, Pedrosa AL. Human urine stimulates *in vitro* growth of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Parasitol Res* 2007;101:1383-8.

Pentavalent Antimonial Bileşiklere Dirençli Vahşi *Leishmania* İzolatlarının Leishmaniasis Tedavisinde Kullanılan İlaçlara Karşı *in vitro* Dirençlerinin Karşılaştırılması

Comparison of in vitro Resistance of Wild Leishmania Isolates, Which are Resistant to Pentavalent Antimonial Compounds, Against Drugs Used in the Treatment of Leishmaniasis

✉ Ahmet Özbilgin¹, ✉ İbrahim Çavuş¹, ✉ Tuğba Kaya², ✉ Ahmet Yıldırım¹, ✉ Mehmet Harman³

¹Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

²Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

³Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye

Cite this article as: Özbilgin A, Çavuş İ, Kaya T, Yıldırım A, Harman M. Pentavalent Antimonial Bileşiklere Dirençli Vahşi *Leishmania* İzolatlarının Leishmaniasis Tedavisinde Kullanılan İlaçlara Karşı *in vitro* Dirençlerinin Karşılaştırılması. Türkiye Parazitoloj Derg 2020;44(1):12-6.

ÖZ

Amaç: Türkiye’de, Kutanöz leishmaniasis (KL) tedavisinde meglumin antimonat (Glucantime®) ve sodyum stiboglukonat (Pentostam®) kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda bu ilaçlara direnç olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada; dirençli *Leishmania* suşlarının Amfoterisin B, Miltefosin, Meglumin Antimonat, Paromomisin ve Sodyum Stiboglukonat etkenlerine karşı duyarlılığının *in vitro* olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Meglumin Antimonat tedavisi iki kür uygulanan, ancak klinik iyileşme gözlenmeyen hastalardan elde edilen ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankası’nda saklanan 5 *Leishmania* izolatu seçilmiştir. Seçilen izolatlar ITS1 bölgesine özgü primer ve probler kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizi ile tiplendirilmiştir. Her izolatu; Amfoterisin B, Miltefosin, Meglumin Antimonat, Paromomisin ve Sodyum Stiboglukonat etken maddelerine karşı, 500, 250, 125, 50, 25 µg/mL konsantrasyonlarında, ilaç direnç düzeyleri XTT ve hemositometre yöntemiyle çalışılmıştır.

Bulgular: Ülkemizde KL etkeni olan ve iki kez meglumin antimonat tedavisine rağmen klinik ve paraziter iyileşme göstermeyen hasta lezyonlarından elde edilen dirençli *Leishmania tropica* izolatlarının Amfoterisin B’ye hiç direnç göstermedikleri ve sırası ile Miltefosin, Sodyum Stiboglukonat, Paromomisin ve Meglumin Antimonat’a karşı duyarlı oldukları gözlenmiştir. Kontrol grubu *Leishmania tropica* (MHOM/AZ/1974/SAF-K27) izolatının ise beş etken maddenin ilaç konsantrasyonlarının hiçbirinde canlılığını sürdüremediği görülmüştür.

Sonuç: Seçilen dirençli *L. tropica* izolatlarının hiç birinin Amfoterisin B’ye direnç göstermediği çalışmada saptanmış ve istatistiksel olarak da ortaya konulmuştur (p<0,05). Elde edilen verilerin, ilaç çalışmaları yapan ve yeni ilaç molekülleri araştıran klinisyen ve araştırmacılara yol göstermesi açısından önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kutanöz leishmaniasis, direnç, tedavi, direnç testleri, Türkiye

ABSTRACT

Objective: Meglumine antimoniate (Glucantime®) and Sodium stibogluconate (Pentostam®) are used for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Turkey. There is a reported resistance to these drugs in recent years. The aim of the present study was to compare the *in vitro* sensitivities of resistant *Leishmania* isolates against Amphotericin B, Miltefosine, Meglumine Antimoniate, Paromomycin and Sodium Stibogluconate.

Methods: Five *Leishmania* isolates of patients with cutaneous leishmaniasis, who showed no clinical recovery despite two consecutive meglumine antimoniate treatments, which were stored in the Parasite Bank in Manisa Celal Bayar University Medical Faculty were selected. They were genotyped with Real-Time PCR using specific primers and probes to ITS1 region. Drug resistance levels of each *Leishmania* isolate were analysed for Amphotericin B, Miltefosine, Meglumine Antimoniate, Paromomycin, and Sodium Stibogluconate at concentrations of 500, 250, 125, 50, 25 µg/mL with XTT method and hemocytometer.



Geliş Tarihi/Received: 14.11.2019 Kabul Tarihi/Accepted: 30.11.2019

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Tuğba Kaya, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

Tel/Phone: +90 507 490 26 07 E-Posta/E-mail: tugbakaya42@yahoo.com ORCID ID: orcid.org/0000-0001-7612-5414

Results: It was observed that the resistant *Leishmania tropica* isolates showed no resistance to Amphotericin B, and were sensitive to Miltefosine, Sodium Stibogluconate, Paromomycin and Meglumine Antimonate, respectively. In addition, *Leishmania tropica* (MHOM/AZ/1974/SAF-K27) isolate of the control group could stay viable in none of the drug concentrations of five agents in the study.

Conclusion: It was determined that none of the selected resistant *L. tropica* isolates showed resistance to Amphotericin B and that was also shown statistically ($p < 0.05$). The results of this study are important in guiding clinicians and researchers who conduct studies on drugs and search for new drug molecules.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, resistance, treatment, resistance tests, Turkey

GİRİŞ

Ülkemizde Urfa çıbanı, Antep çıbanı, Şark çıbanı, güzellik yarası gibi çeşitli isimler ile bilinen kutanöz leishmaniasis (KL), günümüzde hala önemini koruyan bir paraziter hastalıktır (1,2). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre her yıl 1,5 milyon yeni KL olgusunun olduğu ve önemli bir kısmının Afganistan, Cezayir, Suudi Arabistan ve Suriye gibi ülkelerde görüldüğü bildirilmiştir (3).

Türkiye’de 1990-2010 yılları arasında toplam 46,003, 2011-2017 yılları arasında ise toplam 21,370 KL olgusu olduğu Sağlık Bakanlığı tarafından bildirilmiştir (1,4). Ülkemizde Güney Doğu Anadolu Bölgesi başta olmak üzere günümüzde tüm bölgelerde KL olguları görülmeye başlanmıştır (5).

KL lezyonları, kişinin immünite durumuna bağlı olarak bazı olgularda kalıcı skar bırakarak kendiliğinden iyileşebilmektedir. Ancak hastaların hem estetik kaygılarının önlenmesi hem de enfeksiyon kaynağı olmalarından dolayı bütün hastaların tedavi edilmesi önerilmektedir (1,6). KL tedavisinde, ilk seçenek olarak beş değerli antimon bileşikler [meglumin antimonat (Glucantime®) ve sodium stibogluconate (Pentostam®)] tercih edilmektedir. Beş değerli antimon bileşiklerinin kontrendikasyon olduğu zamanlarda ise amfoterisin, miltefosin, pentamidin gibi çeşitli alternatif ilaçlardan faydalanılmaktadır (6,7).

Ülkemizde KL tedavisinde, 1940’lı yıllarda klinik etkinliği tanımlanan beş değerli antimon (SbV) bileşikler ilk seçenek olarak kullanılmaktadır. Meglumin antimonat (Glucantime®) ve sodyum stibogluconat (Pentostam®) bu grup içerisinde yer almaktadır. KL tedavisinde yaklaşık %90 bir etkinliği olduğu bildirilmiştir. *Leishmania* amastigotları üzerinde glikolitik enzimleri, yağ asidi oksidasyonunu, DNA ve RNA sentezini inhibe ederek etki etmektedirler. Ancak bu grup ilaçlar ağır metaldir ve son yıllarda dirençli suşların ortaya çıkmasına bağlı olarak alternatif ilaçlara gereksinin duyulmaya başlanmıştır (8,9).

Beş değerli antimon bileşiğinde yer alan ilaçlar ile tedaviye yanıt alınamayan hastalarda miltefosinin kullanılabileceği yapılan araştırmalarda bildirilmiştir. Ancak miltefosinin pahalı bir ilaç olmasının yanı sıra organizmadaki yarılanma ömrünün uzun olması, hastalarda şiddetli bulantı benzeri yan etkilerinin olması ve ülkemizde miltefosin preparatının bulunmaması gibi birçok dezavantajı bulunmaktadır (6,8).

Tedaviye cevap alınmayan KL olguların tedavisinde antifungal bir ilaç olan amfoterisin B’den de yararlanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda, KL tedavisinde klinik olarak direncin rastlanmadığı tek ilacın amfoterisin B olduğu bildirilmiştir (6). Ancak miltefosin gibi maliyeti yüksek bir ilaçtır ve hastanın tedavi süresince gözleminin yapılması gerekmektedir (7).

Paromomisin, 1960’lı yıllarda anti-leishmanial etkisi bildirilen, genel olarak bakteriyel enfeksiyonlarda kullanılan aminoglikozid grubu bir antibiyotiktir (10). %12 metilbenzetanyum içeren %15’lik paromomisin kombinasyonlarının özellikle *L. major* enfeksiyonlarında etkili olduğu ancak yan etkilerinin de bulunduğu yapılan araştırmalarda bildirilmektedir (9).

KL tedavisinde ülkemizde, meglumin antimonat (Glucantime®) ve sodyum stibogluconat (Pentostam®) ilaçları kullanılmaktadır. Son yıllarda bu ilaçlara karşı direnç olduğu bildirilmektedir. Dirençli bu olguların tedavisinde hangi ilaçların hangi dozlarda etkili olduğunun araştırılarak klinisyenlerin bu konuda bilgilendirilmesi hastaların tedavileri açısından büyük önem kazanmaktadır. Çalışmamızda amfoterisin B, miltefosin, meglumin antimonat, paromomisin ve sodyum stibogluconatlara karşı duyarlılığının *Leishmania tropica* izolatlarında *in vitro* olarak araştırılması amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Toplam 10 doz intralezyoner olarak 2 kez meglumin antimonat (Glucantime®) tedavisi almış ancak hem klinik olarak hem de parazitolojik olarak iyileşme gözlenmeyen toplam 5 KL hastasının lezyonundan NNN besiyerine ekimi yapılarak elde edilmiş ve kriyoprezervasyonu yapılarak sıvı azot tankında saklanmakta olan izolatlar kullanılmıştır (Tablo 1).

Sıvı azot tankında bulunan beş izolat uygun koşullarda sıvı azot tankından çıkarılarak çözdürülmüş ve NNN besiyerlerine ekilmeleri yapılmıştır. NNN besiyerleri 25 °C’de inkübasyona bırakılmış ve izolatların üreme durumu gūnaşırı kontrol edilmiştir. NNN besiyerinde üreyen promastigotlar içerisinde RPMI 1640 (RPMI 1640+ %10 fetal bovine serum) besiyeri bulunan flakslere aktarılmış ve tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Flakslere gūnaşırı üreme yoğunluğu açısından kontrol edilmiştir. Flakslerdeki üreme yoğunluğu 10⁷ promastigot/mL olunca genotiplendirilmesi ve *in vitro* ilaç direnç çalışmaları yapılmıştır.

Tablo 1. Dirençli izolatların özellikleri

	Geldiği yer	Cinsiyet	Yaş	Lezyon yeri	Lezyon süresi	Lezyon genişliği	Lezyon tipi
İzolat 1	Dicle/Diyarbakır	E	11	Alın	1 yıl	3 cm	Kuru
İzolat 2	Merkez/Diyarbakır	E	14	Burun üstü	6 ay	3 mm	Rezidivan
İzolat 3	Bağlar/Diyarbakır	K	9	Sağ yanak	5 ay	1 cm	Kuru
İzolat 4	Dicle/Diyarbakır	K	13	Burun üstü	2 hafta	1-2 mm	Rezidivan
İzolat 5	Mazıdağı/ Mardin	K	15	Burun ucu	10 ay	2 cm	Kuru

İzolatların genotiplendirilmesi *leishmania ITS-1* gen bölgesine özgü primer ve proplar kullanılarak gerçek zaman-polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PRZ) yöntemi ile yapılmıştır (5,11,12). Bu çalışma, T.C. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Yerel Etik Kurulu'nun 07/12/2016 tarih ve 20.478.486-399 sayılı kararı ile alınan etik kurul onayı ile gerçekleştirilmiştir.

İn vitro İlaç Direnç Testleri

Çalışmada, 96'lık düztabanlı hücre kültürü plağının kuyucukları 3'ü blank (kör kuyucuk), 3'ü ilaçsız parazit kontrol, 3'ü meglumin antimonat (Glucantime®, Fransa) ve 3'ü sodyum stiboglukonat (Pentostam®, İngiltere) olacak şekilde gruplara ayrılmış ve her kuyucuğa 100 µL RPMI 1640 besiyerinden (%10 FCS+%1 penisilin/streptomisin +%1 gentamisin) ilave edilmiştir. Direnç testi uygulanacak olan meglumin antimonat ve sodyum stiboglukonat olarak işaretlenen bölmelerin her birinin ilk kuyucuğuna her bir ilaçtan 100 µL kendi bölmelerine eklenmiştir. İlk kuyucuktan 100 µL alınarak seri sulandırması 500, 250, 125, 50 ve 25 µg/mL olacak şekilde aktarılmış ve blank bölmeleri hariç tüm kuyucuklara 100 µL promastigot süspansiyonundan (10⁶ promastigot/mL) konulmuştur. Doksan altılık düz tabanlı hücre kültürü plağının etrafı parafinle kaplanarak 48 saat süre ile 25 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra hemositometre yöntemi ve XTT direnç testi ile *in vitro* direnç düzeyleri saptanmıştır.

Hemositometre Yöntemi

Etüvdeki plaklar çıkarılmış ve Neubauer'in Thoma lamı yardımı ile *leishmania* promastigotları sayısı belirlenmiştir. Her bir kuyucuktan ayrı ayrı örnek alınarak 40X'lik büyütmede sayım yapılmıştır. Bu amaçla Thoma lamının köşelerinde bulunan toplam dört kare ve orta kısımda bulunan kare içerisindeki promastigotlar sayılmıştır. Sayılan toplam promastigot sayısı 10,000 ile çarpılmış ve elde edilen rakam sayılan kare sayısına bölünerek mL'deki promastigot sayısı tespit edilmiştir.

XTT (Sodium 3,3',5,5'-tetrakis(4-methoxyphenyl)-2,4,6-triazine-pyrimidin-5(4H)-one) Direnç Testi

XTT direnç testi çalışması için, etüvden yeni bir 96'lık düztabanlı hücre kültürü plağı çıkarılmıştır. Plağın her bir kolonunda bulunan kuyucuklardaki solüsyondan 100 µL alınmış ve yeni bir hücre kültürü plağına aktarılmıştır.

Kit içerisinde bulunan reagent solüsyonundan 5 mL, electron coupling solüsyonundan ise 0,1 mL alınarak karıştırılmıştır. Yeni hücre kültürü plağının her bir kuyucuğuna hazırlanan bu karışımdan 50 µL ilave edilmiş ve 25 °C'lik etüve konularak 4 saat süre ile inkübe edilmiştir. Süre sonunda spektrofotometrede 450 nm'de absorbans değeri ölçülerek canlılık hesaplaması yapılmıştır. Yapılan deneyler üç defa tekrar edilmiştir (5) (Şekil 1-2).

Elde edilen verilerin, Sidak's multiple comparisons testi uygulanarak istatistiksel analizi yapılarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

İzolatların GZ-PRZ yöntemi ile genotiplendirilmesi sonucu beş izolatında *L. tropica* ile uyumlu pik verdiği gözlenmiştir.

Dirençli KL olgularına ait *Leishmania tropica* izolatlarının *in vitro* duyarlılık çalışmalarında 500 µg/mL ilaç konsantrasyonunda beş etken madde arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Tüm ilaçlar parazitleri öldürmüştür (p>0,05). *In vitro* testlerde 250

µg/mL ilaç konsantrasyonunda ise amfoterisin B tüm ilaçlardan daha etkili bulunurken daha sonra sırası ile miltefosine, sodyum stiboglukonat, paromomycin ve meglumin antimonatın kontrol grubuna göre etkili olduğu görülmüştür (p<0,05). Kontrol grubu ile karşılaştığımızda 125 µg/mL ve 50 µg/mL ilaç konsantrasyonlarında amfoterisin B, miltefosin ve sodyum stiboglukonatın etkili olduğu (p<0,05), paromomycin ve meglumin antimonatın etkisiz olduğu (p>0,05), 25 µg/mL ilaç konsantrasyonunda amfoterisin B (p<0,05) nin etkili olduğu diğer tüm ilaçların etkisiz olduğu ve amfoterisin B dışında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür (p>0,05). Kontrol grubu (referans izolat) *L. tropica* (MHOM/AZ/1974/SAF-K27) izolatının ise beş etken maddenin ilaç konsantrasyonlarının hiçbirinde canlılığını sürdüremediği görülmüştür.

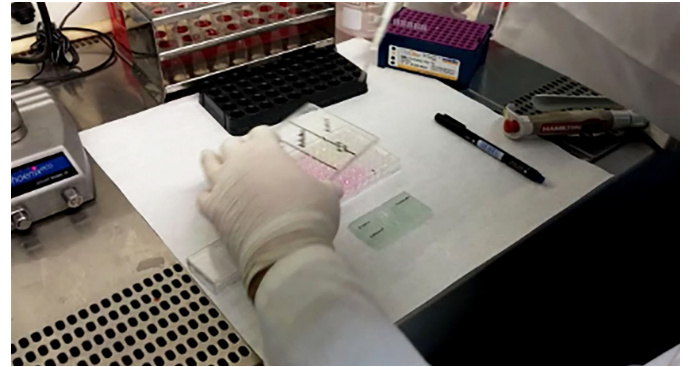
Ülkemizde KL etkeni olan ve iki kez glukantime tedavisine rağmen klinik ve parazitler iyileşme göstermeyen hasta lezyonlarından elde edilen dirençli *Leishmania tropica* izolatlarında parazitlerin amfoterisin B'ye hiç direnç göstermedikleri ve sırası ile miltefosine, sodyum stiboglukonat, paromomycin ve meglumin antimonata karşı duyarlı oldukları görülmüştür (Şekil 3).

İstatistiksel Analiz

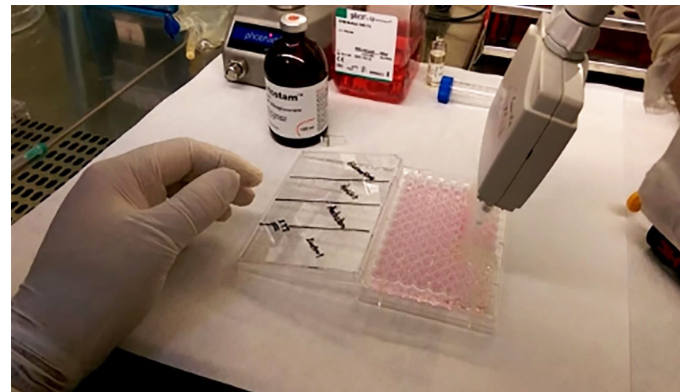
Elde edilen verilerin, Sidak's multiple comparisons testi uygulanarak istatistiksel analizi yapılarak değerlendirilmiştir.

TARTIŞMA

KL lezyonlarının birçoğu kendiliğinden iyileşebilmekte ancak tedavi edilmediğinde kalıcı iz bırakabilmektedir. KL lezyonlarının



Şekil 1. Hemositometre yöntemi



Şekil 2. XTT direnç testi

kendiliğinden iyileşme süresi *L. tropica* ile *L. infantum*'da 6-20 ay ve *L. major*'da ise 2-6 ay arasında değişmektedir ancak bu süre kişiden kişiye farklılık göstermektedir. Hastaların KL için kaynak olabileceğinden tanı konulan tüm hastaların tedavi edilmesi gerekmektedir (1,6,13).

KL tedavisinde beş değerli antimon bileşikleri kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda KL'nin endemik olduğu birçok ülkede, tedaviden alınan sonuçlardaki başarısızlıkların artmakta olduğu bildirilmektedir (14). KL'de bu grup ilaçlara direnç gelişmekte olduğu ve bu nedenle tedaviye yanıt alınmayan KL olgularında miltefosin, amfoterisin B, paromomisin gibi çeşitli alternatif ilaçlar kullanılmaktadır (1,6).

İntravenöz olarak uygulanan amfoterisin B'nin böbrekler üzerinde ciddi yan etkileri bulunmaktadır (15,16). Oral olarak kullanılan miltefosin, pahalı bir preparat olmasının yanı sıra teratojen etki gösterebilmektedir (16). Topikal yolla uygulanan Paromomisin ise nadirde olsa renal ve sekizinci kranial sinir toksisitetlerine neden olmaktadır. Bunun yanı sıra topikal sağaltımla birlikte beş değerli antimon bileşiklerinin birlikte kullanılması sonucu %90 başarı elde edildiği bildirilmiştir (17,18).

Ateş ve ark. (8) ülkemizde KL tedavisinde kullanılan beş değerli antimon bileşikleriyle sonuç alınmadığı zamanlar miltefosin preparatının tercih edilmesinin tedavideki başarı oranını artıracığı görüşünde olduklarını bildirmişlerdir. García Bustos ve ark. (19) 2014'de, deney farelerinin ayak tabanlarında oluşturdukları leishmania enfeksiyonunda meglumin antimonat ile miltefosini karşılaştırarak incelemişler ve miltefosinin etkili ve güvenli bir alternatif tedavi seçeneği olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca miltefosinin, meglumin antimonat'dan daha etkili bir preparat olduğu da vurgulamışlardır.

Yeşilova ve ark. (7) intralezyonal ve sistemik meglumin antimonat tedavisine bağlı lokal yan etki gelişmiş bir KL olgusunu sistemik amfoterisin B ile tedavi etmişler ve özellikle beş değerli antimon bileşiklerine dirençli olgularda amfoterisin B'nin, tedavide alternatif bir ilaç olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Mushtaq ve ark. (20) ise haftada bir intralezyonal amfoterisin B

(2,5 mg / mL) enjeksiyonu uyguladıkları beş KL tanılı hastanın hepsinin tedaviye iyi yanıt verdiğini ve intralezyonal amfoterisin B'nin Eski Dünya KL suşları üzerinde güvenli ve etkili bir tedavi sunduğu sonucuna varmışlardır. Ancak ilaç etkinlik değerlerini belirlemek için kontrol çalışmalarının yapılması gerektiğini de vurgulamışlardır. Hollanda'da 2017 yılında KL tanılı 2 askerde günde 3 kez 28 gün boyunca oral olarak miltefosin (50 mg) tedavi protokolü uygulamışlardır. Her iki hastanın da miltefosine yanıtının iyi olduğunu ve ilacın yan etkilerinin ise az olduğunu belirtmişlerdir (21).

Hamzavi ve ark. (22) İran'ın Fars eyaletinde, vücudunda birden fazla sayıda KL lezyonu bulunan sekiz yaşındaki bir kız çocuğuna meglumin antimonat ve amfoterisin B ile uygulanan birçok tedaviden sonuç alınmadığını ancak miltefosin ve amfoterisin B'nin birlikte kullanımı sonucunda başarılı bir şekilde hastayı tedavi ettiklerini bildirmişlerdir.

Etkeni *L. major* olan KL lezyonların tedavisinde, topikal Paromomisin'in kullanımı ile tedavide başarılı sonuçlar alındığı bildirilmektedir (23). El-on ve ark. (24) 1986 yılında yaptıkları bir çalışmada *L. major*'un etkeni olduğu 67 KL olgusunun tedavisinde Paromomisin kullanmışlar ve hastaların %87'sinin tedavisinde başarılı sonuç almışlardır. Mussi ve ark. (9) %10 Paromomisin içeren hidrofilik merhemi deneysel olarak enfekte Balb/c fareler üzerinde değerlendirmişler ve KL'nin topikal tedavisinde alternatif bir seçenek olabileceğini belirtmişlerdir. Chacko ve ark. (25) Kanada Toronto'da üç buçuk yaşındaki KL pozitif bir erkek hastanın tedavisinde topikal olarak Paromomisin kullanmışlardır. Yaklaşık üç aylık bir sürede çok iyi bir sonuç aldıklarını ve bir yıl sonra yapılan kontrolde nüks olmadığını bildirmişlerdir.

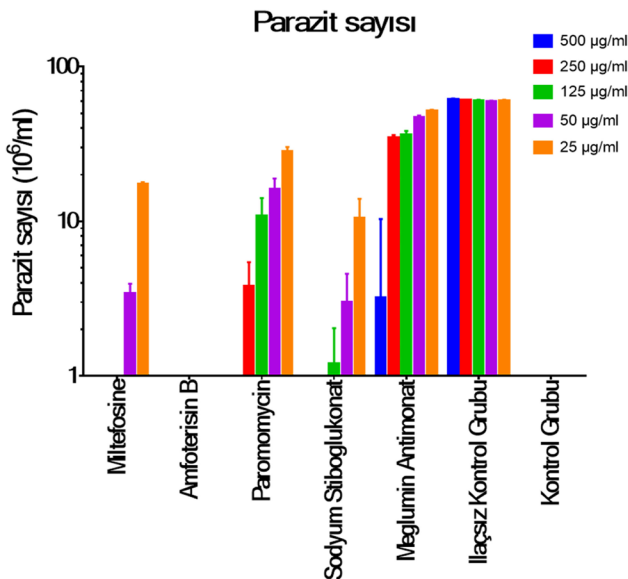
KL'nin endemik olarak görüldüğü ülkelerden biri olan İran'da, KL tedavisinde beş değerli antimon bileşikleriyle ilk tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır ancak son yıllarda ülkede bu ilaçlara karşı direnç geliştiği bildirilmiştir. Bu dirençli izolatların aynı zamanda pentostam ile amfoterisin B'ye de dirençli olduğu ancak miltefosine ile Paromomisine ise duyarlı olduğu gösterilmiş ve İran'da leishmaniasis tedavisinde miltefosin ve paromomisin'in kullanılmasının yararlı olabileceğini saptamışlardır (26).

Çalışmamızda dirençli KL izolatlarının öncelikle GZ-PZR analizi ile tür tayini yapılmış ve iki kez tedavi olmuş ancak tekrarlayan lezyonları bulunan beş KL olgusundan izole edilmiş *L. tropica* suşların amfoterisin B, miltefosine, meglumin antimonat, paromomycin ve sodyum stiboglukonatlara karşı duyarlılığının *in vitro* araştırılması yapılmıştır.

Bizim de bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlarda, ülkemizde KL etkeni olan ve iki kez meglumin antimonat (Glucantime®) tedavisine rağmen klinik ve paraziter iyileşme göstermeyen, hasta lezyonlarından elde edilen dirençli *L. tropica* izolatlarında parazitlerin amfoterisin B'ye direnç göstermedikleri daha sonra ise sırası ile miltefosine, sodyum stiboglukonat, paromomycin ve meglumin antimonata karşı duyarlı oldukları görülmüştür.

SONUÇ

Türkiye'de son yıllarda görülen iklim değişikliğine bağlı olarak sıcaklığın artması bu parazitin Türkiye'de var olan vektörlerinin sayısının artmasına sebep olmuştur. Ayrıca son yıllarda ülkemize gelen mültecilerin sayısının artması ve gelen mültecilerin de endemik bölgelerden gelmesi bu sayının artmasına katkı sağlamıştır. Bu gibi sebeplerden dolayı ülkemizdeki parazitlerin vektörlerinin dağılımlarının artmasına bağlı olarak hastalık



Şekil 3. İlaç konsantrasyonlarına göre parazit sayısının değişimi

yaygınlaşmakta ve leishmaniasise karşı direnç gelişmektedir. Bu çalışma ile dirençli olguların tedavisinde alternatif olabilecek ilaçların belirlenmesi, kullanılan ilaçların dozlarının tedavi edilebilirlik açısından incelenmesi sonucunda elde edilecek bu verilerin klinisyenlerle paylaşarak klinisyenler açısından yol gösterici olması ve hastaların tedavilerinin sorunsuz çözümlenmesi açısından önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

* Etik

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma, T.C. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Yerel Etik Kurulu'nun 07/12/2016 tarih ve 20.478.486-399 sayılı kararı ile alınan etik kurul onayı ile gerçekleştirilmiştir.

Hasta Onayı: Çalışmada kullanılan parazitler insan hücresi olmadığı ve sıvı azottan çıkarılarak kullanıldığı için çalışmaya etik kurul eklenmiştir. Hasta onay bilgisine gerek yoktur.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu içinde olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

* Yazarlık Katkıları

Konsept: A.Ö., M.H., İ.Ç., T.K., A.Y., Dizayn: A.Ö., M.H., Veri Toplama veya İşleme: A.Ö., M.H., İ.Ç., T.K., A.Y., Analiz veya Yorumlama: A.Ö., İ.Ç., T.K., A.Y., Literatür Arama: İ.Ç., T.K., A.Y., Yazan: A.Ö., İ.Ç., T.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması olmadığı bildirilmiştir.

Finansal Destek: Bu çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2017-025).

Teşekkür: Manisa Celal Bayar Üniversitesi Parazit Bankası'na çalışmadaki suşların temin edilmesinde sağladığı katkılardan ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Gürel MS, Yeşilova Y, Ölgen MK, Özbel Y. Türkiye'de kutanöz leishmaniasisin durumu. Türkiye Parazit Derg 2012;36:121-9.
- Özbel Y, Özensoy Töz S. Leishmaniasis. Özcel MA, Özbel Y, Ak M, editors. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları Kitabı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, No: 22; 2007. p.197-244.
- WHO Technical Report Series-949. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010.
- <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/zoontikvektorel-sarkicibani/istatistik>
- Özbilgin, A, Çavuş İ, Yıldırım A, Kaya T, Ertabaklar H. Leishmania tropica Üzerinde In vitro ve In vivo İlaç Etkinliğinin Değerlendirilmesi: Pilot Çalışma. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2018;42:11-19.
- Uzun S, Gürel MS, Harman M. Kutanöz Layşmanyazis Tanı ve Tedavi Rehberi. Türk Dermatoloji Derneği, Haziran 2017. Galenos Yayınevi, İstanbul, Türkiye. Available from: URL: <http://cms.galenos.com.tr/SolvePark/Uploads/files/573ed560a9ec42ed8c04c39ec743e34e.pdf>
- Yeşilova Y, Turan E, Sürücü H A, Aksoy M, Özbilgin A. (2014). Sistemik lipozomal amfoterisin B tedavisine cevap veren kutanöz leishmaniasis olgusu. Türkiye Parazit Derg 2015;39:63-65.
- Ateş F, Or E, Körpınar M A, Gönül R, Bahçeci T. Leishmaniasis tedavisinde antimyon bileşiklerinin kullanımı. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2011;22:53-57.
- Mussi SV, Fernandes AP, Ferreira LA. Comparative study of the efficacy of formulations containing fluconazole or paromomycin for

topical treatment of infections by Leishmania (Leishmania) major and Leishmania (Leishmania) amazonensis. Parasitol Res 2007;100:1221-6.

- Scott JA, Davidson RN, Moody AH, Grant HR, Felmingham D, Scott GM, et al. Aminosidine (paromomycin) in the treatment of leishmaniasis imported into the United Kingdom. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1992;86:617-9.
- El Tai NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schönian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of Leishmania donovani spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2000;94:575-9.
- Toz SO, Culha G, Zeyrek FY, Ertabaklar H, Alkan MZ, Vardarlı AT, et al. A real-time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of Leishmania parasite from human and dog clinical samples in Turkey. PLoS neglected tropical diseases 2013;7:e2205.
- Uzun S, Gürel MS, Durdu M, Akyol M, Fettahhoğlu Karaman B, Aksoy M, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of cutaneous leishmaniasis in Turkey. International journal of dermatology 2018;57:973-982.
- Arevalo I, Ward B, Miller R, Meng TC, Najjar E, Alvarez E, et al. Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. Clinical infectious diseases 2001;33:1847-51.
- Berman JD, Goad LJ, Beach DH, Holz GG. Effects of ketakonazole on sterol biosynthesis by Leishmania mexicana mexicana amastigotes in murine macrophage tumor cells. Mol Biochem Parasito 1986;20:85-92.
- Berman J. Current treatment approaches to leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis. 2003;16:397-401.
- Berman JD. Human leishmaniasis: Clinical, diagnosis and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin Infect Dis 1997;24:684-703.
- Scott JA, Davidson RN, Moddy AH, Grant HR, Felmingham D, Scott GM, et al. Aminosidine (paromomycin) in the treatment of leishmaniasis imported into the United Kingdom. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992;86:617-9.
- García Bustos MF, Barrio A, Prieto GG, de Raspi EM, Cimino RO, Cardozo RM, et al. In vivo antileishmanial efficacy of miltefosine against Leishmania (Leishmania) amazonensis. J Parasitol 2014;100:840-7.
- Mushtaq S, Dogra D, Dogra N. Clinical Response with intralesional Amphotericin B in the treatment of old world cutaneous leishmaniasis: a preliminary report. Dermatol Ther 2016;29:398-405.
- van der Snoek EM, Couwenberg SM, Stijnis C, Kortbeek LM, Schadd EM. Two cases of cutaneous leishmaniasis in Dutch military personnel treated with oral miltefosine. Journal of the Royal Army Medical Corps 2017;163:68-70.
- Hamzavi SS, Sanaei Dashti A, Kadivar MR, Pouladfar G, Pourabbas B. Successful treatment of disseminated cutaneous leishmaniasis with liposomal amphotericin B and miltefosine in an eight-year-old girl. The Pediatric infectious disease journal 2018;37:275-277.
- Harman M. Kutanöz Leishmaniasis. Turkish Journal of Dermatology/Türk Dermatoloji Dergisi 2015;9:168-76.
- El-On J, Livshin R, Even-Paz Z, Hamburger D, Weinrauch L. Topical treatment of cutaneous leishmaniasis. J Invest Dermatol 1986;87:284-8.
- Chacko A, Joseph M, Feltis T, Morris S K. Successful Treatment of Cutaneous Leishmaniasis with Topical Paramomycin in a Child After Treatment Failure with Systemic Fluconazole. The American journal of tropical medicine and hygiene 2016;95:793-794.
- Hadighi R, Boucher P, Khamesipour A, Meamar AR, Roy G, Ouellette M, et al. Glucantime-resistant Leishmania tropica isolated from Iranian patients with cutaneous leishmaniasis are sensitive to alternative antileishmania drugs. Parasitol Res 2007;101:1319-22.

Presence of *Toxocara* spp. and Other Zoonotic parasites Ova in Children's Playground in Karaman, Turkey

Türkiye'nin Karaman İlinde Çocuk Oyun Parklarında Toxocara spp. ve Diğer Zoonoz Parazitlerin Yumurtalarının Varlığı

© Mehmet Fatih Aydın

University of Karamanoğlu Mehmetbey Faculty of Health Sciences, Department of Public Health, Karaman, Türkiye

Cite this article as: Aydın MF. Presence of *Toxocara* spp. and Other Zoonotic Parasites Ova in Children's Playground in Karaman, Turkey. Türkiye Parazit Derg 2020;44(1):17-20.

ABSTRACT

Objective: Human toxocarosis (HT) is a widespread and neglected parasitic disease around the world and it is caused by *Toxocara canis* and *Toxocara cati*, a common nematode found in dogs and cats. Children are caught to HT after ingestion of embryonated *Toxocara* spp. eggs via contaminated materials such as soil, hair and etc. The aim of this study is to investigate *Toxocara* spp. and other zoonotic parasites in children's playgrounds in Karaman province of Turkey.

Methods: In total, 103 samples (68 sand soil, 26 soil and 9 stool) from 20 randomly selected children's playgrounds in May 2018 in Karaman province, were investigated. Samples were examined by flotation in saturated NaCl solution and parasite ova were diagnosed under the light microscope morphologically.

Results: Of the 20 screened playgrounds, 11 [55%, confidence interval (CI=33.6-75.2)] and 27 analyzed sample (26.2%, CI=18.4-35.2) were positive one or more parasite species. While *Toxocara* spp. eggs were the most common species in total (19.4%, CI=12.6-27.8), taeniid (*Taenia* spp., *Echinococcus* spp.) eggs and *Ancylostoma* spp. eggs were found in seven (6.8%, CI=2.97-12.7) and one (0.97%, CI=0.05-4.21) samples respectively. Also, one soil sample was found to be contaminated with both *Toxocara* and taeniid eggs.

Conclusion: These results demonstrate that children's playgrounds in Karaman may be a source for HT and other zoonotic infections. We advise to be fenced children's playgrounds in order to prevent pet animal's accessibility.

Keywords: *Toxocara*, soil, playground, Karaman, Turkey

ÖZ

Amaç: İnsan toksokariosisi (İT) köpek ve kedilerde yaygın olarak bulunan nematod *Toxocara canis* ve *Toxocara cati*'den kaynaklanan, dünya çapında yaygın ve ihmal edilen paraziter bir hastalıktır. Çocuklar İT'ye toprak, saç vb. gibi kirli malzemelerle embriyonlu *Toxocara* spp. yumurtalarını alarak yakalanırlar. Bu çalışmanın amacı Türkiye'nin Karaman ilindeki çocuk oyun alanlarındaki *Toxocara* spp. ve diğer zoonotik parazitleri araştırmaktır.

Yöntemler: Rastgele seçilen 20 çocuk oyun alanından toplamda 103 (68 kumlu toprak, 26 toprak ve 9 dışkı) örnek 2018 yılı mayıs ayında alınmıştır. Örnekler doymuş NaCl çözeltisi içinde yüzdürme metodu ile incelenmiş ve parazit yumurtaları ışık mikroskobu altında morfolojik olarak teşhis edilmiştir.

Bulgular: Taranan 20 oyun alanından 11'i (%55, CI=3,6-75,2) ve 27 numune (%26,2, CI=18,4-35,2) bir veya daha fazla parazit türü olarak pozitif. *Toxocara* spp. yumurtaları belirlenen en yaygın türler iken (%19,4, CI=12,6-27,8), taeniid (*Taenia* spp., *Echinococcus* spp.) ve *Ancylostoma* spp. yumurtaları sırasıyla yedi (%6,8, CI 2,97-12,7) ve bir (%0,97, CI=0,05-4,21) numunedeki bulundu. Ayrıca, bir toprak örneğinin hem *Toxocara* hem de taeniid yumurtaları ile kirlenmiş olduğu bulundu.

Sonuç: Bu sonuçlar, Karaman'daki çocuk oyun alanlarının İT ve diğer zoonotik enfeksiyonlar için bir kaynak olabileceğini göstermektedir. Evcil hayvanların erişimini engellemek için çocuk oyun alanlarının çitle çevrilmesini tavsiye ediyoruz.

Anahtar Kelimeler: *Toxocara*, toprak, oyun alanı, Karaman, Türkiye

Bu çalışma 21. Parazitoloji Kongresi'nde (28 Eylül - 3 Ekim 2019, İzmir) poster bildirisi olarak sunulmuştur.



Geliş Tarihi/Received: 26.12.2018 Kabul Tarihi/Accepted: 03.01.2020

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Mehmet Fatih Aydın DVM, University of Karamanoğlu Mehmetbey Faculty of Health Sciences, Department of Public Health, Karaman, Türkiye

E-Posta/E-mail: veterinerfma@gmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0002-8325-4887

INTRODUCTION

Children are exposed to a wide range of zoonotic parasitic diseases while playing in public parks or playgrounds (1,2). *Toxocara canis* (*T. canis*) and *Toxocara cati* (*T. cati*), a common nematode found in dogs and cats (3,4), cause human toxocarosis (HT) or visceral larva migrans in general population (5). The disease is occurring after ingestion of embryonated *Toxocara* spp. eggs via contaminated soils with pup feces and unwashed vegetables (6). Consumption of raw or semi-cooked meat containing larvae, contact with dogs, soil eating or pica and drinking unboiled water are among risk factors for HT (1,5,7).

Because of the public importance, more research was conducted to determine presence and frequency of *Toxocara* spp. and other parasites found in public areas worldwide (8-11). The purpose of this research is to determine *Toxocara* spp. and other potential parasites likely to be in children's playgrounds in Karaman province of Turkey, where no study was conducted for this aim.

METHODS

This study was conducted in Karaman province, located at (37° 10' 51.632" N 33° 13' 20.075" E) coordinates in south of the Central Anatolia Region of Turkey. The province is about 1033 meters above sea level and has a surface area of 8869 km². While town-wide show continental climate features, southern parts can show temperate climate characteristics. The average annual percentage of relative humidity is 58% in Karaman.

Overall, 103 samples (68 sand soil, 26 soil and 9 stool) were collected from 20 children's playgrounds during May of 2018. Five samples were taken from each playground at least. For soil sampling, 250 gram specimen was taken from the 7 cm of ground in to plastic bags and examined within that day or on the following day. Soil samples were examined by flotation in saturated NaCl solution (12). In a big beaker 250 gr soil samples were homogenized with saturated NaCl solution (25 °C is 1.2 g/m). Then it was filtered in to a small glass, in order to remove coarse particles. Saturated NaCl solution was again added on to homogenized sample and coverglass was placed on to mix. After 20 min incubation cover glass was taken attentively and examined under the light microscope (objective: 40x). *Toxocara* spp. eggs

were diagnosed according to spherical shape, serrated surface and thick dark shell morphological properties.

Statistical Analysis

For statistical analysis Statistical Package for the Social Science (SPSS) version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) package programme was used. Pearson's chi-square test was used to evaluate qualitative data. Statistical significance was evaluated at levels of 0.05 and 0.01. Maximum likelihood estimation with 95% confidence intervals (CI) of contamination rates was also calculated.

RESULTS

As seen in Table 1, 11 of 20 playgrounds (55%, CI=33.6-75.2) and 27 of 103 samples (26.2%, CI=18.4-35.2) were found to be contaminated one or more parasite species eggs. While *Toxocara* spp. eggs were the most common species in total (19.4%, CI=12.6-27.8), taeniid (*Taenia* spp., *Echinococcus* spp.) and *Ancylostoma* spp. eggs were found in seven (6.8%, CI=2.97-12.7) and one (0.97%, CI 0.05-4.21) sample respectively. Also, one soil samples was found to be contaminated both *Toxocara* and taeniid eggs.

DISCUSSION

Soil transmitted diseases are rapidly increasing worldwide due to the out-of-controlled pet animals, failures in antiparasitic treatment in animals and etc. (2,13). According to a recent meta-analysis, global prevalence of *Toxocara* spp. eggs in the world was 21% (14). This rate was reported as 16% for Turkey in the same study. Also high longitude and humidity was associated with high prevalence of *Toxocara* in environment (14). *Toxocara* egg prevalence in children's playground was 19.4% in this study. In spite of this rate was higher than the prevalence for Turkey (16.0%), it is in accordance with the global prevalence reported by Fakhriet et al. (14). This finding be correlated with humidity rates and large population of stray dogs in the province. *Toxocara* spp. eggs in different provinces of Turkey vary from 4.16% to 64.28%. *Toxocara* eggs prevalence in soil samples was 4.16% in Konya (15), 7.3% in Kayseri (16), 8.33% in Istanbul (8), 10% in Kütahya (17), 15.05% in Ankara (18), 15.6% in Kırıkkale (19),

Table 1. Distribution of *Toxocara*, *Taenia* and *Ancylostoma* eggs in the samples

Sample	NCS/ NAS	NPS	MLE (%)	95% CI	<i>Toxocara</i> spp. egg	<i>Taenia</i> spp. egg	<i>Toxocara</i> + <i>Taenia</i> spp. egg	<i>Anclostoma</i> spp. egg
Playground	20/20	11	55	33.6-75.2	6/20 (30%)* CI 13.2-51.7	6/20 (30%) CI 13.2-51.7	1/20 (5%) CI 0.29-20.2	1/20 (5%) CI 0.29-20.2
Sandy soil	68/68	17	25	15.8-36.1	12/68 (17.7%) CI 9.86-27.8	5/68 (7.35%) CI 2.7-15.2	0/68	0/68
Soil	26/26	7	26.9	12.6-45.6	6/26 (23.1%) CI 9.88-41.3	2/26(7.69%) CI 1.32-21.9	1/26(3.85%) CI 0.22-15.9	0/26
Stool	9/9	3	33.3	9.54-65.5	2/9 (22.2%) CI 4.08-54.2	0/9	0/9	1/9 (11.1%) CI 0.66-40.5
Total	103/103	27	26.2	18.4-35.2	20/103 (19.4%) CI 12.6-27.8	7/103 (6.8%) CI 2.97-12.7	1/103 (0.97%) CI 0.05-4.21	1/103 (0.97%) CI 0.05-4.21

NCS: Number of collected sample, NAS: Number of analyzed sample, NPS: Number of positive sample, MLE: Maximum likelihood estimation, CI: Confidence intervals
*The rate (...%) shows the MLE result

18.91% in Aydın (20), 23% in Elazığ (12), 25.97% in Van (21), and 64.28% in Erzurum (9), respectively. In this study *Toxocara* spp. egg prevalence was 19.4% (20/103, CI=12.6-27.8). The *Toxocara* eggs prevalence we found in this study was higher than the study conducted in Konya Province (15), a metropolis neighbor to Karaman. This may be due to its being a metropolis, having more financial opportunities of its municipality and being easy of street animal rehabilitation. Also parasite egg contamination was found lower than Erzurum. This may originate from differences in prevalence of risk factors between Erzurum and Karaman.

Taeniid (*Taenia* spp., *Echinococcus* spp.) eggs were found in 7 of 103 samples (6.8%) and also it was remarkable that 6 of 20 playgrounds (30%) were contaminated with this parasite. However, *Ancylostoma* spp. egg was determined in one stool sample (1/103, 0.97%). Taeniid and *Ancylostoma* eggs were determined in soil samples in Kayseri province of Turkey with rates of 0.8% and 0.4% respectively (16). While prevalence of taeniid eggs with combination of *Toxascaris leonina* in soil was 0.38% in Ankara (18), taeniid ova was detected with the rates of 3.12% and 1.0% in soils in Erzurum and Kırıkkale (9,19), respectively. Since *Ancylostoma* spp. eggs are not as resistant to external conditions as taeniid eggs, their prevalence may be lower.

Since cheapness, easy practice and satisfactory results, flotation technique is one of the most preferred methods for detection of *Toxocara* spp. eggs in soil specimens (10,18,22,23). In addition, Caldwell (24), modified Baermann (25) and polymerase chain reaction (11,16) methods were used for this purpose. In this study we found high prevalence for *Toxocara* spp. eggs in playgrounds (6/20, 30%) and samples (27/103, 26.2%) with the flotation method. It was evaluated that this technique is still appropriate for detection of soil contamination.

Human toxocariasis is a widespread and neglected parasitic disease due to lack of personal hygiene, increase of uncontrolled stray dog population and places have suitable environmental conditions around the world including Turkey (1,5,6,23,26). We found high contamination (19.4%) with *Toxocara* spp. eggs in this study. This probably will result in high *Toxocara* spp. infection in the province and we propose prevalence studies concerning HT and to determine risk factors for the disease.

CONCLUSION

55% of playgrounds in Karaman were found to be contaminated with zoonotic parasite eggs. *Toxocara* spp., taeniid (*Taenia* spp., *Echinococcus* spp.) and *Ancylostoma* spp. ova prevalence were determined as 19.4%, 6.8% and 0.97% respectively. It is foreseen that these results may induce high human infection in the province. We also recommend children's playgrounds to be fenced to prevent pet animal's accessibility. It is also important that to improve public awareness with training programs.

Acknowledgements: We would like to thank the Karaman municipality for allowing the study.

* Ethics

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was not received due to working with soil, sand and stool samples in playgrounds.

Informed Consent: No patients were used in the study. Because of working with soil, sand and fecal samples in the playgrounds, patient consent was not obtained.

Peer-review: Internally peer reviewed.

Financial Disclosure: No financial support was received for this study.

REFERENCES

1. Gyang PV, Akinwale OP, Lee YL, Chuang TW, Orok AB, Ajibaye O, et al. Seroprevalence, disease awareness, and risk factors for *Toxocara canis* infection among primary school children in Makoko, an urban slum community in Nigeria. *Acta Trop* 2015;146:135-40.
2. Gordon CA, Kurscheid J, Jones MK, Gray DJ, McManus DP. Soil-Transmitted Helminths in Tropical Australia and Asia. *Trop Med Infect Dis*. 2017;23;2:E56.
3. Çiçek M, Yılmaz H. Van Yöresinde İnsan ve Köpeklerde Toxocariasis'in Yayılışı. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2012;18:531-536.
4. Öge H, Öge S, Özbakış G, Gürcan S. Comparison of *Toxocara* eggs in hair and faecal samples from owned dogs and cats collected in Ankara, Turkey. *Vet Parasitol* 2014;206:227-31.
5. Aghamolai S, Seyyedtabaei SJ, Behniafar H, Foroutan M, Saber V, Hanifehpur H, et al. Seroepidemiology, modifiable risk factors and clinical symptoms of *Toxocara* spp. infection in northern Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2019;1;113:116-22
6. Selek MB, Baylan O. İnsan toksokariyazi. *Turk Hij Den Biyol Derg* 2013;70:113-134.
7. Ma G, Holland CV, Wang T, Hofmann A, Fan CK, Maizels RM, et al. Human toxocariasis. *Lancet Infect Dis* 2018;18:e14-e24.
8. Toparlak M, Gargılı A, Tüzer E, Keleş V, Esatgil M, Çetinkaya H. Contamination of Children's Playground Sand pits with *Toxocara* eggs in İstanbul, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 2002;26:317-20.
9. Avcioglu H, Balkaya I. The Relationship of Public Park Accessibility to Dogs to the Presence of *Toxocara* Species Ova in the Soil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011;11:177-80.
10. Kleine A, Springer A, Strube C. Seasonal variation in the prevalence of *Toxocara* eggs on children's playgrounds in the city of Hanover, Germany. *Parasit Vectors* 2017;10:248.
11. Choobineh M, Mikaeili F, Sadjadi SM, Ebrahimi S, Iranmanesh S. Molecular characterization of *Toxocara* spp. eggs isolated from public parks and playgrounds in Shiraz, Iran. *J Helminthol* 2019;93:306-12.
12. Şimşek S, Ütük AE, Köroğlu E. Elazığ'daki Bazı Okul Bahçelerinde *Toxocara* spp. Yumurtalarının Yaygınlığı. *FÜ Sağ Bil Vet Derg* 2005;19:133-36.
13. Traversa D, Frangipani D, Regalbono A, Di Cesare A, La Torre F, Drake J, Pietrobello M. Environmental contamination by canine geohelminths. *Parasites&Vectors* 2014;7:67.
14. Fakhri Y, Gasser RB, Rostami A, Fan CK, Ghasemi SM, Javanian M, et al. *Toxocara* eggs in public places worldwide - A systematic review and meta-analysis. *Environ Pollut* 2018;242:1467-1475.
15. Güçlü F, Aydenizoz M. Çocuk parklarındaki kumların kopek ve kedi helminti yumurtaları ile kontaminasyonunun tesbiti. *Turkiye Parazit Derg* 1998; 23, 24-7. / 1998;22:194-8.
16. Bozkurt O, Yıldırım A, İnci A, Çiloğlu A, Bişkin Z, Düzlü O. Kayseri İli Parklarında Bulunan Oyun Alanlarının Askarit Türleri İle Kontaminasyonunun Parazitolojik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2012;18:A175-180.
17. Akdemir C. Visceral larva migrans among children in Kütahya (Turkey) and an evaluation of playgrounds for *T. canis* eggs. *Turk J Pediatr* 2010;52:158-62.
18. Avcioglu H, Burgu A. Seasonal Prevalence of *Toxocara* Ova in Soil Samples from Public Parks in Ankara Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008;8:345-50.

19. Aydenizöz-Ozkayhan M. Soil contamination with ascarid eggs in playgrounds in Kirikkale, Turkey. *J Helminthol* 2006;80:15-8.
20. Gürel FS, Ertuğ S, Okyay P, Aydın İL. Merkezindeki Parklarda *Toxocara Spp* Yumurta Görülme Sıklığının Araştırılması. *Turkiye Parazitol Derg* 2005;29:177-9.
21. Ayaz E, Yaman M, Gül A. Prevalence of *Toxocara spp.* eggs in soil of public parks in Van, Turkey. *Indian Vet J* 2003;80:574-6.
22. Pezeshki A, Haniloo A, Alejafar A, Mohammadi-Ghalehbin B. Detection of *Toxocara spp.* Eggs in the Soil of Public Places in and Around of Ardabil City, Northwestern Iran. *Iran J Parasitol* 2017;12:136-42.
23. Papavasiliopoulos V, Pitiriga V, Birbas K, Elefsiniotis J, Bonatsos G, Tsakris A. Soil contamination by *Toxocara canis* and human seroprevalence in the Attica region, Greece. *Germes* 2018;8:155-61.
24. Ribeiro LM, Dracz RM, Mozzer LR, Lima WDS. Soil contamination in public squares in Belo Horizonte, Minas Gerais, by canine parasites in different developmental stages. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2013;55:229-31.
25. Adekeye TA, Thompson E, Awobode HO. Environmental contamination and public health risk of soil parasites in Ibadan South East Local Government Area, Nigeria. *Zool Ecol* 2016;26:150-7.
26. Momeni T, Mahami-Oskouei M, Fallah E, Safaiyan A, Mahami-Oskouei L. Latent and Asymptomatic *Toxocara* Infection among Young Population in Northwest Iran: The Necessity of Informing People as a Potential Health Risk. *Scientifica* 2016;2016:3562056.

Demodex Kaynaklı Blefarit Olguları

Blepharitis Caused by Demodex

Mehtap Demirkazık, İsmail Soner Koltas

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

Cite this article as: Demirkazık M, Koltas İS. Demodex Kaynaklı Blefarit Olguları. Türkiye Parazitoloj Derg 2020;44(1):21-4.

ÖZ

Amaç: Demodicosis insanda *Demodex folliculorum* (*D. folliculorum*) ve *Demodex brevis* (*D. brevis*) akarlarının neden olduğu deri hastalığıdır. *Demodex* enfestasyonu çoğunlukla yüzde kıl köklerinde sebace ve meibomian bezlerine yerleşir. Bu çalışmanın amacı blefaritli hastalarda görülen *Demodex* enfestasyonunda yaş ve cinsiyet dağılım oranını belirlemektir.

Yöntemler: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarına 2011-2018 yılları arasında getirilen 335 blefarit, görme bozukluğu ve konjunktivit tanılı hastadan elde edilmiş selofanbantlara yapıştırılan kirpik örnekleri 1 saat içinde incelemeye alındı.

Bulgular: *D. folliculorum* 335 hastanın 143'ünde (%42,6) tespit edildi. *D. folliculorum* tespit edilen hastaların 50'si (%35) kadın, 93'ü (%65) erkekti. *D. folliculorum* görülen hastaların yaş ortalaması 64,1 iken görülmeyenlerin yaş ortalaması 52,7 olarak bulundu.

Sonuç: Blefaritli hastalarda yaş arttıkça *Demodex* görülme oranının arttığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: Blefarit, *Demodex*, enfestasyon

ABSTRACT

Objective: Demodicosis is a Skin disease in humans caused by *Demodex folliculorum* (*D. folliculorum*) and *Demodex brevis* (*D. brevis*) mites. *Demodex* infestation is mostly located in sebaceous and meibomian glands in the hair follicles. The aim of this study was to determine the age and sex distribution of *Demodex* infestation in patients with blepharitis.

Methods: Between 2011-2018, eyelashes from 335 patients with blepharitis, visual impairment or conjunctivitis attached to the cellophane tape were sent to the laboratory of Department of Medical Parasitology in Çukurova University Medical Faculty and were examined within 1 hour.

Results: *D. folliculorum* was detected in 143 (42.6%) of the 335 patients. Of the patients in whom *D. folliculorum* was detected, 50 (35%) were female and 93 (65%) were male. The mean age of patients with *D. folliculorum* was 64.1 years and the mean age of patients without *D. folliculorum* was 52.7 years.

Conclusion: In patients with blepharitis, the incidence of *Demodex* increases with age.

Keywords: Blepharitis, *Demodex*, infestation

GİRİŞ

İnsanda görülen *Demodex* enfestasyonuna, tanımlanan 100'den fazla tür içinden *Demodex folliculorum* (*D. folliculorum*) ve *Demodex brevis* (*D. brevis*) neden olur. Tüm yaşam sikluslarını parazit olarak yaşarlar. İnsanda en sık gözlenen zorunlu ektoparazitir. İnsandan insana temas yoluyla bulaşır. Yağ oranı yüksek olan yüzde genellikle nasal ve nasolabial kısım, yanaklar, dış kulak yolu, kaş ve kirpikler, başın arka kısmı, boyun, genital bölge omuzda bulunan kıl folikülü ve sebace bezler (pilosebase ünit) doğal yaşam alanlarıdır. İnsanda yaşa ve vücut bölgelerine göre değişen sayılarda *Demodex* akarlarının rastlanması normal olduğu bildirilmiştir. Kıl folikülü içinde *D. folliculorum* tek ya da kümeleşmiş şekilde birden

fazla bulunurken *D. brevis* daha derinde meibomian glandlarda tek olarak bulunur. *D. folliculorum* 0,4 mm, *D. brevis* 0,2 mm uzunluğundadır. *D. folliculorum* yaşam evresinde yumurta (ok şeklinde), larva, protonimf, nimf ve erişkin şekilleri vardır. Vücut Gnathosoma, podosoma, opistosoma kısımlardan oluşur. Gnathosoma kısmında palpler, selişer stylet ve stomodeum yapıları bulunur. Podosomada erişkinde 4, larvada 3 çift bacak bulunur. Son kısım tubuler yapıda opistosomadır. En dış kısımda bulunan exoskeleton yapı şeffaftır (1). *D. brevis* yaşam evresinde yumurta (yuvarlak) larva, protonimf, nimf ve erişkin şekiller görülür. *D. folliculorum* tüm yaşam evrelerinde *D. brevis*'ten daha büyüktür. *D. folliculorum*'da opistosoma vücudun 7/10'unu kaplarken *D. brevis*'te yarısı ya da 1/3 kadardır. Erişkin dişi kıl folikülüne



Geliş Tarihi/Received: 25.06.2019 Kabul Tarihi/Accepted: 13.12.2019

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Dr. İsmail Soner Koltas, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

E-Posta/E-mail: koltas@cu.edu.tr **ORCID ID:** orcid.org/0000-0003-4691-832X

ya da sebace bezlere yumurtalarını bıraktıktan 60 saat sonra larva, takip eden 40 saat sonra protonimfe, protonimfler 42 saat sonrasında deutonimflere dönüşür. Daha sonra foliküler açıklığa hareket eder ve 60 saat sonra erişkin olur. Bu evre 5 gün sürer, toplam yaşam evresi 15 gündür. *D. folliculorum* foliküler epitel hücreleriyle *D. brevis* sebace epitel hücreleri ile beslenir. Yaşın artmasıyla beraber sağlıklı bireylerde *Demodex* enfestasyon oranı %100 olarak bildirilmiştir (2,3).

D. folliculorum ilk kez Henle tarafından 1841 yılında saptanırken *D. brevis*'in ayrımı 1963 de Akbulutova yapmıştır. Blefaritli hastada *Demodex* enfestasyonunu Raehlmann 1898 de ilk kez tanımlamıştır (2). Blefaritli hastada kaşıntı, göz kuruluğu, yanma, yabancı cisim batması, kepeklenme, kirpik dökülmesi, kızarıklıkla seyreden klinik görülür. *Demodex* enfestasyonu görülen blefaritli hastalarda, kontrol grubuna göre daha fazla bakteri görüldüğü çalışmalar bulunmaktadır (4). Bununla birlikte Scaning elektron mikroskopunda akar üzerinde *Staphylococcus albus* gösterilmiş ve folikülden foliküle bakterileri taşıdıkları bildirilmiştir (5).

Yeni doğanlarda, çocuklarda, adolesan döneminde sebace bez sekresyonunun az olması sebebiyle görülme oranının düşük olduğu ancak immün supresif ve lösemi hastalarında görüldüğü bildirilmiştir.

Demodex tanısı temel olarak standart yüzeysel deri biopsisi ve kirpik epilasyonunun mikroskopta incelenmesine dayanır (3). *Demodex* enfestasyonu yaygın görülmesine rağmen henüz risk faktörleri hakkında az bilgi bulunmaktadır. Bu konuda yeni çalışmalar gerekliliği bulunmaktadır. Bu çalışma 2011-2018 yıllarında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarına blefarit, görme bozukluğu, konjunktivit gibi klinik şikayetlerle ulaşan kirpik örneklerinde *Demodex* dağılımını belirlemek amacıyla planlanmıştır.

YÖNTEMLER

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarına 2011-2018 yıllarında blefarit, konjunktivit, görme bozukluğu ön tanıları alan hastalardan kirpik epilasyonu ile alınan örneklerde *Demodex* aranmıştır. Şüpheli hastalardan alınan 4-5 kirpik örneği lam üzerine bırakılmış ve gliserin damlatılarak, selefona bant ile kapatılmıştır. 1 saat içinde ışık mikroskopunda X40 büyütmede incelemeye alınmıştır. Yumurta, larva veya erişkin bir *Demodex* görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz verilere istatistiki olarak ki-kare testi uygulanmıştır.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için ki-kare testi uygulandı; Yaş artışı ile *D. folliculorum* rastlama oranı istatistiki olarak arttığı görülmüştür ($p<0,001$). Cinsiyete göre dağılımın erkek hastalarda kadın hastalara göre istatistiki olarak daha büyük bulunmuştur ($p=0,001$). Cinsiyete göre yaş grupları incelenmesinde yaş artışı ile *D. folliculorum* rastlanma oranı artmaktadır ($p=0,001$). Yaş içinde cinsiyet etkisi ise 41-50 yaş aralığında *D. folliculorum* rastlanan erkek hastalarda daha fazla görülmüştür ($p=0,02$).

Tablo 1'de cinsiyete göre görülen *D. folliculorum* dağılımı, Tablo 2'de Yıllara göre ulaşan örneklerin yaş ve cinsiyete göre dağılımı ve yüzdeleri, Tablo 3'te *D. folliculorum* görülen ve görülmeyen yaş aralıklarına göre cinsiyet dağılımı verildi.

BULGULAR

Klinik şüphesi olan ortalama yaş aralığı 56,7 (4-98) olan 335 kişiden alınan örneklerden 143 (%42,6) hastada *D. folliculorum* erişkin, larva, nimf veya yumurtası saptanırken 192 (%57,4)'sinde rastlanmamıştır. *D. folliculorum* görülen hastalardan 50 (%32,9)'si kadın, 93(%50,8)'ü erkektir. Yaş ortalaması *D. folliculorum* görülenlerde 64,1 iken görülmeyenlerde 52,7 olarak bulunmuştur. İstatistiksel analiz için ki-kare testi uygulandı; Yaş artışı ile *D. folliculorum* rastlama oranı istatistiki olarak arttığı görülmüştür ($p<0,001$). Cinsiyete göre dağılımın erkek hastalarda kadın hastalara göre istatistiki olarak daha büyük bulunmuştur ($p=0,001$). Cinsiyete göre yaş grupları incelenmesinde yaş artışı ile *D. folliculorum* rastlanma oranı artmaktadır ($p=0,001$). Yaş içinde cinsiyet etkisi ise 41-50 yaş aralığında *D. folliculorum* rastlanan erkek hastalarda daha fazla görülmüştür ($p=0,02$).

Tablo 1'de cinsiyete göre görülen *D. folliculorum* dağılımı, Tablo 2'de Yıllara göre ulaşan örneklerin yaş ve cinsiyete göre dağılımı ve yüzdeleri, Tablo 3'te *D. folliculorum* görülen ve görülmeyen yaş

Tablo 1. *D. folliculorum* rastlanan hastaların cinsiyete göre dağılımı

Cinsiyet	Pozitif	Negatif	Toplam
Kadın	50 (%32,9)	102 (%67,1)	152
Erkek	93 (%50,8)	90 (%49,2)	183
Toplam	143 (%42,6)	192 (%57,4)	335

Tablo 2. *D. folliculorum* rastlanan hastaların yıllara göre yaş ortalaması ve cinsiyet dağılımı

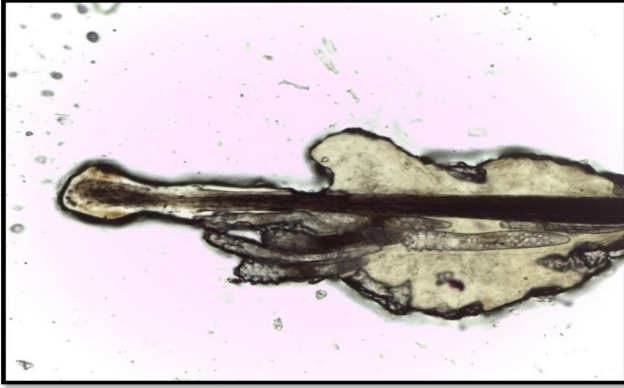
Yıl	<i>D. folliculorum</i> (+)	<i>D. folliculorum</i> (-)	Yaş ortalaması <i>D. folliculorum</i> (+)	Yaş ortalaması <i>D. folliculorum</i> (-)	<i>D. folliculorum</i> (+) Kadın	<i>D. folliculom</i> (+) Erkek
2011	28	55	59,1	48,9	8	20
2012	22	40	68,5	54,1	8	14
2013	6	15	67,5	51,3	4	2
2014	9	2	68,4	58,5	5	4
2015	7	10	56,4	55,9	2	5
2016	30	26	68,5	57,3	12	18
2017	26	22	62,5	51,9	7	19
2018	15	22	60,6	44,3	4	11
Toplam	143	192	64,1	52,7	50	93

aralıklarına göre cinsiyet dağılımı verildi. Şekil 1'de *D. folliculorum* erişkinleri verildi.

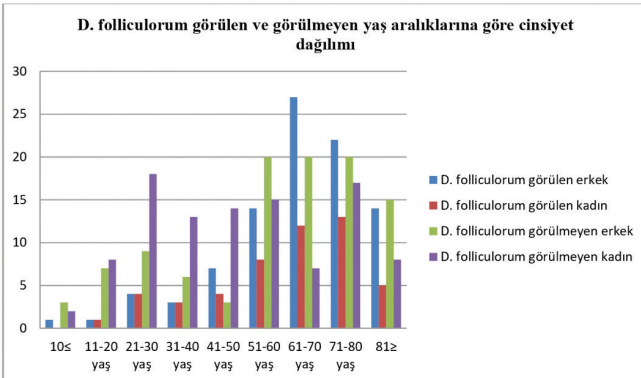
Şekil 2'de *D. folliculorum* görülen ve görülmeyen yaş aralıklarına göre cinsiyet dağılımı verildi.

TARTIŞMA

Demodex enfestasyonu dünya genelinde sosyo ekonomik duruma bakılmaksızın yaygın görülen kronik seyirli bir hastalıktır. Sebum miktarının yaşla beraber artması ve akar bulunan kişilerle daha çok



Şekil 1. *D. folliculorum* erişkinleri



Şekil 2. *D. folliculorum* görülen ve görülmeyen yaş aralıklarına göre cinsiyet dağılımı

maruz kalma olasılığının artışı ile yaşla beraber görülme sıklığı arttığı bildirilmiştir (5). Ülkemizde *Demodex* varlığı ve gözde yaptıkları semptomlar ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. İmmün sistem bozukluğunda ya da immün sistem baskılandığında blefarit görülen hastalarda *Demodex* rastlanması daha sık olduğu bildirilmiştir (6-10). Sağlıklı bireylerin kirpiklerinde kıl folikülü içinde şikayet oluşturmadan bulunabilir (8). Yüz bölgesinde *Demodex* bulunan hastaların kirpiklerinde de rastlandığı bildirilmiştir (3,6). Birçok araştırmacı gözdeki kepeklenme sebebinin *Demodex* enfestasyonu olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada kepeklenme görülen hastalarda sağlıklı gruba göre *D. folliculorum* ve *D. brevis* görülme oranı yüksek bulunmuştur (11). Deri yüzeyinde kalma süreleri kısıtlıdır. Gece ışık olmayan ortamda hareket ettikleri bilinmektedir. Yaşamları için optimal ısı 16-20 °C olduğu 0 °C altı ve 37 °C üzeri zararlı olduğu bildirilmiştir (12).

Birçok çalışmada cinsiyet farkının istatistiki olarak dikkat çekici bulunmadığı görüldü de bizim bulgularımızla benzer şekilde erkek hastalarda kadın hastalardan daha fazla rastlanma oranının olduğu çalışmalar da bulunmaktadır (13,14). Yaş grubunda rastlanma sıklığı 60 yaş üstü en sık görülen grup iken bulgularımızda 60-70 yaş en sık görülen yaş grubu olmuştur (14).

Kronik blefarit şikayetleri olan kaşıntı, yabancı cisim hassasiyeti, bulanık görme, yanma, kirpik dökülmesi, kepeklenme bulguları *Demodex* olan kişilerde görülmüştür. Bunlardan kirpiklerde gözlenen kepekler *Demodex* enfestasyonu için patognomonik olduğu vurgulanmıştır. Kaşıntı şikayeti ile parazit yoğunluğu arasındaki bağlantının dikkat çekici şekilde arttığı bildirilmiştir (15).

Blefarit görülen ve daha önce oküler patolojisi olmayan kontrol grubu arasında 10 yıl devam eden çalışmada prevalans %62,4 bulunmuştur. *Demodex* enfestasyonu görülenlerde kaşıntı ve kızarıklık sıklıkla görülürken kadın hastalarda fotofobi, erkek hastalarda göz kuruluğuna daha az sıklıkla rastlanmıştır. Deri hastalığı olmayanlara göre daha önce rozase öyküsü görülenlerde %13 oranında blefaritli ve *Demodex* rastlandığı bildirilmiştir. *Demodex* enfestasyonu 65 yaş üzerinde iki grupta %79,5 oranında bildirilmiştir (16). Benzer yönde *Demodex* enfestasyonu görülen hastalar içinde 60 yaş üzeri görülme oranı bu çalışmada %65 olarak bulundu.

Demodex enfestasyonu %47 oranında bulunan bir başka araştırmada blefarit, rozase ve romatoid artirit ile ilişkisi

Tablo 3. *D. folliculorum* rastlanan ve rastlanmayan yaş aralıklarına göre cinsiyet dağılımı

Yaş	<i>D. folliculorum</i> (+) Erkek	<i>D. folliculorum</i> (+) Kadın	<i>D. folliculorum</i> (-) Erkek	<i>D. folliculorum</i> (-) Kadın	Toplam
10≤	1	-	3	2	6
11-20	1	1	7	8	17
21-30	4	4	9	18	35
31-40	3	3	6	13	25
41-50	7	4	3	14	28
51-60	14	8	20	15	57
61-70	27	12	20	7	66
71-80	22	13	15	17	67
81≥	14	5	7	8	34
Toplam	93	50	90	102	335

incelenmiş, blefarit şikayeti olanlarda, olmayanlara göre *Demodex* rastlanması 2,5 kat, rozase görülenlerde görülme oranına göre 3 kat daha fazla görüldüğü bildirilmiştir. Buna göre *Demodex* enfestasyonu için blefarit ve rozase görülmesi risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Yaş gruplarında ise en düşük 1-25 yaş aralığında görülürken 70 yaş üstünde en yüksek prevalansa rastlanmıştır. Romatoid artrit tanılı immün supresif tedavi uygulanan hastalarında *Demodex* enfestasyonunun belirli etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Aynı araştırmacılar cinsiyet farkının enfestasyona etkisinin olmadığını bildirmişlerdir (17). Bir başka araştırma sonucunda blefaritli hastalarda rastlanma oranı %34,9 iken, blefarit olmayan hasta grubunda %17,4 olarak bulunmuştur (18). Çalışmamızda benzer yönlü 61-70 yaş grubunda en yüksek görülme oranını rastlandı. Yetmiş yaş üzerinde ise oran daha düşük görüldü. Bunu yaşlılarda sebum miktarının stabil olmasına bağlayan araştırmacılar bulunmaktadır. Bakımı sırasında yakınlarından geçtiğini düşündüğümüz 7 yaşında erkek hastadan alınan kirpik örneğinde çalışmamızda *D. folliculorum* görüldü. Yeni doğanlarda bakım sırasında temasla anneden geçişi yayınlarda bildirilmiştir. Yaşları 7-11 arası 12 kronik bleferoconjunktivit görülen hastada rastlandığı bildirilmiştir (19).

SONUÇ

Sonuç olarak kronik seyirli olan ve gözden kaçabilen *Demodex* enfestasyonunda etkeni tanımlamak, bakteriyel, mantar enfeksiyonlarından ve alerjik yangından ayırıcı tanısının yapılması gerekmektedir. Yüzde *Demodex* enfestasyonu rastlanan, rozaseli hastalarda blefarit sebebi olabileceği etkene yönelik tanı gerekliliği dikkate alınması faydalı olacaktır.

*Etik

Etik Kurul Onayı: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Kurulu tarafından onay alınmıştır (Karar no: 15).

Hasta Onayı: Hasta bilgilendirme formu ve anket hazırlanmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu tarafından değerlendirilmiştir.

*Yazarlık Katkıları

Dizayn: M.D., İ.S.K., Analiz veya Yorumlama: M.D., Literatür Arama: M.D., Yazan: M.D., İ.S.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Desch CE, Nutting WB. Morphology and functional anatomy of *Demodex folliculorum* (SIMON) of man. *Acarologia* 1977;19:422-62.

- Rufli, T, Mumcuoğlu Y. The hair follicle mites *D. folliculorum* and *D. brevis*: biology and medical importance. *Dermatologica* 1981;162:1-11.
- Aycan ÖM. *Demodex folliculorum* ve *D. brevis* enfestasyonlarını etkileyen faktörler. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2008.
- Zhu M, Cheng C, Yi H, Lin L, Wu K. Quantitative Analysis of the Bacteriain Blepharitis With *Demodex* Infestation. *Front Microbiol* 2018;9:1719.
- Lacey N, Kavanagh K, Tseng SCG. Under the lash: *Demodex* mites in human diseases. *Biochem (Lond)* 2009;1;31:2-6.
- Yula E, Aycan ÖM, Atambay M, Doğanay S, Daldal N, Tuzcu EA. Blefarit Etiyolojisinde *Demodex folliculorum* ve *D. brevis*'in Önemi Nedir? *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2013;33:420-4.
- Özçelik S, Sümer Z, Değerli S, Özyazıcı G, Hayta SB, Akyol M, et al. Kronik Böbrek Yetmezliği Olan Hastalarda *Demodex folliculorum* Görülme Sıklığı. *Türkiye Parazitolojisi Derg.* 2007;31:66-8.
- Aycan ÖM, Atambay M, Daldal N. Sağlıklı Kişilerin Kirpiklerinde *Demodex folliculorum* ve *Demodex brevis* Görülme Sıklığı. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2012;18:57-60.
- Emre S, Aycan ÖM, Atambay M, Bilak Ş, Konuşan İ, Doğanay S, et al. Kronik Blefarit Hastalarında *Demodex folliculorum* Görülme Sıklığı. *Türkiye Klinikleri J Ophthalmol* 2008;17:178-81.
- Türk M, Öztürk I, Şener AG, Küçükbay S, Afşar İ, Maden A. Comparison of Incidence of *Demodex folliculorum* on the Eyelash Follicle in Normal People and Blepharitis Patients. *Türkiye Parazitolojisi Derg* 2007;31:296-7.
- Zhong J, Tan Y, Li S, Peng L, Wang B, Deng Y, et al. The Prevalence of *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* in Cylindrical Dandruff Patients. *Journal of Ophthalmology* 2019; <https://doi.org/10.1155/2019/8949683>
- Zhao YE, Guo N, Wu LP. The effect of temperature on the viability of *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis*. *Parasitol Res* 2009;105:1623.
- Wesolowska M, Knysz B, Reich A, Blazejewska D, Czarnecki M, Gladysz A, et al. Prevalence of *Demodex* spp. in eyelash follicles in different populations. *Arch Med Sci* 2014;10:319-24.
- Zeytin E, Karakurt Y. Prevalence and Load of *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* (Acari: Demodicidae) in Patients With Chronic Blepharitis in the Province of Erzincan, Turkey. *J Med Entomol* 2019;56:2-9.
- Murphy O, O'Dwyer V, Lloyd-McKernan A. Ocular *Demodex folliculorum*: prevalence and associated symptoms in an Irish population. *Int Ophthalmol* 2018;39:405-17.
- Biernat MM, Rusiecka-Ziołkowska J, Piątkowska E, Helemejko I, Biernat P, Gosiniak G. Occurrence of *Demodex* species in patients with blepharitis and in healthy individuals: a 10-year observational study. *Jpn J Ophthalmol* 2018;62:628-33.
- Sedzikowska A, Oseka M, Skopinski P. The impact of age, sex, blepharitis, rosacea and rheumatoid arthritis on *Demodex* mite infection. *Arch Med Sci* 2018;353-6.
- İnceboz T, Yaman A, Över L, Öztürk AT, Akısu Ç. Diagnosis and Treatment of Demodectic Blepharitis. *Türkiye Parazitolojisi Derg* 2009;33:32-6.
- Liang L, Safran S, Gao Y, Sheha H, Raju VK, Tseng SC. Ocular demodicosis as a potential cause of pediatric blepharoconjunctivitis. *Cornea* 2010; 29:1386-91.

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde 2006-2018 Yılları Arasında Saptanan Patojenik Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı

The Distribution of Pathogenic Intestinal Parasites in Sivas Cumhuriyet University Faculty of Medicine Research and Application Hospital between 2006-2018

© Ahmet Duran Ataş

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

Cite this article as: Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde 2006-2018 Yılları Arasında Saptanan Patojenik Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Türkiye Parazitolojisi Dergisi 2020;44(1):25-30.

ÖZ

Amaç: Çalışmamızda, sosyokültürel ve ekonomik değişim içerisinde olan ilimizde, gastrointestinal yakınmalar ile hastanemize başvuran hastalarda saptanan bağırsak parazitlerinin dağılımları belirlenerek, bunların yaş, cinsiyet, yıl gibi değişkenlerle ilişkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Bu çalışmada, Ocak 2006-Aralık 2018 tarihleri arasında, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nin, farklı servis ve polikliniklerden çeşitli gastrointestinal şikayetlerle mikrobiyoloji/parazitoloji laboratuvarına yönlendirilen hastalarda intestinal patojenik parazitlerin dağılımı belirlenmiştir. Makroskopik muayene sonrası, 19,760 dışkı örneği, Nativ-lugol, gerek duyulduğunda flotasyon, sedimantasyon, trikrom ve modifiye asit-fast, Certest Combo Card test Crypto + Giardia+ Entamoeba (CerTest Biotec S.L., İspanya) yöntemleriyle; 5,814 selofanbant örneği ise direkt mikroskopi ile incelenmiş, sonuçlar laboratuvar bilgi sisteminden retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: İncelenen örneklerde, üç protozoon ve altı helmint türü saptanmıştır. En sık saptanan parazit protozoonlardan *Giardia intestinalis* (%6,9 n=1,363), helmintlerden *Enterobius vermicularis* (%10,8 n=627) olarak bulunmuştur. Çalışmamızda diğer intestinal parazitlerden *Entamoeba histolytica/dispar* (%1,5 n=289), *Cryptosporidium parvum* (%0,3 n=53), *Ascaris lumbricoides* (%0,2 n=41), *Trichuris trichiura* (%0,1 n=23), *Hymenolepis nana* (%0,1 n=21), *Taenia saginata* (%2,1 n=299), *Dicrocoelium dendriticum* (%0,01 n=1) oranlarında saptanmıştır.

Sonuç: Toprak kaynaklı parazitolozların oranında, 2006-2018 yılları içerisinde düşüşler saptanırken, yıllık pozitif olgu oranlarında istatistiksel olarak belirgin bir azalma görülmemiştir. Alt yapı hizmetlerinin geçen yıllar boyunca iyiye doğru gitmesine rağmen, sanitasyon/temizlik noksanlığı nedeniyle dışkı ile bulaşan parazitolozlar ilimizde halen önemini korumaktadır.

Anahtar Kelimeler: Parazitolojisi, patojenik intestinal parazit, insan, Sivas

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to determine the distribution of intestinal parasites in patients admitted to our hospital with gastrointestinal complaints in our city harboring sociocultural and economic changes, and to show the relationship between these parasites and variables such as age, sex and year.

Methods: The distribution of intestinal parasites in patients who suffered from gastrointestinal symptoms and were referred to our microbiology/parasitology laboratory from various clinics of the Sivas Cumhuriyet University Training and Research Hospital between January 2006 and December 2018 was determined. After macroscopic examination, 19,760 stool specimens were examined with Nativ-lugol, if necessary, flotation, sedimentation, trichrome and modified acid-fast, Certest Combo Card test Crypto + Giardia + Entamoeba (CerTest Biotec S.L., SPAIN) methods and 5,814 cellophane tape samples were examined with direct microscopy and the results were evaluated retrospectively.

Results: Three protozoa and six helminth species were identified in the samples studied. The most frequent parasite was found to be *Giardia intestinalis* (6.9% n=1,363) from protozoa and *Enterobius vermicularis* (10.8% n=627) from helminths. *Entamoeba histolytica/dispar* (1.5% n=289), *Cryptosporidium parvum* (0.3% n=53), *Ascaris lumbricoides* (0.2% n=41), *Trichuris trichiura* (0.1% n=23), *Hymenolepis nana* (0.1% n=21), *Taenia saginata* (2.1% n=299) and *Dicrocoelium dendriticum* (0.01% n=1) were among other intestinal parasites.

Conclusion: Between 2006-2018, while decreases in soil-borne parasitoses were observed, there was no statistically significant decrease in annual positive case rates. Despite the development of the infrastructure, parasitoses transmitted by lack of sanitation/cleaning, are still important in our province.

Keywords: Parasitosis, pathogenic intestinal parasite, human, Sivas



Received/Geliş Tarihi: 03.10.2019 Accepted/Kabul Tarihi: 10.03.2020

Address for Correspondence/Yazar Adresi: Ahmet Duran Ataş, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

Phone/Tel: +90 536 599 24 91 E-mail/E-Posta: ahmetduranatas@gmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0002-6274-414X

GİRİŞ

Dünya genelinde önemli bir halk sağlığı sorunu olarak yerini hala koruyan parazitözlerin görülme sıklığı ve oranları üzerinde; cinsiyet, yaş, sosyoekonomik düzey, kişisel hijyen alışkanlıkları, eğitim düzeyi, beslenme, toplu yaşanan yerlerde kalma, toplumsal gelenekler, yeme alışkanlıkları, alt yapı ve mevsimsel değişiklikler gibi faktörler etkili olmaktadır (1-3). Bağırsak parazitleri, karın ağrısı, bulantı, kusma, ishal, kabızlık, gelişme geriliği, gece işemesi, alerjik reaksiyonlar, zayıflama, dış gıcırdatma, ağızdan salya akması ve perianal bölge kaşıntısı gibi belirtilerle kendini gösterebilmekte, bazen de belirtisiz seyredebilmektedir (2,3). Herhangi bir kişide saptanan parazitin hafif veya ağır bir klinik tablo oluşturup oluşturumaması sosyokültürel, genetik veya beslenme faktörlerine bağlı olarak değişebilmektedir (4).

Parazitler, tropikal ve sub-tropikal kuşakta, günümüzde en yaygın enfeksiyon hastalıkları arasında yer almaktadır. Yüksek prevalansı, yaygın görülmesi ve insan sağlığını olumsuz etkilemesi nedeniyle, bağırsak parazit enfeksiyonları önemli halk sağlığı sorunudur (1,5).

Paraziter hastalıkların görülme sıklığı sosyoekonomik koşullara ve bölgelere göre değişimler gösterebilmektedir. Bu nedenle belli bölgelerdeki insan topluluğu içinde, parazit etkenlerinin sıklığının saptanması, önleyici girişimlerin, tedavi stratejilerinin geliştirilmesi yönünden önem taşımaktadır (4-6). Bizim çalışmamızda da ülkemizin, 28.488 km²lik büyük bir yüzölçümüne sahip, farklı sosyokültürel ve ekonomik değişim içerisinde olan Sivas ilinde, son 13 yılda, gastrointestinal yakınmalar ile hastanemize başvuran hastalarda belirlenen bağırsak parazitlerinin dağılımlarının belirlenmesi, bu dağılımların yaş, cinsiyet, yıl gibi değişkenlerle ilişkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızın, bölgemizin parazitik haritası ile ilgili olarak, literatüre katkı sunacağını düşünmekteyiz.

YÖNTEMLER

Ocak 2006-Aralık 2018 tarihleri arasında, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nin, farklı servis ve polikliniklerden çeşitli gastrointestinal şikayetlerle yönlendirilen 19,760 dışkı örneği, makroskopik muayene sonrası, Nativ-lugol, gerek duyulduğunda flotasyon, sedimantasyon, trikrom ve modifiye asit-fast, CERTEST Combo Card test *Crypto+Giardia+Entamoeba* (CerTest Biotec S.L., İspanya) yöntemleriyle; 5,814 selofanbant (SB) örneği ise direkt mikroskopi ile incelenmiş, sonuçlar laboratuvar bilgi sisteminden retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, patojen olmayan ve kayıtları düzensiz olan parazit türleri değerlendirme dışı bırakılmıştır.

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan oluru alınmıştır (07.08.2019 tarih ve 2019-08/08 No'lu Karar).

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS for Windows 23.0 programı kullanılmış, verilerin değerlendirilmesinde ki-kare testi ve regresyon analizi uygulanmıştır. $P < 0,05$ anlamlılık değeri olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızda 13 yıla ait incelenen tüm örnekler ve pozitif olgular cinsiyet ve pozitiflik görülme oranlarına göre değerlendirildiğinde, cinsiyet popülasyon dağılımı oranlarında ($p=0,629$) ve cinsiyetlere göre pozitiflik oranlarında ($p=0,789$), istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Tablo 1).

İncelenen tüm örnekler ve pozitif olgular yaş gruplarına göre istatistiksel olarak ki-kare testinde analiz edildiğinde; cinsiyet popülasyonlarında, yaş grubunun örnek sayısına göre, pozitif olgu sayısı oranında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmamıştır ($p=0,637$). Fakat, farklı yaş gruplarından, 0-15 ile 31-45 yaş grubu

Tablo 1. 2006-2018 yılları arası incelenen dışkı ve selofanbant örnek sonuçlarının cinsiyete göre dağılımı

Cinsiyet	Dışkı örnekleri				Selofanbant örnekleri				Toplam incelenen örnekler			
	İncelenen örnek		+		İncelenen örnek		+		İncelenen örnek		+	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Kadın	10,206	51,6	1,064	5,4	2,866	49,3	337	5,8	13,072	51,1	1,401	5,5
Erkek	9,554	48,4	1,026	5,2	2,948	50,7	327	5,6	12,502	48,9	1,353	5,3
Toplam	19,760	100	2,090	10,6	5,814	100	664	11,4	25,574	100	2,754	10,8

+: Pozitif olgu

Tablo 2. Yaş grupları ve cinsiyete göre toplam incelenen örnek (Dışkı+selofanbant) ve pozitiflik dağılım oranları

Yaş	Cinsiyet								
	Kadın (%)			Erkek (%)			Toplam		
	İncelenen olgu	+ Sayı	+%	İncelenen olgu	+ Sayı	+%	İncelenen olgu	+ Sayı	+%
0-15	3,902	451	3,5	4,163	461	3,7	8,065	912	3,6
16-30	3,823	397	3,0	3,454	363	2,9	7,277	760	3,0
31-45	2,077	199	1,5	1,794	181	1,5	3,871	380	1,5
46 ≥	3,270	354	2,7	3,091	348	2,8	6,361	702	2,7
Toplam	13,072	1,401	10,7	12,502	1,353	10,8	25,574	2,754	10,8

+: Pozitif olgu

arasında ($p=0,015$) ve 31-45 ile 46> yaş grubu arasında ($p=0,049$), istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmıştır (Tablo 2).

Dışkı ve SB inceleme sonuçlarına göre belirlenen patojenik bağırsak parazitlerinin tür dağılımına göre ve yıllara göre sayı ve yüzde dağılımları Tablo 3, Tablo 4, Tablo 5'te gösterilmiştir.

Yapılan regresyon analizinde, yıllara göre parazit türlerinin dağılımları değerlendirildiğinde; *A. lumbricoides* ($p=0,002$), *T. trichiura* ($p=0,011$), *H. nana* ($p=0,002$) görülmesinde azalma olduğu görülmüştür ($p<0,05$). *D. dendriticum*, 13 yılda sadece 1 kez kesin pozitif olarak saptanmıştır. *E. vermicularis* ($p=0,775$), *T. saginata* ($p=0,137$), *E. histolytica/dispar* ($p=0,018$), *G. intestinalis* ($p=0,108$), *C. parvum* ($p=0,001$) ile enfekte olgu görülmesinde, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmadığı belirlenmiştir

($p>0,05$) (Tablo 4, Tablo 5). *C. parvum*, 2009 sonrasında rutin laboratuvar testlerine dahil edilmeye başlanmıştır (Tablo 4).

Toplam dışkı örneklerinin inceleme sonuçlarının, yıllara göre regresyon analizinde, pozitif olgu oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p=0,836$) (Şekil 1).

Şekil 1 ve Şekil 2'de, 2006-2018 yılları arası, sırasıyla dışkı ve SB örneklerinde pozitif çıkan bağırsak parazitlerinin, o yıl incelenen toplam örneklere göre yüzde oranları gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Bağırsak parazitlerinin kaynağı, parazitözlu insanlar olup, kist, ookist, yumurta ve larvaların çevreye yayılmasıyla, doğrudan,

Tablo 3. 2006-2018 yılları arasında saptanan patojen bağırsak paraziti türlerinin dağılım oranları

2006-2018 Dışkı örnekleri						
Parazitler	Kadın (n=10,206)		Erkek (n=9,554)		Toplam (n=19,760)	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
<i>Giardia intestinalis</i>	590	5,8	773	8,1	1.363	6,9
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	139	1,4	150	1,6	289	1,5
<i>Cryptosporidium parvum</i>	30	0,3	23	0,2	53	0,3
<i>Ascaris lumbricoides</i>	28	0,3	13	0,1	41	0,2
<i>Trichuris trichiura</i>	16	0,2	7	0,1	23	0,1
<i>Hymenolepis nana</i>	10	0,1	11	0,1	21	0,1
<i>Taenia saginata</i>	188	1,8	111	1,2	299	1,5
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	-	0,0	1	0,01	1	0,01
2006-2018 Selofanbant örnekleri						
	Kadın(n=2,866)		Erkek(n=2,948)		Toplam (n=5,814)	
<i>Taenia saginata</i>	23	0,8	14	0,5	37	0,6
<i>Enterobius vermicularis</i>	377	13,2	250	8,5	627	10,8

Tablo 4. 2006-2018 yılları arasında dışkıda saptanan patojen bağırsak paraziti türlerinin dağılım oranları

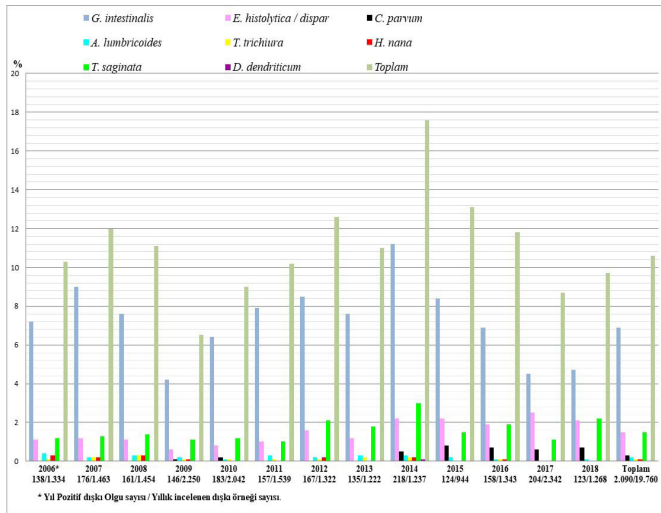
Yıl	G.i.* Sayı (%)	E.h.* Sayı (%)	C.p.** Sayı (%)	A.l.* Sayı (%)	T.t.* Sayı (%)	H.n.* Sayı (%)	T.s.* Sayı (%)	D.d.* Sayı (%)	+/n*** (%)
2006	96 (7,2)	15 (1,1)	0 (0,0)	5 (0,4)	2 (0,1)	4 (0,3)	16 (1,2)	0 (0,0)	138/1,334 (10,3)
2007	131 (9,0)	17 (1,2)	0 (0,0)	3 (0,2)	3 (0,2)	3 (0,2)	19 (1,3)	0 (0,0)	176/1,463 (12,0)
2008	111 (7,6)	16 (1,1)	0 (0,0)	5 (0,3)	4 (0,3)	4 (0,3)	21 (1,4)	0 (0,0)	161/1,454 (11,1)
2009	95 (4,2)	13 (0,6)	3 (0,1)	5 (0,2)	3 (0,1)	3 (0,1)	24 (1,1)	0 (0,0)	146/2,250 (6,5)
2010	131 (6,4)	17 (0,8)	4 (0,2)	3 (0,1)	2 (0,1)	1 (0,01)	25 (1,2)	0 (0,0)	183/2,042 (9,0)
2011	121 (7,9)	16 (1,0)	0 (0,0)	4 (0,3)	1 (0,1)	0 (0,0)	15 (1,0)	0 (0,0)	157/1,539 (10,2)
2012	112 (8,5)	21 (1,6)	0 (0,0)	2 (0,2)	1 (0,1)	3 (0,2)	28 (2,1)	0 (0,0)	167/1,322 (12,6)
2013	93 (7,6)	15 (1,2)	0 (0,0)	3 (0,3)	2 (0,2)	0 (0,0)	22 (1,8)	0 (0,0)	135/1,222 (11,0)
2014	138 (11,2)	27 (2,2)	6 (0,5)	4 (0,3)	3 (0,2)	2 (0,2)	37 (3,0)	1 (0,1)	218/1,237 (17,6)
2015	79 (8,4)	21 (2,2)	8 (0,8)	2 (0,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	14 (1,5)	0 (0,0)	124/944 (13,1)
2016	92 (6,9)	26 (1,9)	10 (0,7)	2 (0,1)	2 (0,1)	1 (0,1)	25 (1,9)	0 (0,0)	158/1,343 (11,8)
2017	105 (4,5)	59 (2,5)	13 (0,6)	2 (0,01)	0 (0,0)	0 (0,0)	25 (1,1)	0 (0,0)	204/2,342 (8,7)
2018	59 (4,7)	26 (2,1)	9 (0,7)	1 (0,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	28 (2,2)	0 (0,0)	123/1,268 (9,7)
Topl.	1.363 (6,9)	289 (1,5)	53 (0,3)	41 (0,2)	23 (0,1)	21 (0,1)	299 (1,5)	1 (0,01)	2,090/19,760 (10,6)

* G.i.: *Giardia intestinalis*, E.h.: *Entamoeba histolytica/dispar*, C.p.: *Cryptosporidium parvum*, A.l.: *Ascaris lumbricoides*, T.t.: *Trichuris trichiura*, H.n.: *Hymenolepis nana*, D.d.: *Dicrocoelium dendriticum*, **: *C. parvum* 2009 sonrasında rutin testlere dahil edilmeye başlanmıştır, ***: Yıl toplam dışkıda pozitif olgu/yıl incelenen toplam dışkı örnek sayısı (Yıl dışkıda saptanan toplam parazit %)

Tablo 5. 2006-2018 yılları arasında selofanbant'ta saptanan bağırsak paraziti türlerinin dağılım oranları

Yıl	<i>E. vermicularis</i> Sayı (%)	<i>T. saginata</i> Sayı (%)	+/n (%)
2006	30 (11,2)	2 (0,7)	32/268 (11,9)
2007	42 (12,3)	2 (0,6)	44/342 (12,7)
2008	50 (13,1)	2 (0,5)	52/383 (13,6)
2009	45 (9,3)	1 (0,2)	46/483 (9,5)
2010	67 (16,5)	4 (1,0)	71/405 (17,5)
2011	41 (8,2)	3 (0,6)	44/503 (8,7)
2012	46 (9,2)	3 (0,6)	49/500 (9,8)
2013	33 (7,1)	1 (0,2)	34/468 (7,3)
2014	115 (23,1)	6 (1,2)	121/498 (24,3)
2015	35 (7,8)	1 (0,2)	36/446 (8,1)
2016	35 (7,2)	3 (0,6)	38/487 (7,8)
2017	45 (8,8)	4 (0,8)	49/513 (9,6)
2018	43 (8,3)	5 (1,0)	48/518 (9,3)
Toplam	627 (10,8)	37 (0,6)	664/5814 (11,4)

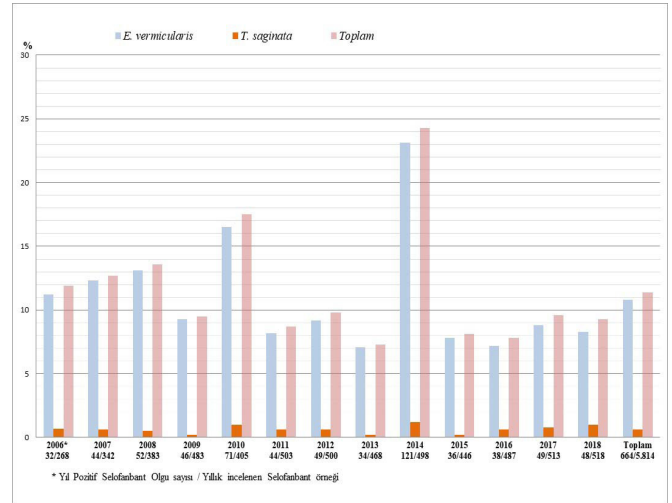
***: Yıl toplam selofanbant'ta (SB) pozitif olgu/yıl incelenen toplam SB örnek sayısı (Yıl SB'da saptanan toplam parazit %)



Şekil 1. 2006-2018 yılları arası, dışkı örneklerinde pozitif çıkan patojenik bağırsak parazitlerinin, o yıl incelenen toplam dışkı örneklerine göre yüzde oranları (%)

toprakta bir gelişim geçirdikten sonra ya da başka bir canlıyı aracı olarak kullanmasıyla gerçekleşebilmektedir (2,3). Bağırsak parazitlerinde en sık bulaş yolunun, enfektif şekillerin ağız yolu ile alınması olduğu bildirilmektedir (4,7). Bağırsak paraziti saptanma oranını etkileyen faktörlerden bazıları sosyoekonomik ve sosyokültürel nedenler olup bölgelere göre değişmektedir (5,6,8).

Tüzemen ve ark. (9) bildirdiğine göre farklı ülkelerden bildirilen araştırma sonuçlarından; Yunanistan'da %11,4, Katar'da %8,7, Nepal'de %30,1, İsveç'te %17,0 oranında bağırsak paraziti pozitifliği saptanmış; yurtdışı başka bazı çalışmalarda ise, Filistin'de %32,0-41,5 (10), Sudan'da %62,5 (11), İran'da %19,3 (12), Arnavutluk'ta %24,9 (13), Panama'da %47,4 (14) olarak tespit edilmiştir.



Şekil 2. 2006-2018 yılları arası, selofanbant örneklerinde pozitif çıkan bağırsak parazitlerinin, o yıl incelenen toplam selofanbant örneklerine göre yüzde oranları (%)

Subtropikal kuşakta yer alan yurdumuzda bağırsak parazitlerinin yaygınlığı, coğrafi farklılık göstermektedir. Toplu yaşanan yerlerde yaygınlığının arttığı; sosyoekonomik durum, iklim şartları, altyapı sorunları hatta kullanılan yöntemlere göre ise değiştiği bildirilmektedir (4). Ülkemizin farklı coğrafi bölgelerindeki üniversite hastanelerinde bağırsak parazitlerinin yaygınlığı ile ilgili; parazitlerin görülme sıklığı, farklı gruplara (yaş, klinik, başvuru sayısı vb.), kullanılan laboratuvar metodu, bölgesel farklılıklar, sosyoekonomik düzey ve patojen olanların çalışmaya dahil edilip edilmemesi vb. göz önünde bulundurularak, birçok çalışma yapılmıştır (4,6-9,15-27). Marmara Bölgesi'nde %3,6-10,7 (4,8,9,25); Ege Bölgesi'nde %9,3-13,2 (6,21); Akdeniz Bölgesi'nde %21,0 (19); İç Anadolu Bölgesinde %10,5-28,5 (16,17,20,24,26); Karadeniz Bölgesi'nde %2,2 (18); Doğu Anadolu Bölgesi'nde %17,2- 34,1 (7,23); Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde %14,9-36,4 (22,27) oranlarında parazit saptanmıştır.

Sivas'ta 1993-2006 yılları arasında yapılan çalışmalarda bağırsak paraziti saptanma oranı %10,5-28,7 oranında bildirilmiştir (16,20,24). Bizim çalışmamızda ise bu oran %10,8 olarak bulunmuştur. Bu veriler ışığında, özellikle 1999-2018 yılları arasında, parazit saptanma oranında bazı değişimler olsa da, büyük bir azalma olmadığı gözlenmektedir. Özellikle patojen bağırsak parazitlerinin ele alındığı bu çalışmada, en sık saptanan parazitler, protozoonlardan *G. intestinalis* (%6,9), helmintlerden ise *E. vermicularis* (%10,8) olup, Sivas'ta yapılan diğer çalışmalarda sırasıyla, 1993-2006 yılları arasında %12,4, %5,9 (16), 1999-2000 yılları arasında %5,5, %3,6 (24), 2002-2004 yılları arasında da %3,7 ve %5,4 olarak bildirilmiştir (20). Ülkemizin diğer birçok bölgesinde yapılan çalışmalarda protozoonlardan *G. intestinalis* yine en fazla saptanan tür olup, önemini halen korumaktadır (8,9,17,19,21,23,25). Oysa Ekşi ve ark. (22) Gaziantep'te en sık *E. histolytica/dispar*'a, Zeyrek ve ark. ise Şanlıurfa'da en sık *A. lumbricoides*'e rastlandığını bildirmekte dirler (27). Görüldüğü üzere sonuçlarımız, ülkemizin diğer bölgelerinde yapılan birçok çalışma ile uyumluluk göstermektedir. İlimizin altyapı hizmetlerinde önemli iyileşmeler olsa da; yıllık veriler incelendiğinde, özellikle 2014-2018 yılları arasında bu türden protozoon hastalıklarında, az da olsa yükselme görülmektedir (Şekil 1 ve Şekil 2). Bu durumun, son 5-6 yıldır gerek ülke içinden,

gerekse de ülke dışından (Afgan, Suriyeli, vb. mülteciler) göçler ve bu göçmenlerin hastanemizden sağlık hizmeti almalarının bir yansıması olabileceğini düşünmekteyiz.

E. histolytica/dispar'ın dünya nüfusunun %10,2'sini etkilediği bildirilmektedir (5,7). Sivas'ta Değerli ve ark. tarafından 2002-2004 yılları arasında %2,4 oranında saptanan *E. histolytica/dispar* (20), çalışmamızda %1,5 olarak bulunmuştur. Ülkemizin diğer farklı bölgelerinde, 2003-2012 yılları arasında kapsayan farklı çalışmalarda, *E. histolytica/dispar* oranı %0,2-13,4 arası saptanmıştır (4,6-9,17,19,21-23,25-27). Akyar ve ark. (15) İstanbul'da yaptıkları çalışmada %5,2 oranında *E. histolytica/dispar* oranına rastlayarak "mikroskopik inceleme yönteminin, yüksek özgüllük, düşük duyarlılık gösterdiğini, yapılan çalışmalarda dışkıda antijen saptanmasının kültür ve izoenzim saptanması kadar duyarlı ve özgül olduğunu" bildirmişlerdir. Ülkemiz dışından, Panama'da yapılan çalışmada hiç *E. histolytica/dispar*'a rastlanmadığı (14), diğer farklı yurtdışı araştırmalarda ise %0,72-40,6 oranlarında pozitifliğe rastlandığı bildirilmiştir (10,13,28).

Çalışmamızdaki hasta popülasyonunun %51,1'ini kadınlar, %48,9'unu ise erkekler oluşturmuş; pozitif olgular kendi içerisinde değerlendirildiğinde, kadın (%10,7) ve erkek (%10,8) oranları birbirine yakın bulunmuştur ($p>0,05$). Bu konuda çalışmamızı destekleyen çalışmalar bulunduğu gibi (7,18,23,27); kadın (19,20) ve erkek popülasyonu arasındaki farkın anlamlı olduğunu gösteren araştırmalara da rastlanmaktadır (4,6,16,17,21,22,24,25).

İncelenen 25,574 örnekten, pozitif çıkan 2,754 parazit olgusunun 1,049 (%38,1)'unda helmint, 1,705 (%61,9)'inde de protozoon enfeksiyonu saptanmıştır. Bulunan değerler, ilimizde yapılan diğer çalışmalara benzerlik göstermektedir (16,20,24). Diğer birçok yurtiçi ve yurtdışı araştırmacı da protozoon oranlarının, helmintlere göre daha fazla görüldüğünü bildirilmiştir (4,11,13,17,28).

Geohelmintlerden *A. lumbricoides* ve *T. trichiura*'da yıllar içerisinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir ($p<0,05$). Bu türden parazitler bazı yerlerde hala önemini korurken (13,27,28); birçok çalışma, bizim çalışmamızda olduğu gibi, toprakla bulaşan helmintlerin azalmakta olduğunu göstermektedir (4,8,17,20,26). Özellikle de çocukların ve gençlerin, internet, bilgisayar gibi oyunlarla meşgul olup; dışarıda toprakla oyun oynama vakitlerini azaltmaları, okul bahçelerinin asfaltla kaplanması, park alanlarının suni malzeme ile kaplanması sonucu, toprakla temasın azalması, bu türden parazitlerdeki düşüşün nedenlerinden olabileceğini akla getirmektedir.

E. vermicularis'in, yurdumuzda özellikle çocukluk yaş grubunda, sık görülen bir helmint olduğu bildirilmektedir (3,4,6,7,16,20). *E. vermicularis* prevalansı, yurdumuzun farklı bölgelerinde %2,0-%34,4 arasında değişmektedir (4,8,16,18-21,24). Çalışmamızda 5,814 SB örneğinin 627'sinde, %10,8 oranında *E. vermicularis* yumurtası saptanmıştır. Bu oran yurdumuzdaki birçok çalışmadan ve merkezimizde önceki yıllarda yapılan çalışmaların, verilerinden daha yüksek bulunmuştur (4,8,16,18,19,21,24). Ataş ve ark. (16) ise 1993-2006 yılları arasında Sivas'ta yaptıkları çalışmada *E. vermicularis*'e, %34,4 gibi yüksek bir oranda, rastlamışlardır.

Çalışmamızda, %2,1 oranında belirlenen *T. saginata* oranı, çiğ köfte vb. çiğ veya az pişmiş et tüketimi alışkanlığının fazla olduğu bazı illerinden yüksek bulunmuştur. Bu oranı Cengiz ve ark. (7) Van'da %0,4, Zeyrek ve ark. (27) Şanlıurfa'da %0,1, Ekşi ve ark. (22) Gaziantep'te %0,1, Çulha (19) Hatay'da %0,7 olarak bulmuşlardır. Sadece Kuk ve ark. (23) Elazığ'daki çalışmalarında (%2,4), çalışmamızdan yüksek bulunmuştur.

Yıllara göre parazit görülme sıklığı ele alındığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Şekil 1 ve Şekil 2). Usluca ve ark. (6) 2005-2008 arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadıklarını, "daha önceki çalışmalarının sonuçlarıyla karşılaştırıldığında da parazit saptanma oranlarında azalma olmadığını" belirtmişlerdir. Bu gibi nedenlerle, bağırsak parazitlerinin ülkemiz için halen önemli bir sağlık sorunu olmaya devam ettiği, bizim çalışmamızın yanı sıra, diğer birçok çalışmanın sonuçlarından da anlaşılmaktadır (4,6,7,25-27).

Daha önce yapılan çalışmalarda, intestinal parazitlerin özellikle çocuk ve genç erişkinlerde daha yüksek oranda görüldüğü; bunun da temizlik alışkanlığının özellikle bu yaş grubunda tam olarak gelişmemesine bağlı olabileceğinin düşünüldüğü bildirilmiştir (4,6,11,12,15,21,22,25). Çalışmamızda da özellikle 0-30 yaş grubu arasına yoğunlaşma olduğu, 31-45 arasında düşüş olduğu, 46 ve üzeri tekrar yükselme olduğu görülmektedir.

SONUÇ

Parazitolojinin etkin olarak tanınması ve başarıyla tedavisi için uygun örnek kabulü ve duyarlılığı yüksek inceleme yöntemlerinin kullanımı yaygınlaştırılmalıdır. Yıllar arasında, pozitif olgu oranlarında belirgin bir farklılık bulunamamıştır. Her ne kadar toprak kaynaklı parazitolojinin oranında düşmeler görülmüşse de, alt yapı hizmetlerinin iyiye doğru gitmesine rağmen, sanitasyon/temizlik noksanlığı dışı ile bulaşan parazitolojiler, ilimizde halen önemini korumaktadır. Benzer çalışmaların ileriki dönemlerde de, farklı zaman aralıklarında tekrarlanması, bölgemizde güncel parazit hastalıklarının dağılımının saptanması ve sağlıklı bireylerin yetiştirilmesi açısından önemli olacaktır.

TEŞEKKÜR

İstatistiklerin yapılmasında yardımcı olan Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Yalçın Karagöz'e teşekkür ederiz.

* Etik

Etik Kurul Onayı: Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan olur alınmıştır (07.08.2019 tarih ve 2019-08/08 No'lu Karar).

Hasta Onayı: Dr.Ahmet Duran Ataş'ın Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi bünyesinde bulunan 2006-2018 yılları arasına ait parazitoloji laboratuvar verilerini hasta mahremiyeti ve gizliliğine uymak koşulu ile bilimsel olarak kullanmasında bir sakınca bulunmamaktadır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu tarafından değerlendirilmiştir.

Finansal Destek: Herhangi bir yerden, herhangi bir finansal destek alınmamıştır. Analizler için gerekli bilgisayar, kağıt, yazıcı vb. kendi imkanlarımızla sağlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Özcel MA. Genel Parazitoloji. In, Özcel MA, Özbel Y, Ak M (Eds): Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları.s. 3-76, Meta Basım, İzmir. 2007.
2. Saygı G. Temel tıbbi parazitoloji. Esnaf Ofset Matbaacılık, Sivas; 1998.
3. Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. 5. Baskı İst. Üniv. Cerrahpaşa Tıp Fak. Yay. No: 15, İstanbul. 1995.
4. Alver O, Özakın C, Töre O. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde 2009-2010 Yıllarında Saptanan Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Türkiye Parazit Derg 2012;36:17-22.

5. World Health Organisation, 1999. Monitoring Helminth Control Programmes (WHO/VDC/SIP/99.3)
6. Usluca S, İnceboz T, Över L, Tuncay S, Yalçın G, Arcak SŞ, et al. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde 2005-2008 Yılları Arasında Saptanan Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Türkiye Parazit Derg 2010;34:2731.
7. Cengiz TZ, Yılmaz H, Beyhan YE, Çiçek M. A Comprehensive Retrospective Study: Intestinal Parasites in Human in Van Province. Türkiye Parazit Derg 2019;43:70-3.
8. Köksal F, Başlantı İ, Samastı M. A Retrospective Evaluation of the Prevalence of Intestinal Parasites in Istanbul, Turkey. Türkiye Parazit Derg 2010;34:16671.
9. Tüzemen NÜ, Alver O, Ener B. Uludağ Üniversitesi Parazitoloji Laboratuvarında 2011-2015 Yılları Arasında İncelenen Dışkı Örneklerinde Paraziter İnfeksiyon Sıklığının Araştırılması. Flora 2017;22:160-5.
10. Bdir S, Adwan G. Prevalence of intestinal parasitic infections in Jenin Governorate, Palestine: a 10-year retrospective study. Asian Pac J Trop Med 2010;745-7.
11. Mohammed HMN, Siddig HS, Mohammed BA, Mohammed AE, Ahmed HH, Abdalgadir HF, et al. Prevalence of Intestinal Parasitic Infections among Patients Attended to Alribat University hospital, Khartoum State, Sudan, 2017. Cohesive J Microbiol Infect Dis 2019;2:1-6.
12. Sayyari AA, Imanzadeh F, Bagheri Yazdi SA, Karami H, Yaghoobi M. Prevalence of intestinal parasitic infections in the Islamic Republic of Iran. East Mediterr Health J 2005;11:377-83.
13. Spinelli R, Brandonisio O, Serio G, Trerotoli P, Ghezzani F, Carito V, et al. Intestinal parasites in healthy subjects in Albania. Eur J Epidemiol 2006;21:161-6.
14. Sandoval NR, Rios N, Mena A, Fernández R, Perea M, Manzano-Román R, et al. A survey of intestinal parasites including associated risk factors in humans in Panama. Acta Tropica 2015;147:54-63.
15. Akyar I, Gültekin M. Dışkı Örneklerinde ELISA Yöntemi ile Saptanan *Entamoeba histolytica* ve *Giardia* Antijenlerinin Beş Yıllık Sürveyansı. Türkiye Parazit Derg 2012;36:12-6.
16. Ataş AD, Alim A, Ataş M. Sivas Belediyesi Çevre-Gıda ve Tıbbi Tahlil Laboratuvarına 1993-2006 Yıllarında Başvuran Hastalarda Bağırsak Parazit Dağılımlarının İncelenmesi. Türkiye Parazit Derg 2008;32:59-64.
17. Yazar S, Kızılkaya Ü, Kuk S, Ateş S, Hamamcı B, Gedikbaş T, et al. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında 2009-2010 Yılları Arasında Saptanan Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2012;18:A93-A96.
18. Çiçek AÇ, Direkel Ş, Gündoğdu DZU, Ertürk A, Sarı A. Rize İlinde Üniversite ve Devlet Hastanelerine Başvuran Hastalarda Görülen Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Int J Basic Clin Med 2013;1:78-82.
19. Çulha G, Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. Türkiye Parazit Derg 2006;30:302-4.
20. Değerli S, Özçelik S, Çeliksöz A. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına Başvuran Hastalarda Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Türkiye Parazit Derg 2005;29:116-9.
21. Düzyol D, Kilimcioglu AA, Özyurt BC, Özkan H, Girginkardeşler N. Celal Bayar Üniversitesi Hastanesi Parazitoloji Polikliniği'nde 2006-2010 Yılları Arasında Saptanan Bağırsak Parazitlerinin İnsidansı. Türkiye Parazit Derg 2012;36:147-51.
22. Ekşi F, Doğan Y, Özdemir G, Zer Y, Bayram A, Karşlıgil T. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Bir Yıllık Sürede Gaita Örneklerinde Saptanan Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Fırat Tıp Derg 2013;18:235-8.
23. Kuk S, Erensoy A, Keleştemur N. Son Bir Yıl İçinde Fırat Üniversitesi Fırat Tıp Merkezi Parazitoloji Laboratuvarında Koproparazitolojik İnceleme Sonuçları. Fırat Tıp Derg 2006;11:113-5.
24. Oğuztürk H, Çeliksöz A, Değerli S, Özçelik S. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji laboratuvarına bir yıl içerisinde başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. Türkiye Parazit Derg 2001;25:151-4.
25. Tamer GS, Çalışkan Ş, Willke A. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarına Başvuran Hastalarda Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Türkiye Parazit Derg 2008;32:126-9.
26. Yaman O, Yazar S, Özcan H, Çetinkaya Ü, Gözkenç N, Ateş S, et al. 2005-2008 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. Türkiye Parazit Derg 2008;32:266-70.
27. Zeyrek FY, Özbilge H, Yüksel ME, Zeyrek CD, Sırmatal F. Şanlıurfa'da Parazit Faunası ve ELISA Yöntemi ile Dışkıda *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* Sıklığı. Türkiye Parazit Derg 2006;30:95-8.
28. Pal SK, Bhattacharya R, Bhattacharya P, Paul UK. Intestinal parasitic infection in adult patients attending tertiary care hospitals: a retrospective study. Int J Adv Med 2017;4:1458-62.

Antihelmintik Aktivite için Bir Model Organizma: *Caenorhabditis elegans* ve *Nigella sativa*

A model Organism for Antihelminthic Activity: Caenorhabditis elegans and Nigella sativa

© Necati Özpınar

Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Acil Yardım ve Afet Yönetimi Bölümü, Acil Yardım ve Afet Yönetimi Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

Cite this article as: Özpınar N. Antihelmintik Aktivite için Bir Model Organizma: *Caenorhabditis elegans* ve *Nigella sativa*. Türkiye Parazitoloj Derg 2020;44(1):31-5.

Öz

Amaç: Çalışmamızda *Nigella sativa*'nın antihelmintik aktivitesi, bir model organizma olan *Caenorhabditis elegans*'lar (*C. elegans*) üzerinde test edilmiştir.

Yöntemler: Çalışma için N2 (yaban tip) *C. elegans* ve *Escherichia coli* OP50, Minnesota Üniversitesi Ceanorhabditis Genetik Merkezi'nden satın alındı. *C. elegans*'lar NGM (Nematode Growth Medium) katı kültür ortamında büyütüldü. Senkronizasyonu yapılarak erişkin nematotlar %1, %0,1, %0,01, %0,001, %0,0001'lik konsantrasyonlarda *Nigella sativa* tohum yağına maruz bırakıldı. Çalışmada, 18 gün boyunca, deney ve kontrol grubundaki bütün nematotlar ölüncüye kadar her gün canlı ve ölü nematotlar kaydedildi. Yutak pompalaması duran nematot ölü olarak kaydedildi.

Bulgular: Çalışma bulgularımız incelendiğinde %1'lik konsantrasyonda petrilereki bütün nematotların dördüncü gün sonunda öldüğü görüldü. Buna ilaveten %0,1'lik konsantrasyonda beşinci gün sonunda hiç canlı nematoda rastlanmazken, %0,01'lik konsantrasyonda ise 13'üncü gün sonunda petrilereki bütün nematotların öldüğü tespit edildi. Veriler istatistiksel olarak incelendiğinde %0,1, %0,01, %0,001'lik konsantrasyon grupları ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlıydı ($p < 0,05$).

Sonuç: Helmintlerin genellikle makroskopik boyutta olması ve birçoğunun kültürünün yapılarak laboratuvar ortamında üretilmemesi bilimsel çalışmalar için büyük bir engeldir. Bu çalışmada, antihelmintik aktivite çalışmalarında *C. elegans*'ın iyi bir model olabileceği ve *Nigella sativa*'nın antihelmintik etkisi gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Caenorhabditis elegans*, antihelmintik aktivite, *Nigella sativa*

ABSTRACT

Purpose: In our study, antihelminthic activity of *Nigella sativa* was tested on a model organism *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*).

Methods: N2 (wild type) *C. elegans* and *Escherichia coli* OP50 were purchased from the University of Minnesota, Ceanorhabditis Genetic Center for the study. *C. elegans* were grown in NGM (Nematode Growth Medium) solid culture medium. After synchronization, nematodes in adult form were exposed to *Nigella sativa* seed oil at concentrations of 1%, 0.1%, 0.01%, 0.001% and 0.0001%. The study continued for 18 days until all nematodes in the experimental and control groups died. Alive and dead nematodes were recorded every day. The nematodes in which pharyngeal pumping stopped was recorded dead.

Result: According to our findings, all nematodes died at the end of the fourth day at a concentration of 1%. In addition, no alive nematod was observed at the end of the fifth day at concentration of 0.1%; whereas at the end of the 13th day all nematodes died at concentration of 0.01%. When the data were analyzed statistically, the difference between at concentrations of 0.1%, 0.01%, 0.001% and the control group was significant ($p < 0,05$).

Conclusion: The fact that helminths are usually macroscopic in size and most of them cannot be produced in the laboratory by culturing is a major obstacle for scientific studies. Our study has shown that *C. elegans* can be a good model in studies of antihelminthic activity and that *Nigella sativa* has an anthelmintic effect.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, antihelminthic activity, *Nigella sativa*



Received/Geliş Tarihi: 10.01.2020 Accepted/Kabul Tarihi: 04.03.2020

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Necati Özpınar, Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Acil Yardım ve Afet Yönetimi Bölümü, Acil Yardım ve Afet Yönetimi Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

Tel/Phone: +90 537 620 77 26 E-Posta/E-mail: necatizpınar@gmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0002-7317-885X

GİRİŞ

Helmintiasis, özellikle gelişmekte olan ülkelerde oldukça yaygın, birçoğu zoonoz, önemli paraziter hastalıklardandır. Helminth enfeksiyonları, gelişme çağlarında fiziksel büyüme ve entelektüel gelişim geriliğinin en önemli nedenlerinden biridir (1). Bununla birlikte, eğitim, ekonomik kayıp ve halk sağlığı önemine rağmen, tıp ve uluslararası sağlık kuruluşları tarafından büyük ölçüde ihmal edilmektedir (1). Yapılan çalışmalar helmint enfeksiyonlarının, infekte çocukların okul performansı ve ülke geleceğindeki etkilerinden söz etmektedir (2). Bunun yanı sıra entelektüel gelişim açısından bu enfeksiyonların biliş ve eğitim başarısı üzerine zararlı bir etkisi olabileceği de bildirilmiştir (2-4). Bunların sonucunda insanların antihelmintik ilaçlara yönelmesi direnç gelişiminin de sebeplerinden olmuştur (5,6).

Son yıllarda bitkisel kökenli ilaçların kullanımı her geçen gün artmaktadır. Birçok bitki çeşitli hastalıklarda tedavi aracı olarak kullanılmakta ve sentetik ilaçları aratmayacak etkiler görülmektedir. Özellikle ilacına direnç geliştiren patojenlerin eradikasyonunda bitkilerden elde edilen ürünler, geleneksel tedavi metodu olarak eski zamanlardan beri kullanılmaktadır. Tıbbi bitkilerin antihelmintik aktiviteleriyle ilgili çalışmalar oldukça azdır. Bunun sebeplerinden biri de helmintlerin birçoğunun laboratuvar ortamında kültürünün yapılamamasıdır. Bundan dolayı genellikle bu gibi çalışmalarda rat ya da fare gibi laboratuvar hayvanları, model olarak tercih edilmektedir. Ancak bilinmektedir ki hayvan çalışmaları, fazla iş gücü gerektirmesi, çalışma alanı sıkıntısı ve pahalı olması gibi birçok problemlere beraberinde getirmektedir.

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*), şubesi; *Nematoda*, sınıfı; *Secernentea*, takımı; *Rhabditida*, ailesi; *Rhabditidae*, cinsi; *Caenorhabditis*, türü; *Caenorhabditis elegans* olan, iplik kurdu olarak da adlandırılan bir nematodtur (Şekil 1). Erişkin bir kurtçuğun boyu bir milimetre civarındadır, bu nedenle incelemek için stereo mikroskop kullanılır. Büyüme ve üreme için nemli bir çevre, oda sıcaklığı, atmosferik oksijen ve besin olarak da bakteriyeye ihtiyaç duyar. Laboratuvar da bakım ve üretimi çok kolaydır. Erişkinleri bir mm boyunda olduğu için laboratuvar da çok az yer kaplar, rutin uygulamalar için petri kapları ve bir mikroskop yeterlidir. Erkek ve hermafrodit olmak üzere iki cinstir. Hermafrodit sperm ve yumurta üretir ve kendi kendini döller. Erkek sadece sperm üretir ve döllenmek için hermafrodite ihtiyaç duyar. Hermafroditin kendi kendine döllenmesi sonucu yine hermafrodit oluşurken, spontan olarak yaklaşık 1:1000 olasılıkla X kromozom ayrılmasından dolayı erkek oluşabilir.



Şekil 1. *C. elegans* mikroskopik görünümü (40x)

Erkek spermiyle döllenme sonucu ise erkek ve hermafrodit eşit oranda oluşur. Erişkin bir hermafrodit yaşamı boyunca yaklaşık 300 yumurta bırakabilir (7,8).

C. elegans'lardaki yutak ve omurgalıdaki kalbin ortolog olabileceğini düşündüren teoriler vardır. Bunlardan ilki hem omurgalı kalbi hem de *C. elegans* yutağı çift çekirdekli kas hücrelerine sahiptir ve lümenleri boyunca materyalleri taşırlar. Her iki organ da organizmanın yaşamının sürekliliği için devamlı pompalama yaparlar. İkincisi ise, her iki organında benzer uyarı ileti sistemi vardır. Kasılmalar bir gap junction ile senkronize edilir ve bunlar kas hücrelerine bitişiktir. Nöronal uyarı yokluğunda da kasılmalar devam edebilir (9,10). Bu sebeple yutak pompalamasını kaybetmiş *C. elegans* ölü olarak kabul edilir.

Çalışmamızda *Nigella sativa* (çörek otu)'nın antihelmintik aktivitesinin, bir model organizma olan *C. elegans*'lar üzerinde test edilmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Nigella sativa Tohum Yağı'nın Eldesi

Nigella sativa tohumları Sivas'ta satışa sunulan beş farklı satıcıdan eşit miktarda alındı, yıkanıp kurutulduktan sonra öğütüldü. Öğütülen tohumdan 100 gr tartılarak soxhlet cihazında petroleum ether (Sigma 77399) ile sekiz saat 40-60 °C'de ekstraksiyona tabi tutuldu (11). Elde edilen ekstrakt evaporatöre alınarak petroleum ether tamamen uçuruldu.

C. elegans Temini

Çalışma için N2 (yaban tip) *C. elegans* ve *Escherichia coli* OP50, Minnesota Üniversitesi *Caenorhabditis* Genetik Merkezi (USA)'nden satın alındı.

C. elegans Kültür İşlemleri

Deneysel katı kültür ortamı kullanıldı. Bu amaçla standart Nematode Growth Medium (NGM) olarak adlandırılan NGM agar ortamı hazırlandı.

Luria Broth Hazırlanması

BactoTryptone (5 g), Yeast Extract (2,5 g), NaCl (5 g), 1 M Tris (5 mL) tartılarak 500 mL deiyonize suda eritildi. 125 °C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra soğutuldu.

Escherichia coli OP50 Suşunun Hazırlanması

Hazırlanan Luria Broth içine *Escherichia coli* OP50 suşundan ekilerek 37 °C'de 24 saat bekletildi.

Nematot Growth Media (NCM) hazırlanması:

NaCl (3 g), Peptone (2,5 g), Agar (20 g) hassas terazide tartımları yapılarak 1 L deiyonize su içerisinde eritildi. 125 °C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 55 °C'ye kadar soğutuldu. Daha önceden hazırlanan ve 0,2 µm gözenekli filtrelerden süzülen 1 mL 1 M CaCl₂, 1 mL 5 mg/mL kolesterol, 1 mL 1M MgSO₄ ve 25 mL 1 M KPO₄ (pH:6) besiyerine eklenerek homojenizasyonu sağlandı. Medium pH: 6'ya ayarlandı. Çalışma için içinde etken madde bulundurulmuş NGM'ler hazırlanana kadar 55 °C'de bekletildi.

C. elegans'ların üretilmesi ve pasajlanması için hazırlanan NGM'den, altı mm çapındaki petrilere 10 mL aktararak oda ısısında katılaşıncaya kadar bekletildi. Üzerine üretilen *E. coli* OP50 suşundan 200 µL eklenerek kuruması bekledi. Petrilere *C. elegans*'lar pasajlanarak çoğaltıldı.

C. elegans'ların Senkronizasyonu

Yaklaşık 10 adet erişkin *C. elegans* bakterî içeren NGM petri kutusuna aktarıldı. Altı saat süreyle yumurtlama olduktan sonra erişkin *C. elegans*'lar petri kabından çıkarıldı. Bu yumurtalar senkronize olmuş yavruları oluşturdu. Bunlar üçüncü günün sonunda erişkin forma gelince çalışmada kullanıldı.

Antihelmintik Aktivitenin Belirlenmesi

Steril ve 200 mL hacimli beher içine 1 mL *Nigella sativa* tohum yağından koyuldu. Üzerine 99 mL daha önceden hazırlanan ve 55 °C'de sıvı halde bekletilen NGM'den eklenerek homojenize edildi. Nematotların yaşam süresi boyunca çoğalmalarını engellemek amacıyla besiyerine FUDR (33 µL, 150 mM FUDR/100 mL NGM) katıldı. Elde edilen mediyumdan 10'ar mL steril şartlar korunarak 6 mm çapındaki petrilere dağıtıldı ve oda ısısında katılaştırılmaları beklendi. Sonrasında üzerlerine *E. coli* OP50 suşundan 200 µL eklenerek kuruması beklendi.

Sonraki gruplar, %0,1, %0,01, %0,001, %0,0001'lik konsantrasyonlar şeklinde hazırlandı. Kontrol grubuna *Nigella sativa* tohum yağından eklenmedi.

Herbir konsantrasyondan 4 petri hazırlandı. Petrilere senkronizasyonu yapılmış ve erişkin *C. elegans*'lardan 10'ar adet sterio mikroskop altında aktarıldı. Deney 18 gün sürdü ve deney gruplarındaki bütün nematotlar ölüncüye kadar her gün canlı ve ölü nematotlar kaydedildi. Çalışma 22 °C'de 3 kez tekrarlandı. Çalışmamızda yutak pompalama hareketlerini kaybetmiş olan *C. elegans*'lar ölü olarak kaydedildi.

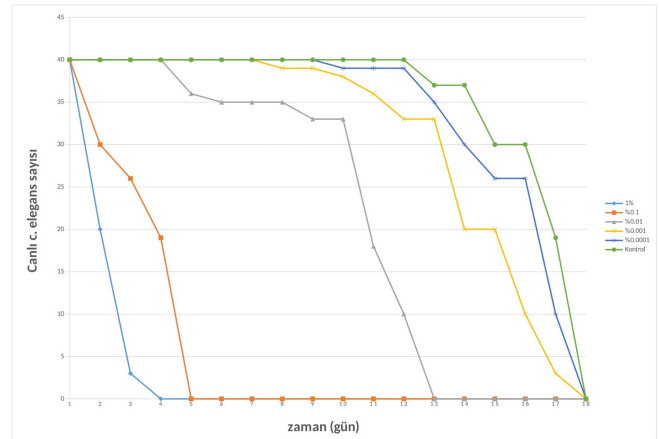
İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için One Way Anova testinin yanı sıra tukey testi kullanıldı. Bu amaçla SPSS 16.0

(SPSS, Chicago, IL, Amerika) istatistik programı kullanıldı ve %95 güven aralığında $p < 0,05$ değeri gruplar arası anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışma bulgularımız incelendiğinde %1'lik konsantrasyonda petrilere bütün nematotların dördüncü gün sonunda öldüğü görüldü. Buna ilaveten %0,1'lik konsantrasyonda beşinci gün sonunda hiç canlı nematoda rastlanmazken, %0,01'lik konsantrasyonda ise 13'üncü gün sonunda petrilere bütün nematotların öldüğü tespit edildi (Şekil 2, Tablo 1). Veriler istatistiksel olarak incelendiğinde %0,1, %0,01, %0,001'lik konsantrasyon grupları ile kontrol grubu arasındaki farkın önemli



Şekil 2. *Nigella sativa* tohum yağının *C. elegans*'lar üzerine antihelmintik etki grafiği

Tablo 1. *Nigella sativa* tohum yağının *C. elegans*'lar üzerine antihelmintik etkisi

Zaman (Gün)	Konsantrasyonlar					Kontrol
	1% (CNS)	%0,1 (CNS)	%0,01 (CNS)	%0,001 (CNS)	%0,0001 (CNS)	
1	40	40	40	40	40	40
2	20	30	40	40	40	40
3	3	26	40	40	40	40
4	0	19	40	40	40	40
5	0	0	36	40	40	40
6	0	0	35	40	40	40
7	0	0	35	40	40	40
8	0	0	35	39	40	40
9	0	0	33	39	40	40
10	0	0	33	38	39	40
11	0	0	18	36	39	40
12	0	0	10	33	39	40
13	0	0	0	33	35	37
14	0	0	0	20	30	37
15	0	0	0	20	26	30
16	0	0	0	10	26	30
17	0	0	0	3	10	19
18	0	0	0	0	0	0

CNS: Canlı nematot sayısı

olduğu görüldü ($p < 0,05$). Gruplar arası veriler incelendiğinde ise %0,1'lik konsantrasyon ile %0,01'lik konsantrasyon arasındaki fark önemsizken ($p > 0,05$) bu iki grubun diğer gruplar ile arasındaki fark önemli bulundu ($p < 0,05$).

TARTIŞMA

Çalışmamızda erişkin *C. elegans*'lar üzerine *Nigella sativa* tohum yağında %1 ve %0,1'lik konsantrasyonlarda antihelmintik etki tespit edilmiştir. Çalışmamızda bu etkinin yanı sıra apatojen bir nematod olan *C. elegans*'ların antihelmintik aktivitede bir model organizma olarak kullanılabilceği de gösterilmiştir.

Antihelmintik aktivite testlerinde *C. elegans*'ların model olarak kullanıldığı çalışmalar yeterli olmamakla birlikte literatürde mevcuttur. Yapılan bir çalışmada *Ocimum sanctum* uçucu yağının *C. elegans*'lar üzerinde antihelmintik etkileri NGM ortamında test edilmiş ve bitkinin güçlü bir antihelmintik etki gösterdiği sonucuna varılmıştır (12). Sudan'da yapılan bir çalışmada 14 bitki türünün su ekstraktlarının antihelmintik aktiviteleri araştırılmış ve model olarak *C. elegans*'lar kullanılmıştır. *Balanites aegyptiaca* ve *Sesbania sesban* türleri çalışmaya alınan bitkiler arasında en güçlü antihelmintik etkiye sahip bitkiler olarak gösterilmiştir (13). Kanada'da yapılan çalışmada 26000 adet kimyasal maddenin antihelmintik etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla patojen nematodların temsilcisi olarak *C. elegans*'lar kullanılmıştır. Çalışma sonucunda 14 yeni antihelmintik etkili kimyasal literatüre kazandırılmıştır (14). Bizim çalışmamızda da *C. elegans*'lar, gerek laboratuvar ortamında kolay üretilmesi, yer kaplamaması, çok fazla iş gücü gerektirmemesi gerekse apatojen olmasından dolayı enfeksiyon riskinin bulunmamasından ötürü güvenli çalışma ortamı sağlamasından dolayı model organizma olarak tercih edilmiştir.

Nigella sativa'nın nematodlara, tenyalara, kancalı kurtlara karşı esansiyel yağları üzerine yapılan antelmintik çalışmalar sonucu, nematodlara ve tenyalara karşı oldukça etkili bir aktivite gösterdiği gösterilmiştir (15). Yapılan bir çalışma sestot enfeksiyonu olan çocukların *Nigella sativa* tohumları ile tedavi edilebildiği bilgisi verilmiştir. Çalışmada *Nigella sativa* tohumları satın alınıp kurutulularak toz haline getirilmiştir. Nematot ve sestot enfeksiyonundan muzdarip altı çocuk kontrol grubu olarak tedavi edilmezken deney grubu olarak gruplanan çocuklar 20, 30 ve 40 mg/kg dozunda *Nigella sativa* oral yolla uygulanmış ve 3, 7 ve 15'inci günlerde 1 gr dışkı örneğindeki parazit yumurtaları kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda *Nigella sativa*'nın sestot enfeksiyonunu önemli bir şekilde azalttığı görülmüştür (16). Yine *Nigella sativa* tohumlarının antihelmintik amaçlı geleneksel tıpta kullanıldığına dair araştırmalar literatürde mevcuttur (17). Başka bir çalışmada *Hymenolepis nana* ile doğal olarak enfekte 28 isviçre albino faresi 3 gruba ayrılmıştır. Birinci grup kontrol grubu olarak tedavi edilmezken diğer iki gruba 2,5 mL/kg ve 5 mL/kg dozlarında *Nigella sativa* tohum yağı oral yolla verilmiştir. Gruplar incelendiğinde, 5 mL/kg dozunda *Nigella sativa* tohum yağı verilen grubun 14 gün sonunda tam olarak iyileştiği, bunun yanı sıra diğer grubun 21 gün sonra tam olarak iyileştiği bildirilmiştir (18). Yapılan başka bir çalışmada *Trichinella spiralis* ile enfekte ratlarda *Nigella sativa*'nın proflaktik ve terapötik etkisi araştırılmıştır. Çalışmada enfeksiyondan sonra 7'inci ve 20'inci günlerde bağırsakta yetişkin solucan sayısı, enfeksiyondan sonraki 60. günde kaslarda larva sayımı, parazitin üreme kapasitesi test edilmiş, *Trichinella spiralis* larvalarına karşı antikorların oluşumu ELISA

ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda iki hafta boyunca 5 mL/kg dozda oral yolla uygulanan *Nigella sativa* tedavisinin *Trichinella spiralis*'e karşı güçlü bir proflaktik ve terapötik etkisinin bulunduğunu bildirmişlerdir (19).

Nigella sativa'nın kimyasal bileşimi hakkında yapılan çalışmalar, bitki ekstraktının birçok organik bileşiği içerdiğini göstermektedir. Tohum ekstraktının bir GC-MS analizi, bunun sekiz yağ asidi ve 32 uçucu terpenin bir karışımı olduğunu göstermiştir. Analiz sonucu thymoquinone (30%-48%), thymohydroquinone, dithymoquinone, p-cymene (7%-15%), carvacrol (6%-12%), 4-terpineol (2%-7%), t-anethol (1%-4%), sesquiterpene longifolene (1%-8%) oranlarında tanımlanmıştır ve *Nigella sativa*'nın tıbbi etkilerinin bu bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir (20-22).

Bizim çalışmamızda da *Nigella sativa* tohumlarının literatüre uyumlu bir şekilde antihelmintik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu veriler özellikle ilacına direnç geliştiren türlerin tedavisini açısından oldukça önemlidir. Bunun yanı sıra çalışma bulgularımızın literatürdeki *in vivo* çalışmalarla uyumlu olması, *C. elegans*'ların bu gibi çalışmalarda model olarak kullanılmasının güvenilirliğini de göstermektedir.

SONUÇ

Yapılan antihelmintik çalışmaların birçoğu laboratuvar hayvanlarının parazitlerle enfekte edilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Laboratuvar hayvanlarıyla yapılan çalışmalar gerek iş gücü gerekse çalışma alanı açısından oldukça güçtür. Helminthlerin genellikle makroskopik boyutta olması ve birçoğunun kültürünün yapılarak laboratuvar ortamında üretilmemesi bilimsel çalışmalar için büyük bir engeldir. Bu çalışmada antihelmintik aktivite çalışmalarında *C. elegans*'ın iyi bir model olabileceği ve *Nigella sativa*'nın antihelmintik etkisi gösterilmiştir.

* Etik

Etik Kurul Onayı: Çalışma Etik Kurul onayı gerektirmemektedir.

Hasta Onayı: Çalışmada hasta denek bulunmamaktadır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu tarafından değerlendirilmiştir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için herhangi bir finansal destek almamışlardır.

KAYNAKLAR

- Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *The Lancet*. 2006;367:1521-32.
- Drake L, Bundy D. Multiple helminth infections in children: impact and control. *Parasitology*. 2001;122:73-81.
- Gatti S, Lopes R, Cevini C, Ijaoba B, Bruno A, Bernuzzi A, et al. Intestinal parasitic infections in an institution for the mentally retarded. *Annals of Tropical Medicine Parasitology*. 2000;94:453-60.
- Tappeh KH, Mohammadzadeh H, Rahim RN, Barazesh A, Khashaveh S, Taherkhani H. Prevalence of intestinal parasitic infections among mentally disabled children and adults of Urmia, Iran. *Iranian journal of parasitology*. 2010;5:60-64.
- Kaminsky R, Ducray P, Jung M, Clover R, Rufener L, Bouvier J, et al. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*. 2008;452:176-180.

6. Smout MJ, Kotze AC, McCarthy JS, Loukas A. A novel high throughput assay for anthelmintic drug screening and resistance diagnosis by real-time monitoring of parasite motility. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4:e885.
7. Sudama G. There are Observable Metabolic Signature Patterns in *C. elegans*: Specifically for Different Life Stages Grown with and without the Added Antioxidants Vitamin C and Vitamin E? 2008.
8. Friberg J. The control of growth and metabolism in *Caenorhabditis elegans*. Umeå centrum för molekylär patogener (UCMP) (Faculty of Medicine). 2006.
9. Okkema PG, Ha E, Haun C, Chen W, Fire A. The *Caenorhabditis elegans* NK-2 homeobox gene *ceh-22* activates pharyngeal muscle gene expression in combination with *pha-1* and is required for normal pharyngeal development. *Development*. 1997;124:3965-73.
10. Mango SE. The *C. elegans* pharynx: a model for organogenesis. *WormBook: The Online Review of C elegans Biology* [Internet]. *WormBook*; 2007.
11. Helrich K. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. Arlington, VA: USA; 1990.
12. Asha M, Prashanth D, Murali B, Padmaja R, Amit A. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum sanctum* and eugenol. *Fitoterapia*. 2001;72:669-70.
13. Ibrahim A. Anthelmintic activity of some Sudanese medicinal plants. *Phytotherapy Research*. 1992;6:155-7.
14. Mathew MD, Mathew ND, Miller A, Simpson M, Au V, Garland S, et al. Using *C. elegans* forward and reverse genetics to identify new compounds with anthelmintic activity. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10:e0005058.
15. Akhtar MS, Iqbal Z, Khan M, Lateef M. Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in the Indo-Pakistan subcontinent. *Small Ruminant Research*. 2000;38:99-107.
16. Akhtar MS, Riffat S. Field trial of *Saussurea lappa* roots against nematodes and *Nigella sativa* seeds against cestodes in children. *J Pak Med Assoc*. 1991;41:185-7.
17. Tariq M. *Nigella sativa* seeds: folklore treatment in modern day medicine. *Saudi journal of gastroenterology*. 2008;14:105-6.
18. Al-Megrin WA. Efficacy of black seeds oil (*Nigella sativa*) against *Hymenolepis nana* in infected mice. *European Journal of Medicinal Plants*. 2016;13:1-7.
19. Abu NEE. Effect of *Nigella sativa* and *Allium cepa* oils on *Trichinella spiralis* in experimentally infected rats. *Journal of the Egyptian society of parasitology*. 2005;35:511-23.
20. Khan MA, Afzal M. Chemical composition of *Nigella sativa* Linn: part 2 recent advances. *Inflammopharmacology*. 2016;24:67-79.
21. Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, et al. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2013;3:337-52.
22. Neela M, Rahul V, Usha S. A Review on Anthelmintic Potential of Herbs Mentioned in Siddha Medicine. *Journal of Medical Science and Clinical Research*. 2017;2:17432-6.

Sağlıklı Sığırlarda *Enterocytozoon bienersi*'nin Moleküler Prevalansı ve Filogenetik Karakterizasyonu

Molecular Prevalence and Phylogenetic Characterization of *Enterocytozoon bienersi* in Healthy Cattle

✉ Tuğba Bilgin, ✉ Sadullah Usluğ, ✉ Gupse Kübra Karademir, ✉ Mübcecel Okur, ✉ Gamze Yetişmiş, ✉ Alparslan Yıldırım

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

Cite this article as: Bilgin T, Usluğ S, Karademir GK, Okur M, Yetişmiş G, Yıldırım A. Sağlıklı Sığırlarda *Enterocytozoon bienersi*'nin Moleküler Prevalansı ve Filogenetik Karakterizasyonu. Türkiye Parazitoloj Derg 2020;44(1):36-42.

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada sağlıklı sığırlarda *Enterocytozoon bienersi*'nin moleküler prevalansının ve genotiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışmada, Ekim 2017 ve Mart 2018 tarihleri arasında Sivas yöresindeki sağlıklı görünümü 150 sığırdan dışkı örnekleri toplanmış ve genomik DNA (gDNA) izolasyonları yapılmıştır. Elde edilen gDNA izolatları, *E. bienersi*'nin identifikasyonu amacıyla, ITS rRNA gen bölgesini amplifiye eden Nested PZR ile işlenmiştir. *E. bienersi* pozitif izolatların ITS rRNA gen bölgesi ampliconları genotiplendirme ve filogenetik analizler için sekanslanmıştır. Elde edilen sekanslar uygun genetik yazılımlarla işlenerek genotipik yapıları ve sonrasında da filogenetik ilişkileri ortaya çıkarılmıştır.

Bulgular: Nested PZR ile incelemesi yapılan örneklerden 29'u (%19,3) *E. bienersi* yönünden pozitif bulunmuştur. Sekans analizleri sonucu beş ayrı genotip belirlenmiştir. En yaygın genotip olarak bulunan ERUSS1 genotipi ile ERUSS2-4 genotipleri yakın genotipler olarak karakterize edilmiş ve ilk kez rapor edilmiştir. İki izolatın ise Almanya'da bir sığırdan rapor edilmiş olan N genotipinde olduğu belirlenmiş ve diğer genotiplerden daha farklı olduğu görülmüştür. Filogenetik analizler çalışmada karakterize edilen tüm genotiplerin genogrup 2'de yer aldığını ortaya koymuştur.

Sonuç: Bu çalışma ile Türkiye'de sığırlarda *E. bienersi* enfeksiyonları üzerine ilk moleküler epidemiyolojik veriler elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Enterocytozoon bienersi*, moleküler prevalans, filogenetik karakterizasyon, sağlıklı sığır, Türkiye

ABSTRACT

Objective: In this study, it was aimed to determine the molecular prevalence and genotypes of *Enterocytozoon* in healthy cattle.

Methods: Fecal samples were collected from 50 cattle in Sivas between October 2017 and March 2018 and genomic DNA (gDNA) isolations were performed. gDNA isolates were processed by Nested PCR specifically amplifying ITS rRNA gene region to identify *E. bienersi*. ITS rRNA region of *E. bienersi* positive isolates were sequenced for genotyping and phylogenetic analyzes. Obtained sequences were assembled with appropriate genetic software, then phylogenetic relationships were revealed.

Results: According to Nested PCR analyses, 29 (19.3%) out of totally examined samples were found positive for *E. bienersi*. As a result of the sequence analyses, five distinct genotypes were determined. The most frequent genotype ERUSS1 and the other ERUSS2-4 genotypes were characterized as close to each other, which was reported for the first time in the world. Two isolates were determined in N genotype that was reported from cattle in Germany and were more different from the other genotypes. Phylogenetic analysis revealed that all the genotypes characterized in the study belonged to the genogroup 2.

Conclusion: First molecular epidemiological data on *E. bienersi* in cattle from Turkey were obtained with this study.

Keywords: *Enterocytozoon bienersi*, molecular prevalence, phylogenetic characterization, healthy cattle, Turkey



Geliş Tarihi/Received: 02.03.2020 Kabul Tarihi/Accepted: 05.03.2020

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Dr. Alparslan Yıldırım, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

Tel/Phone: +90 352 207 66 66 **E-Posta/E-mail:** yildirima@erciyes.edu.tr **ORCID ID:** orcid.org/0000-0001-9868-0363

GİRİŞ

Microsporidialar zorunlu hücre içi parazitlerin geniş ve genetik çeşitliliği yüksek bir grubunu oluşturmakta olup hem hayvan hem de insan patojenleri olarak bilinmektedirler (1). Bu parazitik protistalar genetik olarak mantarlarla ilişkilidir ve çevresel dirençli spor formları ile karakterize olup konak dışı ile çevreye yayılarak ökaryotik hücre invazyonu için yeni bir siklusu başlatırlar (2). Günümüze kadar 200 soy içerisinde yaklaşık 1400 microsporidia türü rapor edilmiş olup bunlar arasında 8 soy içerisinde 14 türün insanlarda enfeksiyona yol açtığı bildirilmiştir (3). *Enterocytozoon bienersi* insanlarda ishale yol açan fırsatçı bir patojen olarak ortaya çıkmış olup immün supresyonla ilişkilendirilmiş ve rapor edilen insan microsporidiosis olgularının yaklaşık %90'ından sorumlu tür olarak karakterize edilmiştir. İnsanların yanı sıra *E. bienersi* enfeksiyonları primatlar, kedi, sığır, köpek, at, domuz, kuşlar ve çeşitli yabani memelilerden tekrarlı olarak dünyanın çeşitli bölgelerinden bildirilmektedir (4). Enfekte insan ve hayvanlarla temas ve/veya kontamine gıda ve sular *E. bienersi* enfeksiyonlarının bulaşmasında rol oynayan önemli faktörlerdir (1,5). Hem zoonotik hem de potansiyel konak adaptasyonu olan genotipler, birçok insan ve hayvan *E. bienersi* enfeksiyonlarında sorumlu etkenler olabilirler ve hayvanlar insan enfeksiyonlarına yol açan genotipler için potansiyel rezervuardırlar (4,6).

Hayvan ve insanlardaki *E. bienersi* izolatlarının genotiplendirilmesinde rRNA geninin internal transcribed spacer (ITS) bölgesinin sekans analizi genel standart yöntem olarak kullanılmaktadır (5,7). Günümüze kadar çeşitli hayvan türlerinde 240'ın üzerinde genotip identifiye edilmiştir (8,9). ITS gen bölgesi sekanslarının filogenetik analizlerine göre *E. bienersi* genotiplerinin 9 farklı genogruba bölündüğü ortaya konmuştur (10). Genogrup 1 en geniş grup olup günümüze kadar rapor edilen *E. bienersi* genotiplerinin %94'ünü ihtiva etmekte ve buradaki genotiplerin insanlarda da enfeksiyon oluşturmalarından dolayı zoonotik grup olarak nitelendirilmektedir (11,12). Buna karşın diğer sekiz major genogruba (grup 2-9) yer alan genotiplerin ise çoğunlukla spesifik konaklarda ve atık sularda bulunduğu kaydedilmiştir (11,13,14). Bugüne kadar sığırlarda çoğunluğu genogrup 2'de olmak üzere 40'ın üzerinde *E. bienersi* genotipi karakterize edilmiştir (15-17). Bunlar arasında 8'i genogrup 1'de 7'si de genogrup 2'de olmak üzere en az 15 genotip insanlarda da rapor edilmiş olup sığırların insan enfeksiyonları için önemli bir rezervuar olduğunun önemi vurgulanmıştır (5,8,16,18). Genotip 1, J ve BEB4'ün süt emen buzağularda dünya çapında yaygın *E. bienersi* genotipleri olduğu (15,16,18-25) ve ilgili genotiplerin en az 13 insan olgusunda tespit edildiği kaydedilmiştir (26,27).

Parazitik etkenler içerisinde oldukça önemli olan microsporidia türleri üzerine ülkemizde günümüze kadar yapılan çalışmaların sınırlı olduğu bilinmektedir. Türkiye'de insan ve hayvan konaklarda microsporidia enfeksiyonlarına yol açan türlerin genotipik çeşitliliği üzerine sınırlı sayıda araştırma yapılmıştır (28-32). Bu araştırmaların daha çok insanlarda yapıldığı buna karşın hayvanlardaki çalışmaların çok daha sınırlı olduğu görülmektedir. Evcil hayvanlar üzerinde yürütülen araştırmalarda; Düzlü ve ark. (31), Kayseri yöresinde moleküler olarak incelenen 282 köpek dışkılarında *Encephalitozoon intestinalis* ve *En. cuculii*'nin yaygınlığını sırasıyla %12,4 ve %2,1 olarak belirlemişler ve izolatların genotipik çeşitliliklerini ortaya çıkarmışlardır. Pekmezci ve ark. (32), Samsun yöresinde inceledikleri 72 ev kedisinde *E. bienersi* ve *En. intestinalis* moleküler prevalansını sırasıyla %5,5 ve %4,1 olarak rapor etmişlerdir. Ercan (33),

Kayseri, Kırşehir ve Nevşehir yörelerinde 300 tavuktan alınan dışkı örneklerinde *E. bienersi* ve *Microsporidia* sp. pozitifliğini moleküler olarak sırasıyla %7,3 ile %0,7 olarak belirlemiş ve elde edilen izolatların genotiplendirmesini yapmıştır.

Günümüze kadar Türkiye'de sığırlarda *E. bienersi*'nin varlığı ve moleküler karakterizasyonu üzerine herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, sağlıklı görünümüne farklı yaş, cinsiyet ve ırklardaki sığırlarda *E. bienersi*'nin moleküler olarak araştırılması ve enfeksiyona yol açan genotiplerin ortaya konarak filogenetik yapılarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonucu elde edilen çıktılar Türkiye'deki sığırlarda microsporidia enfeksiyonları üzerine ilk moleküler verileri sağlamış olup *E. bienersi*'nin araştırma yöresinde oluşturduğu zoonotik risk potansiyeli üzerine de bilimsel veriler sağlamıştır.

YÖNTEMLER

Dışkı Örneklerinin Toplanması ve Genomik DNA İzolasyonu

Çalışma, Ekim 2017 ve Mart 2018 tarihleri arasında halk elinde yetiştiriciliği yapılan farklı yaş, cinsiyet ve ırklardan sığırlar üzerinde yürütülmüştür. Çalışma materyalini oluşturan dışkı örnekleri hayvanların dışkılamasını takiben yere temas etmeyen kısımdan alınmış olup hayvanlara temas olmaması sebebiyle Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 29.01.2016 tarih ve 04 sayılı Yönergesi kapsamında etik kurul onayına gerek duyulmamıştır. Çalışma süresince toplam 150 sığırdan dışkı örnekleri toplanmış ve steril dışkı kaplarına alınarak soğuk zincir altında laboratuvara intikal ettirilmiştir. Her örneğe protokol numarası verilerek hayvanlara ait bilgiler ile birlikte kayıt altına alınmıştır. Dışkı örneklerinden gDNA izolasyonları, QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak kit prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen gDNA ekstraktlarından alınan örnekler Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) cihazında işlenerek total gDNA miktarları (ng/µL) belirlenmiş ve kullanılabildiği kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Ribozomal ITS Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Dışkı örneklerinden elde edilen gDNA izolatları *E. bienersi* DNA'sının varlığı yönünden ribozomal ITS gen bölgesinin yaklaşık 390 bp kısmını spesifik olarak amplifiye eden primerlerle nested polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) analizlerine tabi tutulmuştur (34). Elde edilen PZR ürünlerinin her birinden 10 µL alınıp %1,5'lük agaroz jelde elektroforeze tabii tutulduktan sonra sonuçlar Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Upland, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

Sekans ve Genotiplendirme Analizleri

E. bienersi pozitif izolatların PZR analizleri sonrası ribozomal ITS amplikonları sekans analizleri için jel pürifiye (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) edilmiştir. Sekans analizleri ikinci PZR analizlerinde kullanılan gen spesifik forward ve reverse primer dizileri ile çift yönlü olarak gerçekleştirilmiştir (MacroGen Europe). Çift yönlü DNA dizisi belirlenen izolatlara ait kromotogramlar Geneious 11.0.2 (35) yazılımında De Novo Assemble ile işlenmiş ve kalite skoru yüksek olan final konsensus dizilimler belirlenmiştir. Bu dizilimden PZR primerleri çıkarılarak hedef bölge sekansları (350 bp) elde edilmiştir. Elde edilen sekansların Geneious 11.0.2 yazılımı (35) üzerinden BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) algoritması

kullanılarak GenBank'ta mevcut homolog izolatlarla ait ilgili gen bölgesi sekanslarıyla çoklu hizalamaları yapılmış, moleküler karakterizasyonları sağlanmış ve akabinde GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir. İlgili sekanslar içinden 243 bp uzunluğundaki *E. bieneusi* complete ITS sekansları alınarak, BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) algoritması ile GenBank'ta kayıtlı tüm *E. bieneusi* genotiplerine ait nükleotid sekansları ile hizalama analizleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlarla izolatların genotiplendirmeleri yapılmıştır.

Filogenetik Analizler

Genogrup ve genotipler arasındaki genetik farklılıklar Kimura two-parameter uzaklık modeli (36-38) kullanılarak MEGA 7 yazılımında (38) gerçekleştirilmiştir. *E. bieneusi* genotiplerine ait nesillerin, filogenetik yapılarının belirlenmesinde GenBank veri tabanında kayıtlı çeşitli genogruplara ait izolatların ITS gen bölgesi dizilimleri ile data seti oluşturulmuştur. Filogenetik ağaçların oluşturulmasında Maximum Likelihood (ML) analizleri uygulanmıştır. ML analizlerinde sekans evrimi için en uygun substitution modelinin belirlenmesinde jModelTest v.0.1.1 (39) kullanılmış ve en düşük AIC (Akaike Information, Criterion, correction) değerine sahip model filogenetik ağacın oluşturulmasında kullanılmıştır. ML analizleri Geneious 11.0.2 (35) yazılımı üzerinden PhyML (40) plugin kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ML analizleriyle oluşturulan ağaçların güvenilirliğinin tespit edilmesinde 1000 tekrarlı Bootstrap testi kullanılmıştır.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler, IBM SPSS Statistics 20.0 yazılımında gerçekleştirilmiştir. İncelenen sığırlarda *E. bieneusi* moleküler prevalansı ile yaş ve ırk faktörlerinin ilişkisi Pearson's chi-square, cinsiyet faktörünün ilişkisi de Fisher's exact testi ile araştırılmıştır.

BULGULAR

E. bieneusi'nin Moleküler Prevalansı ve Risk Faktörlerinin Analizi

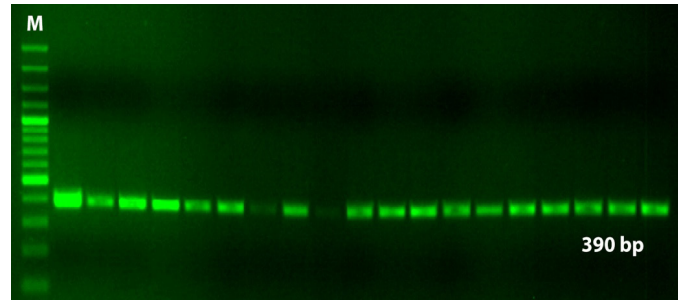
Farklı yaş grupları, cinsiyet ve ırklardan olan 150 sığıra ait dışkı örneklerinden elde edilen gDNA izolatlarının 29'u (%19,3) ITS bölgesini amplifiye eden tür spesifik primerlerle PZR analizleri

sonucu *E. bieneusi* DNA'sı yönünden pozitif belirlenmiştir. Nested PZR analizleri ile pozitif belirlenen bazı izolatların agaroz jel üzerinde görünümü Şekil 1'de verilmiştir.

E. bieneusi pozitifliği belirlenen sığırların yaş, cinsiyet ve ırk gruplarına göre dağılımları ve istatistiksel analizleri Tablo 1'de verilmiştir. Yaş gruplarına göre *E. bieneusi* pozitifliği en yüksek %18,0 ile >3 yaş grubunda belirlenmiş bunu %0,7 oranlar ile ≤1 yaş ve 1-3 yaş grupları izlemiştir. Yaş gruplarına göre *E. bieneusi* pozitifliğinin dağılımında istatistiksel açıdan >3 yaş grubu ile ≤1 yaş ve 1-3 yaş grupları arasındaki farklılık önemli ($p < 0,05$) bulunurken ≤1 yaş ve 1-3 yaş grupları arasındaki farklılık önemsiz ($p > 0,05$) bulunmuştur. Sığırların cinsiyetine göre erkeklerde %2,7 dişilerde ise %16,7 oranında *E. bieneusi* pozitifliği tespit edilmiştir. Irka göre *E. bieneusi* pozitifliği en yüksek %6,0 ile Holstein ve Montofon ırklarında belirlenmiş, bunu %4,7 ile Simental ve %2,7 ile Melez ırkları izlemiştir. Yerli ırklarda *E. bieneusi* enfeksiyonu saptanmamıştır. Cinsiyet ve ırka göre *E. bieneusi* pozitifliğinin dağılımında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Ribozomal ITS Gen Bölgesi Sekans ve Genotiplendirme Analizi Sonuçları

Nested PZR analizleri ile pozitif belirlenen 29 izolatın tamamı sekans analizlerine tabii tutulmuş ve tüm izolatlar için kalite soru yüksek ($q > 20$) final sekanslar elde edilmiştir. Çalışmada belirlenen *E. bieneusi* izolatlarının genotiplendirmede referans olan 243 bp uzunluğundaki ITS sekansları arasında 221 (%90,8) identik



Şekil 1. *E. bieneusi* izolatlarının parsiyel ITS rDNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PZR sonucu elde edilen ampliconların jel elektroforezde görünümü M: 100 bp Marker

Tablo 1. *E. bieneusi* pozitifliği belirlenen sığırların yaş, cinsiyet ve ırk gruplarına göre dağılımları ve istatistiksel analizleri

Faktör	İncelenen hayvan sayısı Sayı	Pozitif hayvan		χ^2	p	
		%				
Yaş	≤1 yaş	21	1	4,8 ^a	8,332	0,016
	1-3 yaş	22	1	4,5 ^a		
	>3 yaş	107	27	25,2 ^b		
Cinsiyet	Erkek	24	4	16,7	0,130	1,000
	Dişi	126	25	19,8		
İrk	Holstein	32	9	28,1	4,860	0,302
	Simental	38	7	18,4		
	Montofon	42	9	21,4		
	Melez	26	4	15,4		
	Yerli	12	0	0,0		

^{a,b}: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasındaki istatistiksel farklılık önemlidir ($p < 0,05$)

bölge belirlenirken 5 farklı genotipi ortaya koyan 22 polimorfik bölge saptanmıştır. *E. bieneusi* pozitif 29 izolatin genotiplere göre dağılımları GenBank aksesyon numaraları ile birlikte Tablo 2'de verilmiştir. Belirlenen genotipler arasında intraspesifik nükleotid farklılığı ortalama $2,8 \pm 0,6$ olarak saptanmıştır. Çalışmada karakterize edilen ve en yaygın bulunan ERUSS1 genotipi ile birer sığırdan belirlenen ERUSS2, ERUSS3 ve ERUSS4 genotiplerine ait izolatlardan nükleotid sekansları arasında $0,3\%-0,6\%$ farklılık belirlenmiştir. ERUSS2 ile ERUSS3 ve ERUSS4 genotiplerine ait izolatlardan nükleotid sekansları arasında $0,6\%-0,9\%$, ERUSS3 ile ERUSS4 genotiplerine ait izolatlardan nükleotid sekansları arasında ise $0,9\%$ farklılık saptanmıştır. Yukarıdaki genotiplerden genetik olarak daha uzak belirlenen ve iki sığırdan izole edilen N genotipine ait izolatlardan ERUSS1, ERUSS2 ve ERUSS3 genotiplerine $5,9\%$, ERUSS4 genotipine ise $6,2\%$ farklılık göstermiştir.

Filogenetik Analiz Sonuçları

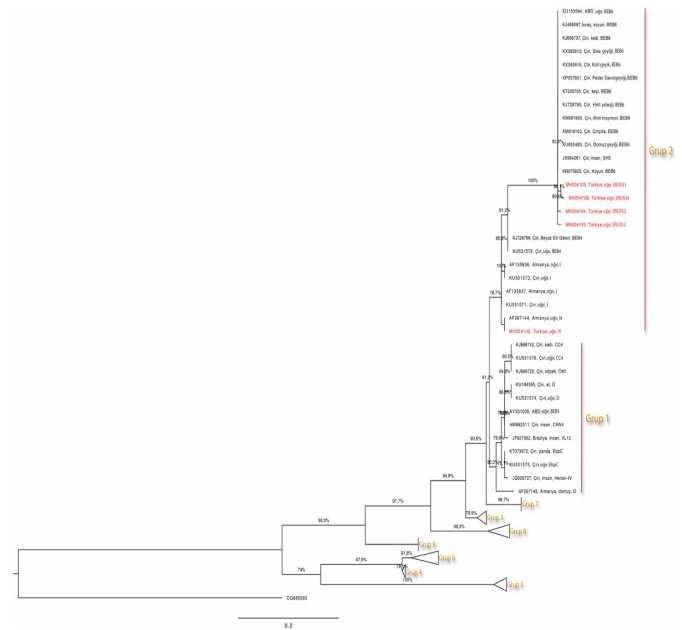
Moleküler olarak karakterize edilen *E. bieneusi* genotiplerinin Dünyada çeşitli bölgelerdeki farklı konaklardan bildirilen çeşitli genotiplere ait izolatlara ilişkileri filogenetik ağaç üzerinde (Şekil 2) gösterilmiştir. ML filogenisine göre oluşturulan filogenetik çözünürlük genogrupları bazında yüksek bootstrap oranları ile desteklenmiştir. Çalışmada karakterize edilen genotiplere ait izolatlardan tamamının *E. bieneusi* genogrup 2'de yer aldığı belirlenmiştir. Birbirine yakın olarak belirlenen ve ilk kez bu çalışma ile karakterize edilen ERUSS1-4 genotiplerine ait izolatlardan Çin, İsveç ve ABD'de sığır, koyun, çeşitli geyik türleri, kedi, çinçilla ve çeşitli maymun türlerinden rapor edilen, konak spektrumunu geniş olan BEB6 genotipi ($99,2\%-99,6\%$) ve Çin'de bir insandan izole edilen SH5 genotipi ($99,2\%-99,6\%$) ile genetik olarak yakın oldukları ve birlikte kümelendikleri tespit edilmiştir (Şekil 2). Çalışmada iki sığırdan izole edilen ve araştırma sahasında belirlenen diğer genotiplerden daha uzak belirlenen N genotipine ait izolatlardan Almanya'da bir sığırdan izole edilen aynı genotipe ait izolatla $100,0\%$ identik olduğu ve ayrı bir küme oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 2). N genotipine ait bu izolatlardan en yüksek genetik yakınlığı $99,6\%$ ile Çin ve Almanya'da sığırlardan izole edilen J genotipine ait izolatlara gösterdikleri, yine ilgili izolatlardan aynı ülkelerden rapor edilen 1 genotipine de $99,2\%$ benzer oldukları belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez sığırlarda microsporidia türlerinden *E. bieneusi*'nin varlığı ve yaygınlığı moleküler olarak ortaya konmuştur. Araştırma yöresinde incelenen sığırlarda *E. bieneusi* moleküler prevalansı $19,3\%$ olarak saptanmış olup elde edilen sonuçlar sekans analizleriyle de konfirme

edilmiştir. Saptanan bu moleküler prevalans oranının Çin'in farklı bölgelerinde sütçü sığır ve buzağılarda bildirilen (8,19-22) prevalans oranları ($17,7\%-29,3\%$) ile yakın olduğu görülmüştür. Ayrıca ABD, Brezilya, Arjantin ve Çek Cumhuriyeti'nde yine sütçü sığırlardan $3,1\%$ ile $35,4\%$ arasında değişen *E. bieneusi* yaygınlığı rapor edilmiştir (16,23-25,41,42). Çeşitli ülkelerden bildirilen *E. bieneusi* prevalansındaki farklılıklarda, Qi ve ark.'nın (21) da belirttiği gibi farklı teşhis yöntemlerinin uygulanması, çalışma dizaynı, örneklenen hayvanların coğrafik bölgeleri ve yaşları, çiftlik yönetimi ve mevsimsel varyasyonlar gibi çeşitli faktörlerin önemli olduğu düşünülmüştür.

Çeşitli araştırmalarda (21,24) sığırlarda *E. bieneusi* prevalansında yaşla ilişkili bir azalış olduğu ve bunun da muhtemelen yaşın artması ile gelişen immünite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Jurankova ve ark. (24) Çek Cumhuriyeti'nde *E. bieneusi* prevalansını en yüksek $26,7\%$ ile <3 ay yaş grubu sığırlarda belirlemişler, bunu $18,3\%$, $6,7\%$, ve $10,0\%$ ile 6-8 ay, 14-16 ay ve 28-30 ay yaş gruplarının izlediğini rapor etmişlerdir. Benzer olarak Çin'de yapılan araştırmalarda (19,20) süt emen ve süttan



Şekil 2. *E. bieneusi* izolatlardan ITS rRNA gen bölgesi maximum likelihood (ML) analizine göre filogenetik ilişkileri. Node'ların önündeki rakamlar ML bootstrap desteğini göstermektedir. Dış grup olarak *E. bieneusi* PtEb IX köpek izolatı (DQ885585) kullanılmıştır. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir

Tablo 2. *E. bieneusi* izolatlardan genotiplere göre dağılımı ve GenBank aksesyon numaraları

Microsporidia	Sekanslanan izolat sayısı	Genotip		
		Adı	Ait olan izolat sayısı	GenBank aksesyon
<i>E. bieneusi</i>	29	N	2	MH204102
		ERUSS1	24	MH204103
		ERUSS2	1	MH204104
		ERUSS3	1	MH204105
		ERUSS4	1	MH204106

kesilmiş buzağlarda düve ve ergin sütçü sığırlara oranla daha yüksek *E. bieneusi* prevalansı bildirilmiştir. Buna karşın ABD ve Brezilya'da sütçü sığırlar üzerinde yürütülen çalışmalarda (25,41) süttten kesilmiş buzağlarda süt emen buzağlara oranla daha yüksek enfeksiyon oranları rapor edilmiştir. Çalışmamızda ise yaş gruplarına göre *E. bieneusi* pozitifliği en yüksek %18,0 ile >3 yaş grubu sığırlarda belirlenirken, ≤1 yaş ve 1-3 yaş gruplarındaki prevalans oranları %0,7 olarak tespit edilmiş ve bu farklılık istatistiksel olarak da önemli bulunmuştur. Bu farklılığın yaş grupları arasında incelenen hayvan sayısı dağılımları ile ilişkili olduğu düşünülmüş olsa da elde edilen sonuçlar özellikle ergin sığırların *E. bieneusi* enfeksiyonlarının bulaşması için potansiyel rezervuar olduklarını ortaya çıkarmıştır.

Çalışmamızda dişi ve erkek sığırlar arasında *E. bieneusi* enfeksiyonlarının dağılımında bir farklılık belirlenmemiştir. Cinsiyetin *E. bieneusi* enfeksiyonu üzerine etkisinin bulunmadığı ayrıca sığırlar (43) ve atlar (44) üzerinde yapılan araştırmalarda da kaydedilmiştir. Buna karşın köpek, kedi ve yabani memeliler üzerinde yürütülen bazı araştırmalarda (45-47) ise erkeklerde dişilere oranla daha yüksek enfeksiyon oranları rapor edilmiştir. Sığır ırkları arasında enfeksiyon oranlarının sütçü sığır ırklarında besi sığırlarına oranla daha yüksek olduğu bazı çalışmalarla (20,43) rapor edilirken, Santin ve ark. (48), 6-18 aylık besi sığırlarında enfeksiyon oranlarını daha yüksek belirlemişlerdir. Çalışmamızda ırka göre *E. bieneusi* pozitifliği en yüksek %6,0 ile Holstein ve Montofon ırkında saptanmış olup bunu %4,7 ile Simental ve %2,7 ile Melez ırkları izlemiştir. Yerli ırklarda ise *E. bieneusi* enfeksiyonu saptanmamıştır. Yapılan istatistiksel analizde sığır ırkları arasında enfeksiyonun prevalansı açısından bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda sağlıklı sığırlarda moleküler olarak tanımlanmış 29 *E. bieneusi* izolatının ITS rRNA sekans analizleri ile 5 ayrı genotipe ait oldukları ve tüm genotiplerin genogrup 2'de yer aldığı belirlenmiştir. Bunlar arasında ERUSS1 en yaygın genotip olarak belirlenmiş olup daha sınırlı olduğu görülen diğer genotipler ERUSS2-4 ile genetik olarak çok yakın olduğu dikkati çekmiştir. İlgili genotipler dünyada ilk kez karakterize edilmiş olup, Çin (49,50-53), İsveç (54) ve ABD'de (55) sığır, koyun, çeşitli geyik türleri, kedi, çinçilla ve çeşitli maymun türlerinden rapor edilen ve konak spektrumunu geniş olan BEB6 genotipi (%99,2-%99,6) ve Çin'de bir insandan izole (56) edilen SH5 genotipi (%99,2-%99,6) ile genetik olarak çok yakın oldukları görülmüştür. Bu sonuç ilgili genotiplerin sığırlar dışında diğer hayvan türlerinde de bulunabileceğini ve zoonotik risk potansiyeline sahip olabileceklerini düşündürmüş olmakla birlikte araştırma yöresinde diğer hayvan türleri ve insanlar üzerinde yapılacak kapsamlı araştırmalarla ilgili genotiplerin moleküler epidemiyolojisi ve zoonotik risk potansiyellerinin aydınlatılmasına ihtiyaç bulunmaktadır. Araştırmamızda iki sığırdan bulunan izolatların N genotipine ait olduğu ve yörede saptanan diğer genotiplerden daha farklı olduğu görülmüştür. İlgili genotipin günümüze kadar yalnızca Almanya'da bir sığırdan bildirildiği (GenBank aksesyon: AF267144) görülmektedir. Elde edilen bu sonuç yalnızca sığırlardan rapor edilen ilgili genotipin konak spesifik karakterli olabileceğini desteklemektedir.

SONUÇ

Bu çalışma ile sığırlarda önemli zoonotik microsporidialardan biri olan *E. bieneusi*'nin varlığı ve yaygınlığı ortaya konmuştur.

Elde edilen sonuçlar Türkiye'de sığırlarda ilgili parazit üzerine ilk moleküler verileri sağlamıştır. Ayrıca çalışmada saptanan ERUSS1-4 genotipleri dünyada ilk kez bildirilmiş ve moleküler klasifikasyona kazandırılmıştır. Tespit edilen genotiplerin, zoonotik karakterli diğer bazı genotiplerle birlikte aynı grupta yer alması ve genetik olarak yakın olmaları bu genotiplere ait *E. bieneusi* nesillerinin insanlara bulaşma açısından risk potansiyeli taşıdığını da ortaya çıkarmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2017-7384 nolu proje ile desteklenmiştir.

* Etik

Etik Kurul Onayı: Dışkı materyali hayvanların dışkılamalarını takiben hayvana temas edilmeden yerden alınmış olması nedeniyle etik kurul onayı alınmamıştır.

Hasta Onamı: Sığır dışkı örneklerinde çalışılması nedeniyle hasta onayı alınmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu ve editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

* Yazarlık Katkıları

Konsept: T.B., A.Y., Dizayn: T.B., A.Y., Veri Toplama veya İşleme: T.B., S.U., G.K.K., M.O., G.Y., Analiz veya Yorumlama: T.B., A.Y., S.U., Literatür Arama: T.B., S.U., G.K.K., M.O., G.Y., Yazan: T.B., A.Y., M.O., S.U.

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Finansal Destek: Çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2017-7384 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic potential of the microsporidia. Clin Microbiol Rev. 2005;18:423-445.
- Vávra J, Lukeš J. Microsporidia and 'the art of living together'. Adv Parasitol. 2013;82:253-319.
- Keeling P. Five questions about microsporidia. PLoS Pathogens. 2009;5:e1000489.
- Santin M, Fayer R. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. Res Vet Sci. 2011;90:363-371.
- Matos O, Lobo ML, Xiao L. Epidemiology of *Enterocytozoon bieneusi* Infection in Humans. J Parasitol Res. 2012;2012:981424.
- Thellier M, Breton J. *Enterocytozoon bieneusi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. Parasite. 2008;15:349-358.
- Santin M, Fayer R. *Enterocytozoon bieneusi* genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence: a consensus. J Eukar Microbiol. 2009;56:34-8.
- Jiang Y, Tao W, Wan Q, Li Q, Yang Y, Lin Y, et al. Zoonotic and potentially host-adapted *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in sheep and cattle in northeast China and an increasing concern about the zoonotic importance of previously considered ruminant-adapted genotypes. Appl Environ Microbiol. 2015;81:3326-3335.
- Zhao W, Yu S, Yang Z, Zhang Y, Zhang L, Wang R, et al. Genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) isolated from various birds in China. Infec Gen Evol. 2016;40:151-154.
- Karim MR, Dong H, Li T, Yu F, Li D, Zhang L, et al. Predominance and new genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in captive nonhuman primates

- in zoos in China: high genetic diversity and zoonotic significance. *PloS One*. 2015;10:e0117991.
11. Deng L, Li W, Zhong Z, Gong C, Liu X, Huang X, et al. Molecular characterization and multilocus genotypes of *Enterocytozoon bienersi* among horses in southwestern China. *Parasit Vectors*. 2016;9:561.
 12. Li W, Deng L, Yu X, Zhong Z, Wang Q, Liu X, et al. Multilocus genotypes and broad host-range of *Enterocytozoon bienersi* in captive wildlife at zoological gardens in China. *Parasit Vectors*. 2016;9:395.
 13. Karim MR, Wang R, Dong H, Zhang L, Li J, Zhang S, et al. Genetic polymorphism and zoonotic potential of *Enterocytozoon bienersi* from nonhuman primates in China. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80:1893-8.
 14. Li N, Xiao L, Wang L, Zhao S, Zhao X, Duan L, et al. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bienersi* by genotyping and subtyping parasites in wastewater. *PLoS Neg Trop Dis*. 2012;6:e1809.
 15. Jiang Y, Tao W, Wan Q, Li Q, Yang Y, Lin Y, et al. Zoonotic and potentially host-adapted *Enterocytozoon bienersi* genotypes in sheep and cattle in Northeast China and an increasing concern about the zoonotic importance of previously considered ruminant-adapted genotypes. *Appl Environ Microbiol*. 2015; 81: 3326-3335.
 16. Del Cocco VF, Cordoba MA, Bilbao G, de Almeida Castro P, Basualdo JA, Santin M. First report of *Enterocytozoon bienersi* from dairy cattle in Argentina. *Vet Parasitol*. 2014;199:112-5.
 17. Zhao W, Zhang W, Yang F, Zhang L, Wang R, Cao J, et al. *Enterocytozoon bienersi* in dairy cattle in the northeast of China: genetic diversity of ITS gene and evaluation of zoonotic transmission potential. *J Eukaryot Microbiol*. 2015;62:553-560.
 18. Tang C, Cai M, Wang L, Guo Y, Li N, Feng Y, et al. Genetic diversity within dominant *Enterocytozoon bienersi* genotypes in pre-weaned calves. *Parasit Vectors*. 2018;11:170.
 19. Li J, Luo N, Wang C, Qi M, Cao J, Cui Z, et al. Occurrence, molecular characterization and predominant genotypes of *Enterocytozoon bienersi* in dairy cattle in Henan and Ningxia, China. *Parasit Vectors*. 2016;9:142.
 20. Ma J, Li P, Zhao X, Xu H, Wu W, Wang Y, et al. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bienersi* in dairy cattle, beef cattle and water buffaloes in China. *Vet Parasitol*. 2015;207:220-7.
 21. Qi M, Jing B, Jian F, Wang R, Zhang S, Wang H, et al. Dominance of *Enterocytozoon bienersi* genotype J in dairy calves in Xinjiang, Northwest China. *Parasitol Int*. 2017;66:960-3.
 22. Wang XT, Wang RJ, Ren GJ, Yu ZQ, Zhang LX, Zhang SY, et al. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bienersi* in dairy and native beef (Qinchuan) calves in Shaanxi province, northwestern China. *Parasitol Res*. 2016;115:1355-1361.
 23. Fayer R, Santin M, Macarasin D. Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. *Parasitol Res*. 2012;111:1349-1355.
 24. Juránková J, Kamler M, Kovarcik K, Koudela B. *Enterocytozoon bienersi* in Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) infected and noninfected cattle herds. *Res Vet Sci*. 2013;94:100-4.
 25. Santin M, Fayer R. A longitudinal study of *Enterocytozoon bienersi* in dairy cattle. *Parasitol Res*. 2009;105:141-4.
 26. Sak B, Brady D, Pelikanova M, Květoňová D, Rost M, Kostka M, et al. Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. *J Clin Microbiol*. 2011;49:1064-1070.
 27. Zhang X, Wang Z, Su Y, Liang X, Sun X, Peng S, et al. Identification and genotyping of *Enterocytozoon bienersi* in China. *J Clin Microbiol*. 2011;49:2006-8.
 28. Çetinkaya Ü, Yazar S, Kuk S, Sivcan E, Kaynar L, Arslan D, et al. The high prevalence of *Encephalitozoon intestinalis* in patients receiving chemotherapy and children with growth retardation and the validity of real-time PZR in its diagnosis. *Turk J Medical Sci*. 2016;46:1050-8.
 29. Oğuz İ, Doğruman AF, Mumcuoğlu İ. İshalli olgularda microsporidia sıklığının Calcofluor Beyazı ve Uvitex 2B kemolüminesans boyama yöntemleriyle araştırılması ve tiplendirilmesi. 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 2013 28 Eylül-4 Ekim; Denizli. Türkiye; 2013.
 30. Özkoç S, Bayram Delibaş S, Akısü Ç. Evaluation of pulmonary microsporidiosis in iatrogenically immunosuppressed patients. *Tuberk Toraks*. 2016;64:9-16.
 31. Duzlu O, Yildirim A, Onder Z, Çilgözü A, Yetismis G, İnci A. Prevalence and Genotyping of Microsporidian Parasites in Dogs in Turkey: Zoonotic Concerns. *J Eukaryot Microbiol*. 2019;66:771-777.
 32. Pekmezci D, Pekmezci GZ, Yildirim A, Duzlu O, İnci A. Molecular Detection of Zoonotic Microsporidia in Domestic Cats in Turkey: A Preliminary Study. *Acta Parasitol*. 2019;64:13-18.
 33. Ercan N. Tavuklarda *Enterocytozoon bienersi* ve *Encephalitozoon* spp. türlerinin moleküler prevalansı, genotiplendirilmesi ve insan sağlığı açısından risk potansiyelleri. Doktora Tezi. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Kayseri. 2019.
 34. Buckholt MA, Lee JH, Tzipori S. Prevalence of *Enterocytozoon bienersi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:2595-2599.
 35. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012;28:1647-9.
 36. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980;16:111-120.
 37. Nei M. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Ann Rev Gen*. 1996;30:371-403.
 38. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33:1870-4.
 39. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol*. 2008;25:1253-6.
 40. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*. 2003;52:696-704.
 41. da Silva Fiuza VR, Lopes CW, de Oliveira FC, Fayer R, Santin M. New findings of *Enterocytozoon bienersi* in beef and dairy cattle in Brazil. *Vet Parasitol*. 2016;216:46-51.
 42. Fayer R, Santin M, Trout JM. First detection of microsporidia in dairy calves in North America. *Parasitol Res*. 2003;90:383-386.
 43. Fiuza VR, Lopes CW, Cosendey RI, de Oliveira FC, Fayer R, Santin M. Zoonotic *Enterocytozoon bienersi* genotypes found in Brazilian sheep. *Res Vet Sci*. 2016;107:196-201.
 44. Santin M, Vecino JA, Fayer R. A zoonotic genotype of *Enterocytozoon bienersi* in horses. *J Parasitol*. 2010;96:157-161.
 45. Sak B, Salat J, Horka H, Saková K, Ditrich O. Antibodies enhance the protective effect of CD4+ T lymphocytes in SCID mice perorally infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasite Immunol*. 2006;28:95-9.
 46. Sulaiman IM, Fayer R, Lal AA, Trout JM, Schaefer FW 3rd, Xiao L. Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals harbor host-adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bienersi*. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:4495-4501.
 47. Santin M, Cortes Vecino JA, Fayer R. *Enterocytozoon bienersi* genotypes in dogs in Bogota, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79:215-217.
 48. Santin M, Dargatz D, Fayer R. Prevalence and genotypes of *Enterocytozoon bienersi* in weaned beef calves on cow-calf operations in the USA. *Parasitol Res*. 2012;110:2033-2041.
 49. Karim MR, Dong H, Yu F, Jian F, Zhang L, Wang R, et al. Genetic diversity in *Enterocytozoon bienersi* isolates from dogs and cats in China: host specificity and public health implications. *J Clin Microbiol*. 2014;52:3297-3302.
 50. Du SZ, Zhao GH, Shao JF, Fang YQ, Tian GR, Zhang LX, et al. *Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis*, and *Enterocytozoon bienersi* in captive non-human primates in Qinling Mountains. *Korean J Parasitol*. 2015;53:395-402.

51. Peng XQ, Tian GR, Ren GJ, Yu ZQ, Lok JB, Zhang LX, et al. Infection rate of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bienersi* in cashmere, dairy and meat goats in China. *Infect Gen Evol.* 2016;41:26-31.
52. Ye J, Xiao L, Wang Y, Guo Y, Roellig DM, Feng Y. Dominance of *Giardia duodenalis* assemblage A and *Enterocytozoon bienersi* genotype BEB6 in sheep in Inner Mongolia, China. *Vet Parasitol.* 2015;210:235-239.
53. Zhang XX, Jiang J, Cai YN, Wang CF, Xu P, Yang GL, et al. Molecular characterization of *Enterocytozoon bienersi* in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Northeastern China. *Korean J Parasitol.* 2016;54:81-85.
54. Stensvold CR, Beser J, Ljungstrom B, Troell K, Lebbad M. Low host-specific *Enterocytozoon bienersi* genotype BEB6 is common in Swedish lambs. *Vet Parasitol.* 2014;205:371-374.
55. Fayer R, Santin M, Trout JM. *Enterocytozoon bienersi* in mature dairy cattle on farms in the eastern United States. *Parasitol Res.* 2007;102:15-20.
56. Wang L, Xiao L, Duan L, Ye J, Guo Y, Guo M. et al. Concurrent infections of *Giardia duodenalis*, *Enterocytozoon bienersi*, and *Clostridium difficile* in children during a cryptosporidiosis outbreak in a pediatric hospital in China. *PLoS Neg Trop Dis.* 2013;7:e2437.

Molecular Characterization and Phylogenetic Analyses of *Oestrus ovis* Larvae Causing Human Naso-pharyngeal Myiasis Based on CO1 Barcode Sequences

İnsan Naso-pharyngeal Myiasis'ine Neden Olan Oestrus ovis Larvalarının CO1 Barkod Sekanslarına Göre Moleküler Karakterizasyonu ve Filogenetik Analizi

© Gupse Kübra Karademir, © Sadullah Usluğ, © Mübeccel Okur, © Abdullah İnci, © Alparslan Yıldırım
Erciyes University Faculty of Veterinary Medicine, Parasitology Department, Kayseri, Turkey

Cite this article as: Karademir GK, Usluğ S, Okur M, İnci A, Yıldırım A. Molecular Characterization and Phylogenetic Analyses of *Oestrus ovis* Larvae Causing Human Naso-pharyngeal Myiasis Based on CO1 Barcode Sequences. Türkiye Parazitoloj Derg 2020;44(1):43-7.

ABSTRACT

Objective: The identification and molecular characterization of the bot fly larvae from an infected human with naso-pharyngeal myiasis in Turkey were aimed in this study.

Methods: A total of 8 bot fly larvae from a 49-year-old woman with naso-pharyngeal infection in Adana province constituted the materials of this study. Morphological identification was performed on the larvae according to described keys. The barcode region of the CO1 gene from the genomic DNA extracts of the larvae was amplified and sequence analyses were utilized. Haplotype and genetic distance analyses were performed in CO1 sequences and a phylogenetic tree was built revealing phylogenetic relationships.

Results: All bot fly larvae were identified as second stage larvae of *Oestrus ovis* in terms of morphologic characteristics. There was no polymorphism among the CO1 sequences of all isolates leading to detection of a single novel haplotype. The newly characterized haplotype in this study clustered with the *O. ovis* haplotypes from Bosnia and Herzegovina, Croatia, Brazil, and Iran in a monophyletic clade with an overall identity of 99.5%. Interspecific genetic differences among the subfamilies of Oestridae were in the range of 19.8% to 30.8%.

Conclusion: This study has provided the first molecular characterization data on *O. ovis* larvae from an accidental human host in Turkey based on CO1 barcode sequences.

Keywords: *Oestrus ovis*, human naso-pharyngeal myiasis, DNA barcoding, molecular characterization, Turkey

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada, naso-pharyngeal myiasis ile enfekte bir insandan elde edilmiş bot sineği larvalarının identifikasyonu ve moleküler karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Yöntemler: Adana bölgesinde naso-pharyngeal myiasis enfeksiyonu olan 49 yaşındaki bir kadından elde edilen sekiz adet bot sineği larvası çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Larvaların teşhis anahtarlarına göre morfolojik teşhisleri yapılmıştır. Larva örneklerinin genomik DNA ekstraktlarında barkod CO1 geni amplifiye edilmiştir. CO1 sekanslarında haplotip ve genetik farklılık analizleri yapılmış ve ilişkileri göstermek için filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

Bulgular: Morfolojik özelliklerine göre tüm bot sineği larvaları *O. ovis*'in ikinci dönem larvası olarak teşhis edilmiştir. İzolatların CO1 sekansları arasında polimorfizm belirlenmemiş olup bu sonuç *O. ovis* için yeni bir haplotipin varlığını ortaya çıkarmıştır. Çalışmada yeni karakterize edilen haplotip Bosna-Hersek, Hırvatistan, Brezilya ve İran'dan rapor edilmiş *O. ovis* haplotipleriyle ortalama %99,5 identiklik göstererek kümelenme göstermiştir. Oestridae alt aileleri arasındaki interspesifik genetik farklılıklar %19,8-%30,8 olarak belirlenmiştir.

Sonuç: Bu çalışma Türkiye'de rastlantısal bir insan konakta belirlenen *O. ovis* larvaları üzerine CO1 barkod sekansları temelinde ilk moleküler karakterizasyon verilerini sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: *Oestrus ovis*, insan naso-pharyngeal myiasis, DNA barkodlama, moleküler karakterizasyon, Türkiye



Received/Geliş Tarihi: 02.03.2020 Accepted/Kabul Tarihi: 05.03.2020

Address for Correspondence/Yazar Adresi: Gupse Kübra Karademir MD, Erciyes University Faculty of Veterinary Medicine, Parasitology Department, Kayseri, Turkey

Phone/Tel: +90 352 207 66 66 E-mail/E-Posta: gupsekarademir@gmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0002-3594-1770

INTRODUCTION

The infestations caused by larvae of Diptera in animals and humans are known as myiasis. The larvae belong to the species of Calliphoridae, Sarcophagidae and Oestridae families are the most common and important causative myiasis agents (1). Oestridae is a diverse family of Diptera comprising about 180 described species worldwide and their larvae have a variety of feeding habits, mostly saprophages, endoparasites, parasitoids, and predators (2). They cause often severe economic losses by reducing production, causing damages to hides and increasing treatment costs. Myiasis caused by *O. ovis* has a global distribution, especially in rural and underdeveloped regions of tropical and subtropical areas. Domestic sheep and goats are thought to be the main host and also reservoir to other hosts especially those in wildlife (3). The transmission of *O. ovis* occurs when females deposit larvae onto the nostrils of sheep and goats. Their movement and development in the nasal-sinus cavities can cause pathologic and clinical symptoms including rhinitis, frequent sneezing, nasal discharge, breathing difficulties, and emaciation. The annoyance of the adult flies can also lead to significantly reduced animal production by effecting meat, wool and milk production (2). The gravid females are not strictly host-specific and even only a few reports (4), ophthalmic and naso-pharyngeal myiasis also occurred in humans especially the ones close relationship to livestock in several countries.

Oestrosis caused by *O. ovis* also common in sheep and goats in Turkey and several studies have reported a prevalence rate of 36% to 59% in different regions (5-7). Sporadic cases of human ophthalmic and naso-pharyngeal myiasis have been also documented from some regions in Turkey (8-12). However, there has been no study regarding molecular and phylogenetic characterization of *O. ovis* lineages found in Turkey except a single GenBank record of partial mt-CO1 sequence of an isolate from Diyarbakır province (GenBank accession: KT761199).

Molecular phylogenetic studies on *O. ovis* populations are very limited compared to the studies based on etiology, taxonomy, biology, immunology, treatment and control approaches. Mitochondrial DNA (mtDNA) is a useful tool for evaluating genomic differences and homologies among taxonomically related species of both vertebrates and invertebrates. Due to its high number of copies, easier isolation, and high phylogenetic signal and mutational rates, mtDNA has been widely used for taxonomic, population and evolutionary investigations across metazoan taxa (13-15). The 658 bp region of CO1 is widely accepted as a universal and standard marker for all animal taxa (14). During the last decade, DNA barcoding using CO1 sequences has provided an efficient tool for molecular identification and phylogenetic characterization of several kinds of insect species including Oestridae family (16-19).

In this study, we aimed to characterize the *O. ovis* larvae from an infested human with naso-pharyngeal myiasis by using CO1 barcode sequences. Phylogenetic relationships among the identified larvae and the corresponding species in the Oestridae were also revealed in the study.

METHODS

Bot Fly Larvae from a Human with Naso-pharyngeal Myiasis

A total of 8 bot fly larvae obtained from a 49-year-old woman with naso-pharyngeal myiasis living in Adana province were sent

to parasitology laboratory in the sterile tubes with 70% ethanol by a public veterinarian working in the same province. No need to take ethical approval for the study according to directions of the Erciyes University Local Ethics Committee for Animal Experiments with the date 29.01.2016 and no 04 due to the material comprised of insect species. The identification of fly larvae was utilized under a stereo microscope (SZX16, Olympus, Japan) with the identification keys described by Zumpt (1) and the images were recorded.

Genomic DNA Extraction and PCR Amplification of CO1 Gene

Genomic DNA (gDNA) was extracted from the tissue sections of each individual larvae specimens using GeneJET gDNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). The tissue pieces from the larvae were homogenized with the TissueLyser LT (Qiagen, UK) prior to gDNA extraction. The gDNA concentration of larvae was measured by Qubit Fluorometric Quantitation (Thermo Fisher Scientific, USA) to determine the optimum amount of DNA in the PCR mastermix. gDNA isolates were stored at -20 °C until PCR analyses.

The universal barcode region of CO1 gene (709 bp) of the individual larvae was amplified using the common primers of Folmer et al. (20). Amplifications were utilized in C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) using described conditions (20) by adjusting the annealing temperature to 50 °C. The amplicons were visualized in the Fusion FX Gel Documentation System (Vilber Lourmat, France) by loading 5µL of PCR products on 1.5% w/v agarose gel.

CO1 Sequence Analysis and Phylogenetic Relationships of Bot Fly

PCR products were gel purified using a commercial kit (Thermo Fisher Scientific, USA) and purified amplicons were sequenced in both directions with the amplification primers in the Sanger Sequencing Platform (Macrogen, Netherlands). The primer sequences in all reads were trimmed prior to analyses. The final forward and reverse sequences were assembled in Geneious Prime 2019.2.1 (<https://www.geneious.com>) and a single consensus sequence was obtained with the *De Novo Assemble* tool in the related software.

The final sequences were searched in the NCBI database by using the BLASTn algorithm. A CO1 data set was constituted with totally 22 sequences belong to genetically related sequences from different countries in the GenBank for phylogenetic analyses. Multiple alignments of the sequences in CO1 dataset were utilized using MUSCLE plugin in Geneious Prime (21). DNA polymorphism and haplotype analyses were performed with DnaSp v.5.1 (22). Intraspecific and interspecific differences were calculated in MEGA 7 (23) using the Kimura two-parameter model (24).

For inferring phylogenetic relationships in the CO1 dataset Maximum Likelihood (ML) estimation was utilized. GTR+G+I was determined as the suitable DNA substitution model for ML analyses using the software jModeltest v.0.1.1 (25). The plugin of PhyML in Geneious Prime was used for the construction of ML tree (26). The reliability of branching of the ML tree was analyzed using a bootstrap resampling of 1000 replications.

RESULTS

Human Case of Naso-pharyngeal Myiasis

A 49-year-old woman living in Adana province was diagnosed with naso-pharyngeal myiasis in the hospital. In our conversation, she complained of about two months of nasal pruritus and sensation of congestion with sanguinolent discharge from her nostrils. She also reported having frequent sneezing, coughing, tear in gland nausea in the related period. After getting non-specific medical approaches such as using cortisone or decongestants two bot fly larvae were dropped. Following the detection of these parasites, she got antiparasitic treatment and further six larvae were dropped from the nostrils.

Morphologic Identification of the Bot Fly Larvae

All the eight larvae were sent to our parasitology laboratory and identified as second stage larvae of *O. ovis* according to the morphological features under stereo microscope (Figure 1). The size of larvae specimens was 4-5 mm and they demonstrated anterior hooks, dark posterior spiracles with a flat side medially, and respiratory holes arranged radially.

Sequence Characterization and Phylogenetic Relationships

The barcode region of CO1 mtDNA was successfully amplified for all the eight isolates in PCR analyses (Figure 2). The consensus sequences covering the 658 bp barcode CO1 region from all reads were successfully obtained with high-quality chromatogram scores. The sequences were validated by translation analyses with the absence of insertions, deletions, or stop codons indicating functional mitochondrial products. The BLASTn analysis of the obtained sequences confirmed the morphological identifications as the specimens belonged to *O. ovis*. No polymorphic sites were

found among the CO1 sequences of all eight isolates resulting in the detection of a single haplotype (ERU-Oov1). The CO1 sequence of ERU-Oov1 was deposited to the GenBank with accession MT124626. The base composition of the barcode sequence of the obtained haplotype was highly AT biased with a mean GC content of 34.2%.

A total of 303 polymorphic sites, of which 244 were parsimony informative, were determined within the entire CO1 data set including the sequences of the species belonging to Gasterophilinae, Cuterebrinae, Oestrinae, Cephemyiinae and Hypodermatinae subfamilies of Oestridae. Totally four different haplotypes were determined among the CO1 sequences of the *O. ovis* and the ERU-Oov1 represented a new haplotype of the corresponding species. Mean haplotype and nucleotide diversities for *O. ovis* were 0.900 and 0.026, respectively. Intraspecific nucleotide differences for *O. ovis* were determined within range of 0.00% to 0.61% and the mean genetic difference was $0.37 \pm 0.15\%$. Interspecific differences among the subfamilies of Oestridae in the CO1 data set were presented in Table 1. The species of Hypodermatinae and Cuterebrinae; Cephemyiinae and Oestrinae were closer to each other as sister taxon. The species of Gasterophilinae were clustered into two distinct clades and found more distant from other subfamilies of Oestridae and the clade including *Cobboldia* species constituted outer taxa (Figure 3).

The ML tree is presented in Figure 3 with bootstrap support values. All the sequences classified within species-based clades in subfamily taxa with the support of bootstrap values over 69.0%. The novel ERU-Oov1 haplotype clustered in a monophyletic clade with the published haplotypes of *O. ovis* indicated in Figure 3 with a high bootstrap value (100.0%). The ERU-Oov1 was exhibited highest identity of 99.5% to the *O. ovis* isolates reported from Bosnia and Herzegovina (MG755264), Croatia (MN845130) and Brazil (KR820703) and also showed an identity rate of 99.4% to the isolate reported from Iran (KX268655).

DISCUSSION

A naso-pharyngeal myiasis case in a woman living in Adana province was determined and the recovered bot fly larvae identified as the second stage larvae of *O. ovis* based on the morphological characters. The size and the shape of larvae and the shape of posterior spiracles were consistent with those reported by Zumpt (1). The clinical signs of the infection in the woman patient also consistent with the several naso-pharyngeal myiasis

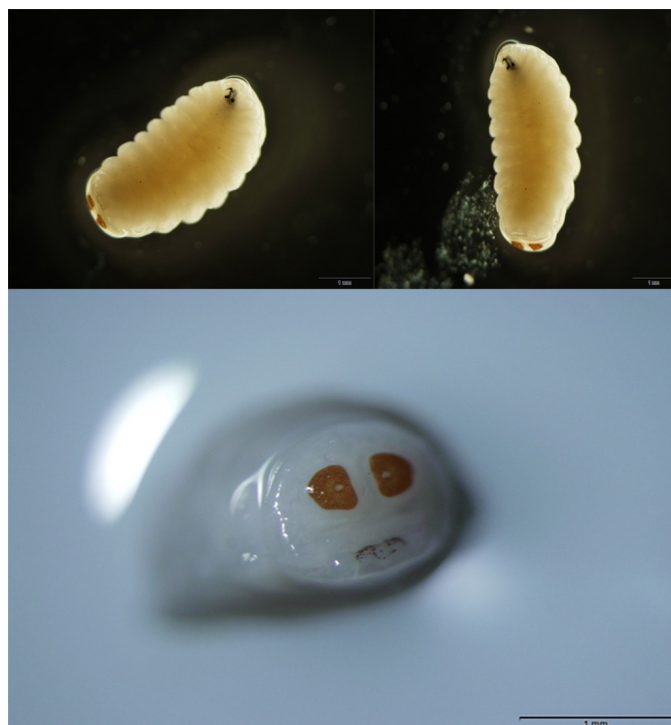


Figure 1. Second stage larvae of *O. ovis* causing human naso-pharyngeal myiasis

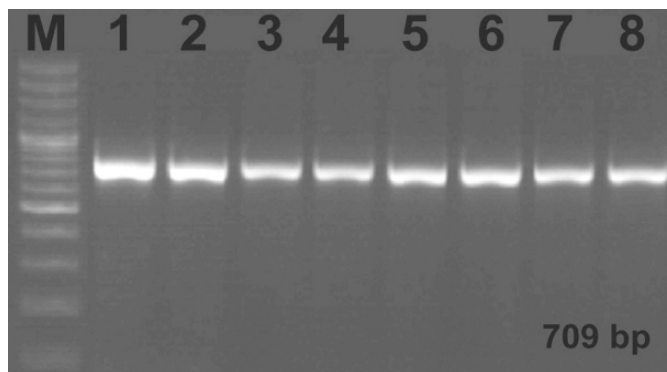


Figure 2. PCR amplicons of the barcode CO1 region of *O. ovis* isolates. M: Marker (100 bp), 1-8: gDNA from *O. ovis* larvae specimens

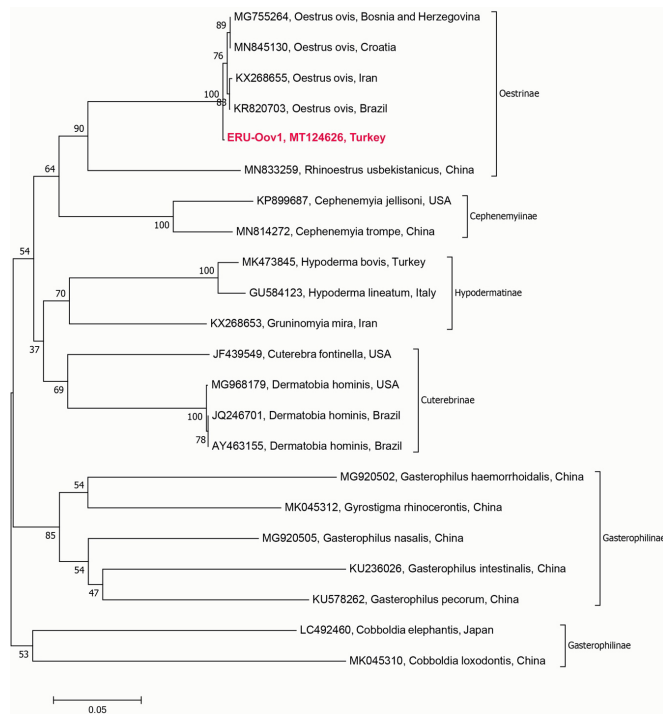


Figure 3. Phylogenetic analysis of *O. ovis* and other species of Oestridae subfamilies. The characterized haplotype was shown in bold red character. Bootstrap values (1000 replicates) was shown at the nodes. The scale bar represents a 0.05% divergence

Table 1. Interspecific genetic distances (below the diagonal) \pm standard deviations (above the diagonal) for Oestridae subfamilies

		1	2	3	4	5
1	Oestrinae	-	0.021	0.022	0.022	0.022
2	Cephemyiinae	0.203	-	0.022	0.020	0.024
3	Cuterebrinae	0.221	0.226	-	0.019	0.021
4	Hypodermatinae	0.234	0.212	0.198	-	0.022
5	Gasterophilinae	0.284	0.308	0.277	0.296	-

cases reported from several countries including Turkey (27-32). Accidental myiasis caused by *O. ovis* larvae has been also reported from conjunctival sac (ophthalmomyiasis) (33), the throat (34), the nose (35), and the ears of humans (36).

Molecular data are still rather limited for bot flies, and the data currently available for Oestridae include mainly partial sequences of mitochondrial genes especially CO1. However, most of the sequences available in GenBank are from different fragments of CO1 rather than 658 bp barcode region commonly used as a diagnostic marker (13-15). Therefore, it is not possible to compare all CO1 sequences of bot flies including *O. ovis* in our study. However, it was obvious that the barcode region successfully discriminates the species in all subfamilies of Oestridae with relatively high rate of barcoding gaps. Our result is also consistent with the findings of Otranto et al. (37), who reported significant interspecific divergences among the 18 species of Oestridae that cause myiasis by using a different fragment of CO1 as a phylogenetic marker. With only available four *O. ovis* barcode sequences in GenBank,

our newly characterized haplotype clustered together with those reported from Bosnia and Herzegovina (MG755264), Croatia (MN845130), Brazil (KR820703) and Iran (KX268655) in a monophyletic clade and intra-specific genetic distance among the haplotypes were equal or less than 0.6%. This result may indicate a possible low polymorphism in this species with scarce gene flow among the populations from different geographical regions. Low intra-specific distances based on different fragments of CO1 from other bot fly species such as *Przhevalskiana silenus* (18,37), *Hypoderma bovis*, *H. lineatum*, *H. diana*, *H. tarandi*, *Gasterophilus intestinalis*, *G. haemorrhoidalis*, *G. nasalis* and *Cuterebra baeri* (37) in different countries were also emphasized and all these results might provide an evidence on the absence or lower cryptic diversity in the species of Oestridae. However, for a better understanding of the evolution of *O. ovis*, more comprehensive set of samples from different regions of Turkey and also the world is needed to be analyzed by using both mitochondrial and nuclear markers preferably mitogenomes.

CONCLUSION

This study provides the first molecular characterization data on *O. ovis* larvae causing naso-pharyngeal myiasis in a human in Turkey based on barcode CO1 sequences. Although limited sequences were included in the data set, our findings revealed an evidence on the close association within *O. ovis* from different countries. The barcode CO1 sequence analyses were successfully differentiate the species of the subfamilies in Oestridae and this result indicates the usefulness of the CO1 as a suitable diagnostic molecular marker for identification and characterization of bot fly species.

Acknowledgements: The authors thank Nuri Güngör, DVM for giving kind information on the naso-pharyngeal myiasis human case and also providing and sending the larvae specimens to our laboratory.

* Ethics

Ethics Committee Approval: As this study conducted on insect species, there was no need to take ethical approval.

Informed Consent: Patient approval has not been obtained in case of using insect species in the study.

Peer-review: Externally and internally peer-reviewed.

* Authorship Contributions

Concept: G.K.K., A.Y., Design: A.Y., G.K.K., M.O., S.U., A.I., Data Collection or Processing: G.K.K., A.Y., M.O., S.U., Analysis or Interpretation: A.Y., G.K.K., M.O., S.U., A.I., Literature Search: S.U., G.K.K., M.O., Writing: A.Y., G.K.K., M.O., S.U., I.A.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

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

REFERENCES

- Zumt F. Myiasis in Man and Animals in the Old-world Ed. London: Butterworth, 1965.
- Scholl PJ, Colwell DD, Cepeda-Palacios R. Myiasis (Muscoidea, Oestroidea). In: Mullen GR, Durden LA, editors. Medical and Veterinary Entomology. London: Academic Press; 2019. p.383-419.

3. Colwell DD. Bot flies and warble flies (Order Diptera: Family Oestridae). In: Samuel WM, Pybus MJ, Kocan AA, editors. Parasitic Diseases of Wild Mammals, London: Manson Publishing/The Veterinary Press; 2001. p.46-71.
4. Panadero-Fontán R, Otranto D. Arthropods affecting the human eye. Vet Parasitol. 2015;208:84-93.
5. Gokcen A, Sevgili M. Prevalence and larval burden of *Oestrus ovis* in Awassi sheep from Sanliurfa region of Turkey. Indian Vet J. 2004;81:1168-1169.
6. Uslu U, Dik B. Prevalence and intensity of *Oestrus ovis* in Akkaraman sheep in the Konya region of Turkey. Med Vet Entomol. 2006;20:347-349.
7. Arslan MO, Kara M, Gicik Y. Epidemiology of *Oestrus ovis* infestations in sheep in Kars province of north-eastern Turkey. Trop Anim Health Prod. 2009;41:299-305.
8. Yar K, Özcan AA, Koltaş İS. External ophthalmomyiasis: case reports. Turkiye Parazit Derg. 2011;35:224-226.
9. Akdemir MO, Ozen S. External ophthalmomyiasis caused by *Oestrus ovis* misdiagnosed as bacterial conjunctivitis. Trop Doct. 2013;43:120-123.
10. Çalışkan S, Ugurbaş SC, Sağdıç M. Ophthalmomyiasis externa: three cases caused by *Oestrus ovis* larvae in Turkey. Trop Doct. 2014;44:230-232.
11. İstek Ş. Ophthalmomyiasis externa from Hakkari, the south east border of Turkey. BMJ Case Rep. 2014;bcr2013201226.
12. Özyol P, Özyol E, Sankur F. External ophthalmomyiasis: a case series and review of ophthalmomyiasis in Turkey. Int Ophthalmol. 2016;36:887-891.
13. Hebert PD, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. Proc. Natl Acad Sci USA. 2004;41:14812-14817.
14. Hebert PD, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM. Identification of birds through DNA Barcodes. PLoS Biol. 2004;2:e312.
15. Hebert PD, Gregory TR. The promise of DNA barcoding for taxonomy. Syst Biol. 2005;54:852-859.
16. Moreno V, Romero-Fernández I, Marchal JA, Beltrán M, Granados JE, Habela MA, et al. Molecular characterization of bot flies, *Oestrus* spp. (Diptera, Oestridae), from domestic and wild Bovidae hosts. Vet Parasitol. 2015;212:473-477.
17. Cavallero S, Pombi M, Perrone V, Milardi GL, D'Amelio S, Giuliani C, et al. *Gasterophilus intestinalis* (Diptera: Oestridae) in the diaphragmatic muscle: An unusual finding. Vet Parasitol. 2017;237:117-121.
18. Rakhshandehroo E, Razavi SM, Farzaneh R, Esmailnejad A, Asadpour M, Shams S. Phylogenetic analysis of goat warble fly (*Przhevalskiana silenus*) based on mitochondrial COI gene. J Parasit Dis. 2019;43:304-307.
19. Li XY, Pape T, Zhang D. *Gasterophilus flavipes* (Oestridae: Gasterophilinae): A horse stomach bot fly brought back from oblivion with morphological and molecular evidence. PLoS One. 2019;14:e0220820.
20. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mar Biotechnol (NY). 1994;3:294-299.
21. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 2004;32:1792-1797.
22. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. 2009;25:1451-1452.
23. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol. 2016;33:1870-1874.
24. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol. 1980;16:111-120.
25. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. Mol Biol Evol. 2008;25:1253-1256.
26. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol. 2003;52:696-704.
27. Verstryngge K, Foets B. External ophthalmomyiasis: a case report. Bull Soc Belge Ophthalmol. 2004;67-71.
28. Yaghoobi R, Targari S, Sina N. Human auricular myiasis caused by *Lucilia sericata*: clinical and parasitological considerations. Acta Med Iran. 2005;43:155-157.
29. Akdemir MO, Ozen S. External ophthalmomyiasis caused by *Oestrus ovis* misdiagnosed as bacterial conjunctivitis. Trop Doct. 2013;43:120-123.
30. Najjari M, Shafiei R, Fakoorziba MR. Nosocomial myiasis with *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) in an ICU patient in Mashhad, Northeastern of Iran. Arch Iran Med. 2014;17:523-525.
31. Alizadeh M, Mowlavi G, Kargar F, Nateghpour M, Akbarzadeh K, Hajenorouzi-Tehrani M. A review of myiasis in Iran and a new nosocomial case from Tehran Iran. J Arthropod Borne Dis. 2014;8:124-131.
32. Hazratian T, Tagizadeh A, Chaichi M, Abbasi M. Pharyngeal Myiasis Caused by Sheep Botfly, *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) Larva, Tabriz, East Azarbaijan Province, Iran: a Case Report. J Arthropod Borne Dis. 2017;11:166-170.
33. Fries FN, Pattmüller M, Seitz B, Berger F, Kampen H, Szentmáry N, et al. Ophthalmomyiasis externa due to *Oestrus ovis* in a traveller returning from Greece. Travel Med Infect Dis. 2018;23:101-102.
34. Masoodi M, Hosseini K. The respiratory and allergic manifestations of human myiasis caused by larvae of the sheep bot fly (*Oestrus ovis*): A report of 33 pharyngeal cases from southern Iran. Ann Trop Med Parasitol. 2003;97:75-81.
35. Hoyer P, Williams RR, Lopez M, Cabada MM. Human nasal myiasis caused by *Oestrus ovis* in the highlands of Cusco, Peru: report of a case and review of the literature. Case Rep Infect Dis. 2016;2456735.
36. White ZL, Chu MW, Hood RJ. Nasal myiasis: A case report. Ear Nose Throat J. 2015;94:E24-25.
37. Otranto D, Traversa D, Guida B, Tarsitano E, Fiorente P, Stevens JR. Molecular characterization of the mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) gene of Oestridae larvae causing obligate myiasis. Med Vet Entomol. 2003;17:307-315.

Hatay'da Göç Öncesi ve Sonrası Saptanan Kutanöz Leishmaniasis Olgularının Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Genotiplendirilmesi

Genotyping of Cutaneous Leishmaniasis Cases Detected Before and After Migration with Real-Time Polymerase Chain Reaction in Hatay

© Gülnaz Çulha¹, © Tuğba Kaya¹, © Asena Çiğdem Doğramacı²

¹Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

²Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deri ve Zührevi Hastalıkları Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

Cite this article as: Çulha G, Kaya T, Doğramacı AÇ. Hatay'da Göç Öncesi ve Sonrası Saptanan Kutanöz Leishmaniasis Olgularının Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Genotiplendirilmesi. Türkiye Parazitoloj Derg 2019;43(4):48-51.

ÖZ

Amaç: Türkiye'de Kutanöz Leishmaniasise (KL) sebep olan türler *Leishmania tropica* (*L. tropica*) ve *Leishmania infantum*'dur (*L. infantum*). Suriye'den diğer ülkelere 2011 yılındaki iç karışıklıktan dolayı büyük bir göç olmuştur. KL'nin endemik olduğu Suriye'den diğer ülkelere olan göçün, KL olgu sayısını ve tür çeşitliliğini etkilediği düşünülmektedir. Çalışmada, arşivde yayma preparatları bulunan KL pozitif, göç öncesi ve sonrası Türk hasta ve impote (Suriye'li) hastalara ait örneklerin tiplendirilmesi ve Hatay'daki göç öncesiyle sonrasındaki KL tür farklılığının ortaya konulması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışmaya arşivde bulunan, dermal kazıntıdan yayma preparatı hazırlanmış, Giemsa boyalı ve mikroskop inceleme ile pozitifliği saptanan toplam 150 hastaya ait (Göç öncesi 50 Türk hasta, göç sonrası 50 Türk hasta ve Suriye'li 50 hasta) preparatlar dahil edilmiştir. Seçilen preparatların DNA izolasyonu yapılmış ve tür tayini için ITS-1probu GZ-PZR analizi yapılmıştır.

Bulgular: Göç öncesi Türk hastalara ait örneklerin 40'ında *L.infantum/donovani* (%80), 8'inde *L. tropica* (%16), 2'sinde *L.major* (%4) saptanırken, göç sonrası Türk hastalara ait örneklerin ise 28'inde *L. infantum/donovani* (%56), 3'ünde *L. major* (%6), 19'unda *L. tropica* (%38) tespit edilmiştir. Suriye'li hastalara ait örneklerin 2'sinde *L. infantum/donovani* (%4), 1'inde *L. major* (%2) ve 47'sinde ise *L. tropica* (%94) saptanmıştır.

Sonuç: Hatay'da göç öncesi yerli olgularda çoğunlukla KL'ye neden olan türün *L. infantum/donovani* olduğu gözlemlenirken, göç sonrası yerli olgularda *L. tropica*'nın artma eğiliminde olduğu, *L. major*'a ise geçmiş yıllara göre daha çok rastlandığı görülmektedir. Hatay'a gelen Suriye'lilerin KL etkeni olan *Leishmania* türlerinde çeşitliliğe neden olabileceği ve konu üzerinde daha ileri araştırmaların yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kutanöz leishmaniasis, göç, gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu, Hatay

ABSTRACT

Objective: *Leishmania tropica* (*L. tropica*) and *Leishmania infantum* (*L. infantum*) are the species causing cutaneous Leishmaniasis (CL) in Turkey. There was a wave of immigration due civil war in Syria in 2011. Migration from Syria, where CL is endemic, to other countries is thought to affect the number of CL cases and species diversity. The aim of the study was to typify the samples of CL positive, pre-migration and post-migration Turkish patients and impote (Syrian) patients whose smears were found in the archive and to reveal the difference of CL species before and after migration in Hatay.

Methods: Smears of a total of 150 patients (50 Turkish patients before migration, 50 Turkish patients after migration and 50 Syrian patients) which had been prepared with dermal scraping, stained with Giemsa and determined as CL positive by microscope examination were included in the study. DNA isolation of selected preparations was performed and GZ-PZR analysis with ITS-1probe was performed for species determination.

Results: *L. infantum/donovani* was detected in 40 (80%), *L. tropica* in 8 (16%), and *L. major* in 2 (4%) of the samples belonging to pre-immigration Turkish patients. *L. infantum/donovani* was detected in 28 (56%), *L. major* in 3 (6%) and *L. tropica* in 19 (%38) of the samples belonging to post-immigration Turkish patients. *L. infantum/donovani* was detected in 2 (4%), *L. major* in 1 (2%) and *L. tropica* in 47 (94%) of the samples belonging to Syrian patients

Conclusions: It was observed that in local cases in Hatay before immigration, *L. infantum/donovani* was the common species that caused CL and that after immigration *L. tropica* began to raise and that *L. major* was more encountered than before. It was concluded that Syrians coming to Hatay may have caused diversity in the *Leishmania* species which were the causative agents of CL, and that further research was needed on the subject.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, migration, real-time polymerase chain reaction, Hatay

Bu çalışma 28 Eylül - 03 Ekim tarihleri arasında Çeşme / İzmir'de yapılan 21. Parazitoloji kongresinde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi/Received: 05.11.2019 Kabul Tarihi/Accepted: 27.01.2020

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Tuğba Kaya, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

Tel/Phone: +90 507 490 26 07 E-Posta/E-mail: tugbakaya42@yahoo.com ORCID ID: orcid.org/0000-0001-7612-5414



GİRİŞ

Leishmaniasis, enfekte dişi tatarcıkların ısırmasıyla insana bulaşan parazitler bir hastalıktır. Kutanöz, mukokutanöz, visseral olmak üzere üç ana klinik tablo ile karşımıza çıkmaktadır. Kutanöz leishmaniasis (KL), hastalığın en sık karşılan formudur ve genellikle skar oluşarak kendiliğinden iyileşen deri lezyonlarına neden olur. Visseral leishmaniasis (VL) iç organları, etkilemektedir ve tedavi edilmediğinde ölüme sebep olabilmektedir. Mukokutanöz leishmaniasis (MKL) ise mukozayı tutarak tamamen ya da kısmen tahribatına sebep olan önemli bir klinik formdur (1,2). KL ve VL ülkemizde leishmaniasisin en sık görülen klinik formlarıdır ve genel olarak KL'ye *L. tropica* ve *L. infantum*, VL'ye ise *L. infantum* neden olmaktadır (3). VL Ege, Akdeniz ve İç Anadolu Bölgeleri'nde, KL ise Güneydoğu Anadolu Bölgesi başta olmak üzere Akdeniz, İç Anadolu ve Ege Bölgesi'nde görülmektedir (4-6). Türkiye'de 1990-2010 yılları arasında toplam 46.003 KL olgusunun olduğu bildirilmiştir (3). 2011 yılı Nisan ayında, Suriye'de yaşanan iç karışıklık nedeniyle yaklaşık 300-400 kişi Hatay ili Cilvegözü sınır kapısından giriş yapmış ve ilk sığınma kamplarına yerleşmişlerdir. İlimizde ilk yıl Altınözü, Yayladağı, Reyhanlı da toplam beş kamp kurulmuştur (7). Ancak bugün itibarıyla 10 ilimizde (başta Hatay, Şanlıurfa, Gaziantep olmak üzere) oluşturulmuş kamplar dışında 81 ilimizde 4 milyona yakın Suriye'li olduğu tahmin edilmektedir (4,7). Bu durum ülkemizin hemen hemen her yerinde impoerte KL olgularının görülmesine neden olmuştur. Göç sonrası 2013 yılında Türkiye'de Türk ve Suriyeli toplam KL olgu sayısı 5.362 ile son yılların en yüksek sayısına ulaşmıştır. 2015-2017 yılları arasında yıllık ortalama 2000-2.500 olgu görüldüğü Sağlık Bakanlığı tarafından bildirilmiştir (8).

Ülkemizde KL'nin en sık görülen türleri *Leishmania tropica* (*L. tropica*) ve *Leishmania infantum*'dur (*L. infantum*). Ancak 2010 yılı sonrası yapılan çalışmalarda *Leishmania major* (*L. major*) ve *Leishmania donovani*'nin (*L. donovani*) de KL'ye neden olan türler olduğu gösterilmiştir (9). Göç öncesi yapılan bir çalışmada, *L. infantum*'un Hatay ilinde KL'ye sebep olan türlerin başında geldiği saptanmıştır (10). Göç sonrası yapılan çalışmalarda ise *L. infantum* ile birlikte *L. tropica* ve *L. major*'unda Hatay'da KL'ye neden olan türler olduğu tespit edilmiştir (11,12). Suriye'de ise bildirilen KL olgularının büyük çoğunluğunun *L. tropica* kaynaklı olduğu ve geri kalan olguların ise *L. major* tarafından oluşturulduğu bilinmektedir (13).

Çalışmada, Hatay'da göç öncesi ve sonrası yerli (Türk hasta) ve impoerte (Suriye'li hasta) KL hastalara ait smear örnekleri arşivden seçilerek moleküler yöntem (GZ-PZR) ile tiplendirilmiş ve ilimizdeki göç öncesi ve sonrası KL tür farklılığının ortaya konulması amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Çalışmada; dermal kazıntı materyalinden yayma preparatı yapılmış, Giemsa boyama yöntemi ile boyanmış ve mikroskop (100 X immersiyon) ile incelemesinde *Leishmania* parazitinin amastigot formunun varlığı tespit edilmiş toplam 150 hastaya ait (göç öncesi 50 Türk hasta, göç sonrası 50 Türk hasta ve Suriyeli 50 hasta) preparatlar arşivden seçilmiştir. Seçilen örneklerin yayma preparatları lizis tamponu ile yıkanmış ve DNA izolasyon kiti (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Almanya) içerisinde bulunan protokole uygun olarak çalışılmıştır.

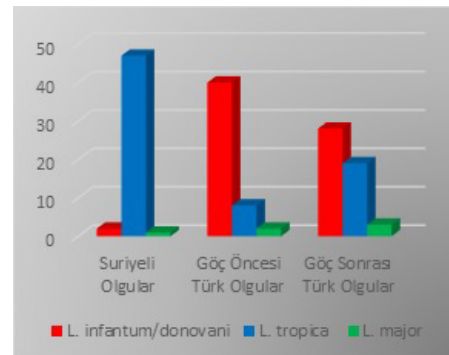
Örneklerde tür tayini yapabilmek için ITS1 problu GZ-PZR ile çalışılmıştır. *Leishmania* parazitlerinin ssu rRNA ve 5,8S rRNA'yı kodlayan genleri ayıran ribozomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) bölgesi, Forward primer; 5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3', Reverse Primer; 5'-GAAGCCAAGTCATCCATCGC-3' primerleri ile birlikte Probe 1: 5'- CCGTTTATACAAAAATATACGGCGTTTCGGTTTTFluo-3', Probe 2: 5'-LCRed-640-GCGGGGTGGGTGCGTGTGTG-Pho-3' özgün probalar kullanılmıştır. PZR analizi için 1,5 µL H₂O (PCR grade water), 1 µL Forward Primer, 1 µL Reverse Primer, 0,5 µL Probe1, 0,5 µL Probe2, 12,5 µL QuantiTect Probe PCR Kit Master karışımı (Qiagen) ve 5 µL genomik DNA olmak üzere toplam hacmi 25 µL olan karışım hazırlanmıştır (14,15). Rotor-Gene cihazında melting analizi yapılarak tiplendirme yapılmıştır.

BULGULAR

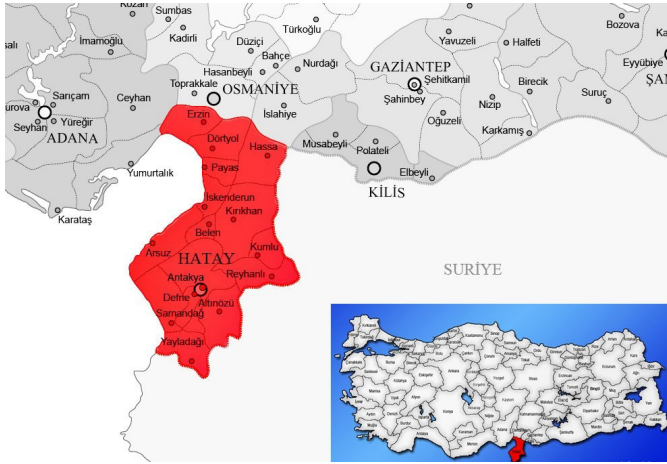
Göç öncesi ve sonrasına ait seçilen Türk örneklerin kayıtlarına bakıldığında hastaların Altınözü, Hassa, Kırıkhan, Yayladağ, Samandağ gibi Hatay'da KL'nin sık olarak görüldüğü bölgelerden geldiği saptanmıştır. Göç öncesi yıllara ait seçilen preparatların GZ-PZR testi sonucunda 50 Türk örneğin 40'unun (%80) *L. infantum/donovani*, 8'inin (%16) *L. tropica*, 2'sinin (%4) *L. major* olduğu tespit edilmiştir. Göç sonrası seçilen 50 Türk örneğin ise 28'inin (%56) *L. infantum/donovani*, 3'ünün (%6) *L. major*, 19'unun (%38) *L. tropica* olduğu saptanmıştır. Suriye'li hastalara ait kayıtlarda daha çok İdlip, Halep, Hama gibi Suriye'nin KL açısından endemik olduğu bilinen bölgelerden geldiği tespit edilmiştir. Elli Suriyeli hasta örneğinin 2'si (%4) *L. infantum/donovani*, 1'i (%2) *L. major* ve 47'si (%94) ise *L. tropica* olarak tiplendirilmiştir (Şekil 1, 2).

TARTIŞMA

Türkiye'de KL halk sağlığı sorunu olarak güncelliğini korumaya devam etmektedir. KL, *Phlebotomus* (halk arasında yakarca, kum sineği, tatarcık olarak bilinen) cinsi vektör ile bulaşan önemli parazit hastalıklardan biridir. *Phlebotomus sergenti* ve *Phlebotomus papatasi* KL'nin bulaşmasında vektör olarak rol oynayan türlerdir (16). Hatay ili ile Suriye sınırı arası 46 km yakınlıktadır. Hatay'da, KL'nin endemik olan bazı köyleri (Kıyığören, Meydan, Yuvalı, Alahan Köyü) Suriye'ye yakın bir konumda yer almaktadır (17). Göç öncesi, Hatay'dan özellikle KL'nin endemik olduğu Suriye'nin Halep, Laskiye kentine turistik amaçlı günlük gidiş ve gelişlerin çok olması, taşımacılık yapan şoförler ile mevsimlik olarak çalışmaya



Şekil 1. Göç öncesi ve göç sonrası Türk olgular ile Suriyeli olguların karşılaştırılması



Şekil 2. Hatay ilinde KL'nin endemik olduğu ilçeler ve Hatay haritası (27)

gelen işçiler gibi çeşitli faktörler KL sayısının artma nedenleri arasında yer almaktadır (18). Çulha ve ark. (19) 2018 yılında, yakın komşumuz olan Suriye dahil Azerbaycan, Özbekistan, Türkmenistan, İran, Irak gibi ülkelere giden ve döndükten sonra KL tanısı alan tır şoförlerinde, etken türler *L. tropica*, *L. infantum*/*donovani*, *L. major* olarak tiplendirmişlerdir.

KL açısından endemik olan Hatay ilinde, 1994-2004 yılları arasında 1079 KL olgusu bildirilmiştir (18). 2006-2011 yılları arasında ise 535 olgunun bildirimi yapılmış ve daha çok Hassa, Altınözü, Samandağ, Reyhanlı, İskenderun, Kırkhan gibi endemik ilçelerinden olduğu belirtilmiştir (19). Hatay'da KL'nin vektörleri; *Phlebotomus sergenti*, *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus syriacus*'dur (16). Göç öncesi yıllara ait çalışmalarda Hatay'da, genel olarak *L. infantum* olmak üzere *L. tropica*'nın da KL etkeni olduğu gösterilmiştir (10,11). Çalışmamızda da göç öncesi yerli olgulara ait 50 örneğin 40'ı *L. infantum/donovani*, 8'i *L. tropica*, 2'si *L. major* olarak tiplendirilmiştir.

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, Suriye'de 2010 yılında 42.165 KL olgusu varken, 2014 yılında 55.204 KL olgusu olduğu bildirilmiştir. Suriye'de KL'nin büyük bir çoğunluğunda etken olan tür *L. tropica* olduğu ve daha çok Halep, İdlip, Hama, Lazkiye ve Tartus'ta görüldüğü bilinmektedir. *L. major* ise Al-Hasakah, Şam ve Deir ez-Zour'a yakın kırsal alanlarda görülmektedir (20).

Suriye'deki göçün büyük bir kısmı Türkiye, Lübnan ve Ürdün'e olmuştur. Lübnan'da 2000-2012 yılları arasında 6 KL olgusu olduğu ancak 2013 yılında büyük bir kısmını Suriye'lilerin olduğu toplam 1033 olgu ile çok büyük bir artış olduğu bildirilmiştir (21). Saroufim ve ark. (22) Lübnan'da yaşayan 948 KL şüpheli Suriyeli hastanın %85'ini *L. tropica*, %15'ini *L. major* olarak tiplendirmişler. Ürdün'de, Haziran 2017'de 660.000'dan fazla Suriyeli olduğu kaydedilmiş ve 2010-2016 yılları arasında 1243 KL tanılı hastanın 559'unun Suriyeli hastalar olduğu bildirilmiştir (23). Hijawi ve ark. Ürdün'de 66 KL hastasından (39 Ürdün ve 27 Suriyeli) aldıkları örneklerin 29'unu moleküler yöntemlerle (ITS1-PCR-RFLP, Nested ITS1-5.8S rDNA PCR ve kDNA PCR) tiplendirmişler ve ITS-1 PZR-RFLP ile 20'sini *L. major*, 9'unu *L. tropica* olarak bulmuşlardır. Çalışma da ülkedeki Suriye'li KL hastalarının Leishmania tür geçişinin üzerindeki etkisinin daha detaylı bir şekilde araştırılmasının gerektiği vurgulanmıştır (24).

Türkiye'ye 2011-2019 tarihleri arasında yaklaşık 4 milyona yakın Suriyeli'nin göç ettiği tahmin edilmektedir. En çok göç alan

illerimiz ise İstanbul, Gaziantep, Hatay, Şanlıurfa, Mersin'dir (7). Sağlık Bakanlığı verilerine göre, ülkemizde hem Suriyeli hem de yerli olgu sayısı yıllık 1500-2000 arasında değişmektedir (8).

Türkiye'de KL'ye neden olan başlıca türler *L. tropica* ve özellikle Doğu Akdeniz Bölgesi'nde görülen *L. infantum*'dur. Ancak son yıllarda *L. major* ve *L. donovani*'nin etken türler olduğu gösterilmiştir (6). 2009 yılında Toz ve ark. (10) Türkiye'de KL'den sorumlu olan türün *L. tropica*, Hatay ilinde ise etkenin *L. infantum* olduğunu bildirmişlerdir. 2016 yılında ise Özbilgin ve ark. (12) Antalya, Adana, Hatay, Mardin, Diyarbakır, Şanlıurfa, Bitlis, Manisa, Burdur illerinde toplam 18 KL tanılı hastada *L. major* saptamışlardır. (Aynı araştırmacı 2019 yılında, 18 ilde 356 KL tanılı hastadan aldıkları örneklerin; 299'unu *L. tropica*, 28'ini *L. major*, 19'unu *L. infantum* ve 10'unu *L. donovani* olarak tiplendirmişlerdir. Hatay'dan alınan 2 örnek *L. infantum* ve *L. tropica* olarak tanımlanmıştır. *L. infantum* ile *L. major* KL olgularının sayısında bir artış olduğunu bildirmişlerdir (9).

Şanlıurfa'da uzun yıllar *L. tropica*'nın KL'ye neden olan tek tür olduğu bilinmektedir (25). Ancak göç sonrası 2014 yılında Zeyrek ve ark. (25,26) biri impoerte olmak üzere üç *L. major* olgusu saptamışlar ve 2018 yılında ise Gürses ve ark Şanlıurfa'da yaptığı bir çalışmada ise 135 KL tanılı hastanın 132'sini *L. tropica*, 3'ünü ise *L. major* olarak tiplendirmişlerdir. Şanlıurfa'da göç sonrası yıllarda yapılan çalışmalarda *L. major*'un görülmesine paralel olarak bizim çalışmamızda da göç sonrası yıllarda *L. tropica*'nın etken olduğu KL sayılarında artış olduğu gözlemlenmiştir.

SONUÇ

Göç öncesi ilimizde daha çok KL etkeni olarak *L. infantum* sorumlu iken göç sonrası yerli olgularda *L. tropica*'nın yükselme eğiliminde olduğu, *L. major*'un ise ülke genelinde olduğu gibi ilimizde de geçmiş yıllara oranla daha çok rastlandığı görülmektedir. Bu nedenle, göçün *Leishmania* tür geçişinin üzerinde etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

İl Sağlık Müdürlükleri ile birlikte ve üniversiteler arasında bu konu üzerinde koordineli bir çalışma yapılmasının ve düzenli vektör kontrol programlarının oluşturulmasının önemli olduğu ve bu konu ile ilgili daha geniş kapsamlı çalışmalarının yapılması düşüncesindeyiz.

TEŞEKKÜR

Teşekkür: Prof. Dr. Ahmet Özbilgin'e, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Parazit Bankası'ndan referans suşların temin edilmesinde sağladığı katkılardan dolayı teşekkür ederiz.

* Etik

Etik Kurul Onayı: Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan çalışma için onay alınmıştır. (Araştırmannın Protokol Kodu:17/12/2018-02-9).

Hasta Onayı:

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu ve editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

* Yazarlık Katkıları

Dizayn: G.Ç., Veri Toplama veya İşleme: G.Ç., T.K., Analiz veya Yorumlama: G.Ç., T.K., A.Ç.D., Literatür Arama: G.Ç., T.K., A.Ç.D., Yazan: G.Ç., T.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

Bildiri: Bu çalışma 28 Eylül-03 Ekim tarihleri arasında Çeşme/İzmir'de yapılan 21. Parazitoloji Kongre'sinde poster olarak sunulmuştur.

KAYNAKLAR

- Özbel Y, Özensoy Töz S. Leishmaniasis. Özcel MA, Özbel Y, Ak M, editors. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları Kitabı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, No: 22; 2007. p. 197-244.
- <https://www.who.int/leishmaniasis/disease/en/>
- Özbilgin A, Çulha G, Uzun S, Harman M, Topal SG, Okudan F, et al. Leishmaniasis in Turkey: first clinical isolation of Leishmania major from 18 autochthonous cases of cutaneous leishmaniasis in four geographical regions. Trop Med Int Health 2016; 21: 783-91.
- Uzun S, Gürel MS, Harman M. Kutanöz Laysmanyazis Tanı ve Tedavi Rehberi. Türk Dermatoloji Derneği, Haziran 2017. Galenos Yayınevi, İstanbul, Türkiye.
- Ok UZ, Balcioglu IC, Taylan Ozkan A, Ozensoy S, Ozbel Y. Leishmaniasis in Turkey. Acta Trop 2002; 84: 43-8.
- Gürel MS, Yeşilova Y, Ölgen MK, Özbel Y. Türkiye'de kutanöz leishmaniasisin durumu. Türkiye Parazit Derg 2012; 36: 121-9.
- <https://www.goc.gov.tr/turkiye-de-gecici-koruma>
- <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/zoontikvektorel-sarkicibani/istatistik>
- Özbilgin A, Töz S, Harman M, Günaslı Topal S, Uzun S, Okudan F, et al. The current clinical and geographical situation of cutaneous leishmaniasis based on species identification in Turkey. Acta Trop 2019; 190: 59-67.
- Toz SO, Nasereddin A, Ozbel Y, Ertabaklar H, Culha G, Sevil N, et al. Leishmaniasis in Turkey: molecular characterization of Leishmania from human and canine clinical samples. Trop Med Int Health 2009; 14: 1401-6.
- Culha G, Akyar I, Yildiz Zeyrek F, Kurt Ö, Gündüz C, Özensoy Töz S, et al. Leishmaniasis in Turkey: Determination of Leishmania Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Iran J Parasitol 2014; 9: 239-48.
- Özbilgin A, Çulha G, Uzun S, Harman M, Topal SG, Okudan F, Zeyrek F, Gündüz C, Östan İ, Karakuş M, Töz S, Kurt Ö, Akyar I, Erat A, Güngör D, Kayabaşı Ç, Çavuş İ, Bastien P, Pratlong F, Kocagöz T, Özbel Y. Leishmaniasis in Turkey: first clinical isolation of Leishmania major from 18 autochthonous cases of cutaneous leishmaniasis in four geographical regions. Trop Med Int Health 2016; 21: 783-91.
- Haddad N, Saliba H, Altawil A, Villinsky J, Al-Nahhas S. Cutaneous leishmaniasis in the central provinces of Hama and Edlib in Syria: Vector identification and parasite typing. Parasit Vectors 2015; 8: 524.
- Özbilgin A, Çavuş İ, Yıldırım A, Kaya T, Ertabaklar H. Leishmania tropica Üzerinde In vitro ve In vivo İlaç Etkinliğinin Değerlendirilmesi: Pilot Çalışma. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2018; 42: 11.
- Toz SO, Culha G, Zeyrek FY, Ertabaklar H, Alkan MZ, Vardarlı AT, et al. A real-time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of Leishmania parasite from human and dog clinical samples in Turkey. PLoS Negl Trop Dis 2013; 7: e2205.
- Yaman M, Ozbel Y. The sandflies (Diptera: Psychodidae) in the Turkish province of Hatay: some possible vectors of the parasites causing human cutaneous leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol 2004; 98: 741-50.
- Çulha G, Doğramacı ÇA, Gülkan B, Savaş N. (Kutanöz leishmaniasis ve Hatay ilindeki durumu. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 2014; 71: 171-8.
- Çulha G, Akçalı C. Hatay ve çevresinde saptanan kutanöz leishmaniasis olguları. Türkiye Parazit Derg 2006; 30: 268-71.
- Çulha G, Doğramacı AÇ, Kaya T, Çavuş İ, Gülkan B, Özbilgin A. Imported cutaneous leishmaniasis cases detected in truck drivers in Hatay. Mikrobiyol Bul 2018; 52: 316-23.
- https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Leishmaniasis_Syrian_Arab_Republic/en/
- Al-Salem WS, Pigott DM, Subramaniam K, Haines LR, Kelly-Hope L, Molyneux DH, et al. Cutaneous leishmaniasis and conflict in Syria. Emerg Infect Dis 2016; 22: 931-3.
- Saroufim M, Charafeddine K, Issa G, Khalifeh H, Habib RH, Berry A, et al. Ongoing epidemic of cutaneous leishmaniasis among Syrian refugees, Lebanon. Emerg Infect Dis 2014; 20: 1712-5.
- Kanani K, Amr ZS, Shadfan B, Khorma R, Rø G, Abid M, et al. Cutaneous leishmaniasis among Syrian refugees in Jordan. Acta tropica 2019; 194: 169-71.
- Hijawi KJ, Hijawi NS, Ibbini JH. (2019). Detection, genotyping, and phylogenetic analysis of Leishmania isolates collected from infected Jordanian residents and Syrian refugees who suffered from cutaneous leishmaniasis. Parasitol Res 2019; 118: 793-805.
- Gurses G, Ozaslan M, Zeyrek FY, Kılıç IH, Doni NY, Karagöz ID, et al. Molecular identification of Leishmania spp. isolates causes cutaneous leishmaniasis (CL) in Sanliurfa Province, Turkey, where CL is highly endemic. Folia Microbiol (Praha) 2018; 63: 353-9.
- Zeyrek FY, Gürses G, Uluca N, Yentür Doni N, Toprak Ş, Yeşilova Y, et al. Is the agent of cutaneous leishmaniasis in Sanliurfa changing? First cases of Leishmania major. Türkiye Parazit Derg 2014; 38: 270-4.
- <https://www.lafsozluk.com/2009/03/hatay-iline-ilceleri-ve-nufus-sayilari.html>

Changes in the Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Northeastern Iran

Kuzeydoğu İran'da Kutanöz Leishmaniasisin Epidemiyolojisindeki Değişimler

© Bibi Razieh Hosseini Farash^{1,2,3}, © Seyed Ali Akbar Shamsian¹, © Masoud Mohajery¹, © Abdolmajid Fata^{1,3}, © Fatemeh Sadabadi¹, © Fariba Berenji¹, © Pietro Mastroeni⁴, © Elham Poustchi¹, © Elham Moghaddas¹, © Ghodrattollah Salehi Sangani¹, © Gholamreza Farnoosh⁵

¹Mashhad University of Medical Sciences Faculty of Medicine, Department of Parasitology and Mycology, Mashhad, Iran

²Tehran University of Medical Sciences Faculty of Public Health, Department of Parasitology and Mycology, Tehran, Iran

³Cutaneous Leishmania Research Center, Faculty of Medicine, Mashhad, Iran

⁴Cambridge University, Department of Veterinary Medicine, Cambridge, United Kingdom

⁵Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah Medical Sciences University, Tehran, Iran

Cite this article as: Farash BRH, Shamsian SAA, Mohajery M, Fata A, Sadabadi F, Berenji F, Mastroeni P, Poustchi E, Moghaddas E, Sangani GS. Changes in the Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Northeastern Iran. Türkiye Parazitoloj Derg 2020;44(1):52-7.

ABSTRACT

The province of Khorasan-Razavi in the North East of Iran is an endemic area for anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL caused mainly by *Leishmania tropica*) and zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL caused mainly by *Leishmania major*). Based on clinical signs, some cities were considered as ACL foci while others were considered to be endemic for ZCL.

This paper reviews studies performed on patients diagnosed with cutaneous leishmaniasis (CL) via the use of direct slide examination, ELISA, electrophoresis isoenzyme, RAPD PCR and PCR in Mashhad; the study also includes cases of CL in other cities of the Khorasan-Razavi province where only PCR used as a diagnostic tool. The data show that both *Leishmania tropica* and *Leishmania major* caused CL in most of the cities investigated. Our review shows that *Leishmania major* was found in areas where ACL is prevalent and *Leishmania tropica* was observed in areas with high incidence of ZCL. This distribution represents a major change in the epidemiological pattern of Leishmania in the Khorasan-Razavi province.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, molecular and immunological techniques, Khorasan-Razavi province.

ÖZ

Khorasan-Razavi eyaleti, Kuzey Doğu İran'da yer alan, anthroponotik kutanöz leishmaniasis (AKL'nin sebep olduğu *Leishmania tropica*) ve zoonotik kutanöz leishmaniasis (ZKL'ye sebep olan *Leishmania major*) için endemik bir bölge niteliğindedir. Bu çalışmada klinik önem bakımından bazı şehirler AKL olarak nitelendirilmesine karşılık bazı şehirler ZKL olarak tanımlanmıştır.

Bu araştırma, kutanöz leishmaniasis (KL) olarak teşhis edilmiş hastalardan elde edilen örneklerin direkt mikroskopik bakıyla teşhisleri ile ELISA, elektroforez, izoenzim, RAPD PCR ve PCR yardımı ile Meşhed'te gerçekleştirilmiştir. Bu araştırma aynı zamanda Khorasan-Razavi eyaletinde sadece PCR kullanılarak yapılan KL örneklerini de içerir. Yapılmış olan bu çalışmanın sonuçları araştırma yapılan şehirlerin çoğunda *Leishmania tropica* ve *Leishmania major*'un KL enfeksiyonlarına sebep olduğunu göstermiştir. Bizim çalışmalarımızda AKL olgularının yaygın olarak görüldüğü bölgelerde *Leishmania major*'a rastlanırken, ZKL olgularının yüksek oranlarda görüldüğü yerlerde de *Leishmania tropica* saptanmıştır. Bu dağılım Khorasan-Razavi eyaletindeki Leishmania'nın sebep olduğu hastalıkların dağılımını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kutanöz leishmaniasis, *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, moleküler ve immünolojik teknikler, Khorasan-Razavi bölgesi



Geliş Tarihi/Received: 25.09.2018 Kabul Tarihi/Accepted: 30.11.2019

Address for Correspondence/Yazar Adresi: Seyed Ali Akbar Shamsian, Mashhad University of Medical Sciences Faculty of Medicine, Department of Parasitology and Mycology, Mashhad, Iran

Phone/Tel: 985138012406 E-mail/E-Posta: raziehoseinifr@yahoo.com ORCID ID: orcid.org/0000-0001-5048-4857

INTRODUCTION

Leishmaniasis is a vector-borne disease caused by protozoa belonging to the *Leishmania* genus. Cutaneous leishmaniasis (CL) is the most common form of leishmaniasis in the Middle East. CL is transmitted by the bite of sand flies (a subfamily of *Phlebotomine*) (1). Humans and dogs are the main reservoirs of *Leishmania tropica* causing anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) with chronic, dry form, delayed ulceration and plentiful amastigotes. Wild rodents have an important role as reservoirs of *Leishmania major* causing zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) with acute, moist form, early ulceration and few amastigotes (2).

According to the World Health Organization (WHO) approximately 0.6-1 million new CL cases are estimated to occur worldwide annually; two-thirds of cases are in Afghanistan, Algeria, Brazil, Colombia, Iran and the Syrian Arab Republic (3).

Over the last decades a significant increase in the number of cases of leishmaniasis has been reported worldwide (4). This rise may be due to behavioral and environmental changes such as new settlements, deforestation, large migrations from rural to urban areas, fast and unplanned urbanization, building of dams and new irrigation projects that increase exposure of humans to sand fly vectors (5).

Prevention and control programs are directly dependent on targeting the right species of the parasite (6). However, the species of *Leishmania* that cause different forms of CL are morphologically similar, making differentiation between species by microscopy alone impossible. For this reason, alternative methods such as isoenzyme analysis and immunological approaches such as fluorescent dye-conjugated monoclonal antibodies have been recently used for identifying *Leishmania spp.* (4). Furthermore, molecular methods based on PCR have also been used routinely by many laboratories to detect *Leishmania* in carrier hosts and to map parasite reservoirs (7,8).

Several studies have been performed in the Khorasan-Razavi province to diagnose leishmaniasis from observation of clinical symptoms (9). However, information on the incidence of leishmaniasis based on new immunological or molecular methods is poor in this area. To improve diagnosis and eventually approaches to treatment, the University of Medical Sciences in Mashhad performed immunological and molecular studies to identify those *Leishmania* species that cause CL and to design plans for targeted epidemiological intervention in endemic cities of the Khorasan-Razavi province.

METHODS

This paper reviews clinical and epidemiological studies on leishmaniasis performed in the province of Khorasan-Razavi. The paper briefly reviews current global and Iranian epidemiological data on CL. The review compares previous data on CL in different cities of Khorasan-Razavi province with current epidemiological data. The paper is based on PubMed and Google Scholar literature searches from 1979 to 2018 using the following keywords: "CL", "prevalence OR epidemiology", "causative agents of CL OR molecular detection of *Leishmania spp.*". These key words were then, combined with "Iran" and "Razavi Khorasan OR Khorasan-Razavi province". Both papers in English and Persian

were considered. We also considered data from graduate theses on epidemiology of CL and on molecular detection of *Leishmania* species in Khorasan-Razavi.

RESULTS

Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Iran

CL is one of the 10 most important parasitic diseases in tropical regions of the world, being present in all continents except for Australia (10). Investigations on various aspects of this disease have been prompted and supported by WHO and global burden of disease (GBD). According to GBD, the prevalence of CL has risen from 2.1 million in 2002 to nearly 4 million cases in 2015 (11-13). The number of individuals with latent CL is estimated at about 12-20 million (10).

Disability-adjusted life years (DALY) due to CL is estimated at about 2 million years. Considering that only patients who are positive for *Leishmania spp.* are included in the DALY formula, and the psychosocial impact of scars due to CL (approximately 40 million cases) has not been taken into account, the real DALY is likely to be higher than the current estimated figure (13).

CL is the second most prevalent arthropod-transmitted disease in Iran (14). Despite the attempts of Iranian health officers to prevent and control leishmaniasis, the disease is still spreading and new foci of CL are reported every year. For example, 17 previously infection-free provinces of Iran are now endemic for leishmaniasis (15).

According to the data published by the Iranian Ministry of Health in 2011, about 20000 new CL cases are reported in Iran annually, while the actual number of patients with CL is estimated to be four to five-fold higher. Patients with either moist or dry lesions are observed in both rural and urban areas in Iran (16). The rural form or ZCL with moist lesions is observed in 15 provinces of Iran including Isfahan, Sarakhs, Lotfabad, Khuzestan, Kashmar, Kashan, Dehloran and Damghan, whereas the urban form or ACL with dry lesions has been reported in Tehran, Shiraz, Mashhad, Neishabur, Kerman, Bam, Rafsanjan and Khomeyn Shahr (16,17). Epidemiological studies in Iran indicate more than 90% of CL cases occur in 88 cities and transmission occurs in 17 provinces in Iran with a prevalence rate ranging from 1.8% to 37.9% (18). Isfahan, Fars, Bushehr, Ilam, Khuzestan, Yazd, Semnan, Kerman, and Khorasan were high incidence areas between 1983-2013. A lower burden of infection was observed in Gilan, Kurdistan, Azerbaijan-West, Ardabil, Tehran, Qazvin, Hamedan, Azerbaijan-East, Kermanshah, Kohgiluyeh-Boyer-Ahmad, Lorestan, Markazi, and Chaharmahal- Bakhtiari. The last data about number of CL patients in different province of Iran during 2011-2013 has been shown in Table 1 (16,19).

The incidence rate of CL follows a cyclical pattern of rise and fall between 20 to 40 cases per 100,000 people and a periodic trend lasting 5-6 years, which shows the limited effect of control measures that are transiently implemented in response to episodes of increased incidence of the disease (20).

Therefore, improved and permanent measures for epidemiological control of CL in Iran must be rationally designed and implemented with the participation of health authorities and relevant governmental agencies in order to reduce the incidence and prevalence of CL (16).

Table 1. The number of CL patients in different province of Iran during 2 years (2011-2013) (16)

Provinces	The number of CL patients
Razavi Khorasan	13 379
Fars	13 356
Isfahan	8 785
Kerman	4 435
Khuzestan	3 615
Ilam	2 027
Golestan	1 960
Northern Khorasan	1 286
Sistan and Balouchestan	1 144
Yazd	1 069
Qom	1 012
Tehran	848
Semnan	786
Bushehr	385
Kermanshah	355
Hormozgan	286
Lorestan	270
Chaharmahal and Bakhtiari	242
South Khorasan	226
Hamadan	209
Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad	195
Mazandaran	150
Markazi	115
Alborz	115
West Azerbaijan	90

The Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Khorasan-Razavi

The present study reviews the CL status in different districts of Khorasan-Razavi.

CL has been present for a long time as an important endemic disease in the Khorasan-Razavi province in the North East of Iran (21). The Khorasan-Razavi province has the highest prevalence of CL infection in Iran (16). Since this province has shared borders with Afghanistan and Turkmenistan, changes in the incidence rate and epidemiological pattern of CL might be linked to neighboring countries. In fact, gerbil reservoirs and vectors of ZCL have been confirmed along the border between Iran and Turkmenistan as well as in the Afghan city of Heart which is in an area endemic for ACL and close to Iran (22,23). Most of infected domestic and wild Canidae have been affected by *L. infantum* in Iran (24,25). However, infections with *L. tropica* were reported from canidae in Syria, Morocco, and Israel (26-30). Dogs are therefore a secondary reservoir host for *L. tropica* and for its transmission to human.

Mashhad, the second most populous city in Iran and the capital of Khorasan-Razavi province is located in the North East of Iran and close to the border with Turkmenistan and Afghanistan. Mashhad is one of the main endemic areas for ACL. During the last two

decades, CL cases have significantly risen in Mashhad causing concerns in the health authorities (6). According to the Khorasan-Razavi Health Center in 2001, the highest prevalence of CL was seen in the region of Ab-o-Bargh, where population density, stray dogs, cultural and economic poverty in suburbs are considered as the main socio-epidemiological risk factors. Haj Norouz is another high disease area in Mashhad due to predisposing factors such as, the existence of building debris, old building with wooden roofs and areas where waste material is accumulated (17).

Neishabur, the former capital of Khorasan-Razavi province, has also been considered as an important endemic city for ACL with the rate of infection in some regions such as Sarcheshmeh and Kariz-no being higher than in others (5). ACL is present in the city of Sabzevar in Khorasan Razavi, while the disease has not been detected in Mazinan in Sabzevar (13).

Sarakhs in the North East of Iran is a high prevalence region for *L. major*. It is possible that its location on the Silk Road, the proximity to Turkmenistan and the high volume of commercial traffic could underpin the increased incidence of leishmaniasis in this city (31). Torbat-e Jam is another county where many CL cases have been observed annually. This district is located in the South West of Mashhad and north of Taybad, West of the Afghanistan border (32,33).

Based on the clinical appearance of CL lesions, it has been inferred that the patients in the towns of Chenaran and Quchan probably suffer from *L. tropica*, while *L. major* has been known as dominant strain of CL in Dargaz and Kalat, that are located in the North and North East, respectively. It is noticeable that Quchan, in the North East of Iran, has a border with Turkmenistan and is connected by road with Chenaran city half way to Mashhad.

Based on the clinical appearance of CL lesions, several investigations have indicated that Torbat-e Heydarieh and Fariman, in the South of Mashhad, are endemic for *L. tropica*. However, conclusive data on the identification of *Leishmania* species in this area based on immunological or molecular tools is still lacking. Since these towns are situated on the way of travel to Mashhad, accurate identification of CL agents can be effective to determine the control and prevent strategies (34).

It is still unclear which parasite species cause CL in the cities of Gonabad, Kashmar and Bardaskan in the southwest and Khaf and Taybad districts in the South East of Khorasan-Razavi province.

Identification of the Parasite Species Responsible for Cutaneous Leishmaniasis in Endemic Areas of North East Iran

The identification of *Leishmania* species is essential to monitor the spread of the disease as well as to design and implement effective control methods. Since control and prevention of ZCL and ACL are different, several studies have focused on the correct identification of *Leishmania* species in Khorasan-Razavi during the past two decades (6).

Mohajery et al. (35), used isoenzyme electrophoresis for the identification of *Leishmania* spp. and showed that Mashhad is the main focus for *L. tropica*, but *L. major* was present in other regions, particularly in the suburbs.

In another study, Valizadeh et al. determined the causative species of *Leishmania* in 72 cases of CL in Mashhad using an ELISA method based on species-specific monoclonal antibodies. 52 cases were identified as *L. tropica*, 16 as *L. major* and 4 cases were caused by unidentified species (35).

Between 2002 and 2005, Hajjarian et al. (4) collected 87 parasite samples from patients with CL who were referred to Mashhad health centers and determined the species of *Leishmania* by RAPD-PCR. 94.2% of the isolates were identified as *L. tropica*, whereas 5.8% were identified as *L. major*.

Mahmoudi in 2005 used PCR to determine the causative agent of CL in Mashhad and demonstrated *L. major* in 2/21 cases and the other samples were identified positive for *L. tropica* (36). Similar results were reported by Fata et al. (37) in 2007 using the Whatman paper and PCR methods.

The epidemiological pattern of leishmaniasis in Mashhad and the increased incidence of CL in Khorasan-Razavi prompted further studies to identify the main causative agents of CL in other counties of this province.

A study including 84 CL patients in the county of Sabzevar in 2006-2007 detected 32 cases of *L. tropica* and 52 cases of *L. major*. Another study on 52 patients in Neishabur using RAPD-PCR only detected *L. tropica* (38,39). The cities of Sabzevar and Roudab were the foci in the county of Sabzevar where *L. tropica* was detected, whereas the cities of Hokm Abad, Ghezelgharshi, Joghatay and Mohamad Abad were endemic foci of both *L. tropica* and *L. major* (39).

Molecular investigations by Hossein Farash et al. and Saadabadi et al. (40) on 144 patients with CL identified only *L. tropica* in the districts of Torghabeh-Shandiz (2010) and Kharv (2007), which are close to Mashhad and Neishabur, respectively (6,40). Pagheh et al. reported similar findings in 2013 in Torbat-e Jam in a cohort of 504 patients with *Leishmania* lesions (32).

In 2013, Shamsian et al. (31) identified *L. tropica* in 12 patients and *L. major* in 52 cases in Sarakhs that had previously been known as an area where *L. major* was prevalent as the cause of ZCL (31).

Despite Khaf and Taybad had been considered as ACL foci (*L. tropica*) until 2015, Abdolmajid et al. (41) found 20 cases for *L. major* among 66 positive persons with CL by PCR method (41). Using a similar method between 2015 and 2017, Shamsian et al. diagnosed 7 patients with ZCL out of 60 subjects with CL in Torbat-e Heydarieh and 16 with *L. major* out of 84 patients from Kashmar (11 cases), Bardaskan (2 cases) and Gonabad (3 cases) (34,42).

On the contrary, using PCR in 2015 Fata et al. (36) demonstrated 22 patients infected by *L. tropica* from 85 cases of CL patients in the ZCL foci of Dargaz and Kalat 2015 (29).

13 cases of *L. tropica* out of 42 patients were diagnosed by Shamsian et al. (43) in Fariman, another known focus for *L. major*, in 2017.

Finally, Shamsian et al. (44) found 29 out of 86 samples positive for *L. major* in CL infected patients in Quechan and Chenaran despite *L. tropica* had been considered as the only causative species of CL in this area.

It is noticeable that all the studies reported here, except for the ones in Neishabur, Kharv, and Torbat-e Jam, were performed using the same PCR protocol and same primers that give a 615 bp band for *L. major* and a 744 bp band for *L. tropica* (Figure 1,2). These studies are therefore directly comparable (6).

DISCUSSION

The global epidemiology of CL has changed, mainly due to

population movements, individual risk factors and environmental changes. CL is one of emerging parasitic diseases in recent years, posing a public health problem in many parts of the world and is widespread in Iran (39,40). The epidemiology of CL has changed in the past two decades in Iran and both *L. tropica* and *L. major* have being present in Khorasan-Razavi province (17,45).

The first step in any control and prevention program for leishmaniasis is the identification of the infectious agents, reservoirs and vectors (35). In recent years, many studies have been conducted in Khorasan-Razavi province with the aim to refine the immunological and molecular diagnosis of the causative *Leishmania* species (4,6,34,35,39-42,46).

The aim of this review was to design a new epidemiological picture of CL, using data from several studies performed in Khorasan-Razavi province to identify the boundary shifts for causative agents of CL during a twenty-year period as the basis to new insights for control and prevention measures.

The investigations carried out in Mashhad demonstrated that ACL and ZCL co-exist. Furthermore, *L. tropica* has been known the dominant agent causing CL in this city (4,35,37,46). Mashhad is the main focus for ACL, but also is a center for *L. major*, particularly in suburbs.

Sabzevar, has two foci of CL, one with dry lesions and the other consisting of patients with wet lesions. Until now Sabzevar has been known just as an ACL focus while now both forms (ACL and ZCL) of the disease have been found to exist at this location (39). These epidemiological changes may be due to migration of

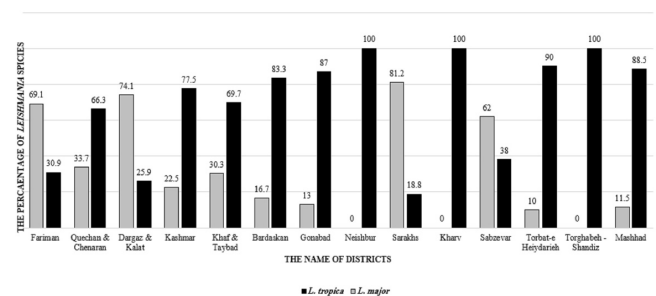


Figure 1. The percentage of *Leishmania* species frequency in different districts of Khorasan-Razavi

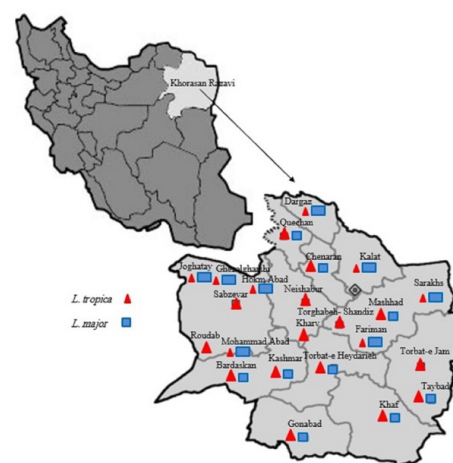


Figure 2. Cutaneous leishmaniasis map of Razavi Khorasan province in 2017

people from neighboring countries such as Afghanistan and Iraq, rural to urban fluxes which provide suitable conditions for transmission, piling of building debris and litter near residential areas, which lead to expansion of vector reservoirs for both species. Agriculture also causes an increase of *L. major* reservoirs and vector population. Moreover changes in the climate and in people lifestyles or the lack of immunity in people who immigrate to endemic areas are other risk factors that can increase the incidence of CL in a particular area (19,34,35). Similar reasons for the epidemiological changes listed above are likely to underpin the variations in the distribution of *Leishmania* species observed in Torbat-e Heydarieh, Bardaskan, Kashmar, Khaf, Taybad, Quechan and Chenaran (34,41,42,44).

The presence of both *L. tropica* and *L. major* species as causes of CL in Sarakhs might be related to its location near an international railroad and in proximity to the border with Turkmenistan; increased movement of people through this region since 2013 is likely to be an additional factor in the observed epidemiological pattern of leishmaniasis (31). The diffusion of *L. tropica* in Fariman, Kalat, and Dargaz could result from changes in health programs to control the vectors and development of industry and tourism. Therefore, some of labor migrants or travelers who are infected by *L. tropica* could be reservoir hosts for this emerging agent (36).

Torbat-e Jam, Neishabur, Kharv, Torghabeh-Shandiz are located in the vicinity of Mashhad and similarly to Mashhad have been considered as ACL foci (6,32,39,40). Despite all cases in these regions were identified as *L. tropica* with molecular method, the number of lesions, their morphological characteristics and the season of occurrences in some patients corresponded to the characteristics typical of *L. major* infections; therefore, it may be desirable to extend and refine the examinations to ensure that cases of ZCL do not go undetected.

CONCLUSION

CL is a major health problem in Khorasan-Razavi province where most of the regions are affected by both *L. tropica* and *L. major* species.

Several measures can be suggested to reduce the incidence of the disease in the urban endemic areas. Classes on health education for inhabitants, reducing the numbers of stray dogs, identification and urgent treatment of clinical cases could be effective. Reduction in rodent and carrier population, removal of waste and environmental modifications should be considered as key health policies in areas with *L. major* (6,19).

Acknowledgment

This paper is not financially supported by any organizations. The authors thank from Deputy of Researches of Mashhad University of Medical Sciences and ACECR-Razavi Khorasan branch for their cooperation.

Authorship Contributions

Concept: B.R.H.F., S.A.S., M.M., A.F., Design: B.R.H.F., S.A.S., M.M., Data Collection or Processing: B.R.H.F., F.S., E.P., Analysis or Interpretation: B.R.H.F., F.S., E.P., Literature Search: B.R.H.F., S.A.S., Writing: B.R.H.F., F.S., P.M.

Peer-review: Internally peer-reviewed.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Al-Salem WS, Pigott DM, Subramaniam K, Haines LR, Kelly-Hope L, Molyneux DH, et al. Cutaneous Leishmaniasis and Conflict in Syria. *Emerg Infect Dis*. 2016;22:931-33.
- Saki J, Tavakoli S, Mardani M, Salmanzadeh S, Karamkhani A. A 5-year period (2010–2014) retrospective study of human cutaneous leishmaniasis in Ahvaz County, southwest of Iran. *Asian Pac J Trop Dis* 2016;6:429-31.
- WHO | Leishmaniasis [Internet]. WHO. [cited 2017 Aug 19]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
- Hajjarian H, Mohebbali M, Razavi MR, Rezaei S, Kazemi B, Edrissian G, et al. Identification of Leishmania Species Isolated from Human Cutaneous Leishmaniasis, using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Iran J Public Health* 2004;33:8-15.
- Bari AU, Rahman SB. Many faces of cutaneous leishmaniasis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2008;74:23-7.
- Hosseini Farash BR, Shamsian SA, Rezaee A, Yazdanpanah MJ. Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis in Torghabeh - Shandiz, a Region with Rural Texture (A Molecular Study). *Jundishapur J Microbiol* 2013;6:e8274.
- Azizi K, Rassi Y, Javadian E, Motazedian MH, Asgari Q, Yaghoobi-Ershadi MR. First Detection of Leishmania infantum in Phlebotomus (Larrousius) major (Diptera: Psychodidae) from Iran. *J Med Entomol* 2008;45:726-31.
- Azizi K, Rassi Y, Moemenbellah-Fard MD. PCR-based detection of Leishmania major kDNA within naturally infected Phlebotomus papatasi in southern Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010;104:440-2.
- Rassi Y, Javadian E, Nadim A, Rafizadeh S, Zahraei A, Azizi K, et al. Phlebotomus perfiliewi transcaucasicus, a vector of Leishmania infantum in northwestern Iran. *J Med Entomol* 2009;46:1094-8.
- Bailey F, Mondragon-Shem K, Hotez P, Ruiz-Postigo JA, Al-Salem W, Acosta-Serrano Á, et al. A new perspective on cutaneous leishmaniasis-Implications for global prevalence and burden of disease estimates. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11:e0005739.
- Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD. Measuring the Burden of Neglected Tropical Diseases: The Global Burden of Disease Framework. *PLoS Negl Trop Dis* 2007;1:e114.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLOS ONE* 2012;7:e35671.
- GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Lond Engl* 2016;388:1545-602.
- Behravan M, Moin-Vaziri V, Haghghi A, Rahbarian N, Taghipour N, Abadi A, et al. Molecular Identification of Leishmania Species in a Re-Emerged Focus of Cutaneous Leishmaniasis in Varamin District, Iran. *J Arthropod-Borne Dis* 2017;11:124-31.
- Yaghoobi-Ershadi M. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in Iran and their Role on Leishmania Transmission. *J Arthropod-Borne Dis* 2012;6:1-17.
- Norouzinezhad F, Ghaffari F, Norouzinejad A, Kaveh F, Gouya MM. Cutaneous leishmaniasis in Iran: Results from an epidemiological study in urban and rural provinces. *Asian Pac J Trop Biomed* 2016;6:614-9.
- Nadim A, Javadian E, Noushin MK, Nayil AK. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Afghanistan. Part I: Zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1979;72:31-5.
- Razmjou S, Hejazzy H, Motazedian MH, Baghaei M, Emamy M, Kalantary M. A new focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Shiraz, Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009;103:727-30.

19. Holakouie-Naieni K, Mostafavi E, Bolorani AD, Mohebal M, Pakzad R. Reprint of "Spatial modeling of Cutaneous Leishmaniasis in Iran from 1983 to 2013." *Acta Trop* 2017;165:90-5.
20. Salah AB, Kamarianakis Y, Chlif S, Alaya NB, Prastacos P. Zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Tunisia: spatio temporal dynamics. *Int J Epidemiol* 2007;36:991-1000.
21. Khazaei S, Hafshejani AM, Saatchi M, Salehiniya H, Nematollahi S. Epidemiological Aspects of Cutaneous Leishmaniasis in Iran. *Arch Clin Infect Dis* 2015;10:e28511.
22. Bakhshi H, Oshaghi MA, Abai MR, Rassi Y, Akhavan AA, Sheikh Z, et al. Molecular detection of Leishmania infection in sand flies in border line of Iran-Turkmenistan: restricted and permissive vectors. *Exp Parasitol*. 2013;135:382-387.
23. Fakhar M, Karamian M, Ghatee MA, Taylor WR, Pazoki Ghohe H, Rasooli SA. Distribution pattern of anthroponotic cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania tropica in Western Afghanistan during 2013-2014. *Acta Trop*. 2017;176:22-28.
24. Alawieh A, Musharrafieh U, Jaber A, Berry A, Ghosn N, Bizri AR. Revisiting leishmaniasis in the time of war: the Syrian conflict and the Lebanese outbreak. *Int J Infect Dis* 2014;29:115-119.
25. Moghaddas E, Fata A, Zarean M, Derakhshani M, Fakhar M, Shamsian SA. Investigation of Visceral Leishmaniasis among 192 Dog Carcasses Killed by Road Accidents in Khorasan Razavi, North-eastern Iran during 2014-2016. *Iran J Public Health* [Internet]. 2018;47:1742-1748.
26. Mohebal M, Hajjaran H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, et al. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. *Vet Parasitol*. 2005;129:243-251.
27. Mohebal M, Malmasi A, Hajjaran H, Jamshidi S, Akhoundi B, Rezaei M, et al. Disseminated Leishmaniasis Caused by Leishmania tropica in a Puppy from Karaj, Central Iran. *Iran J Parasitol*. 2011;6:69-73.
28. Dereure J, Rioux JA, Khiami A, Pratlong F, Périères J, Martini A. [Ecoepidemiology of leishmaniasis in Syria. 2--Presence, in dogs, of Leishmania infantum Nicolle and Leishmania tropica (Wright) (Kinetoplastida-Trypanomatidae)]. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1991;66:252-255.
29. Dereure J, Rioux JA, Gallego M, Périères J, Pratlong F, Mahjour J, et al. Leishmania tropica in Morocco: infection in dogs. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1991;85:595.
30. Baneth G, Yasur-Landau D, Gilad M, Nachum-Biala Y. Canine leishmaniosis caused by Leishmania major and Leishmania tropica: comparative findings and serology. *Parasit Vectors*. 2017;10:113.
31. Ali S, Shamsian S, Rezaee SA., Amin A, Raziheh B, Hosseini Farash R. Molecular Identification of Leishmania tropica in an Endemic Border City for Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) in Northeastern Iran. 2015;2.
32. Pagheh AS, Fakhar M, Sharif M, Danesh V, Ahmadi Z. Epidemiological Survey of Cutaneous Leishmaniasis due to Leishmania tropica in a New Focus in Khorasan Razavi Province. *J Mazandaran Univ Med Sci* [Internet]. 2013;23:46-52.
33. Torbat-e Jam. In: Wikipedia [Internet]. 2017. Naseri A, Fata A, Rezaei A, Hedayatimoghadam M, Berengi F, Akbarzadeh O, et al. Molecular identification of Leishmania species in Torbat-e Heydarieh, Khorasan Razavi province, Iran. *Int J Med Res Health Sci* [Internet]. 2016;5:87-92.
34. Naseri A, Fata A, Rezaei A, Hedayatimoghadam M, Berengi F, Akbarzadeh O, et al. Molecular identification of Leishmania species in Torbat-e Heydarieh, Khorasan Razavi province, Iran. *Int J Med Res Health Sci* [Internet]. 2016;5:87-92.
35. Valizadeh M, Fata A, A K, Mohajery M, Dalimi Asl H. A Study On Leishmania Species Causing Cutaneous Leishmaniasis In Mashhad Using Specific Monoclonal Antibodies. 2005;7:107-113.
36. Fata A, Rezaee SAR, Shamsian SA, Vafa M, Sadat F, Moghaddas E. Identification of Cutaneous Leishmaniasis Species in the Dargaz City, Iran. *Esfahan MedJ* [Internet]. 2017;34.
37. Fata A, Khamesipour A, Mohajery M, Hosseinijad Z, Afzalaghaei M, Berengi F, et al. Whatman Paper (FTA Cards) for Storing and Transferring Leishmania DNA for PCR Examination. *Iran J Parasitol* [Internet]. 2009;4:37-42.
38. Mohajery M, Hajjaran H, Shamsian SA, Sadabadi F, Afshari J. Identification of different species of Leishmania parasite causing cutaneous leishmaniasis by RAPD-PCR in Neishabour in 1385-1386. *Iran J public health*. 2000;4-1:177-190.
39. Mohajery M, Shamsian SA, Rezaee A, Kazem HP, Taghi SM, Gholamreza F, et al. Evaluation Of Molecular Epidemiology Of Cutaneous Leishmaniasis In Sabzevar. 2017;53:138-144.
40. Saadabadi F, Mohajery M, Poostchi E, Shamsian SAA. Identification of Leishmania species causing cutaneous leishmaniasis using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) in Kharve, Iran. *Rep Biochem Mol Biol* [Internet]. 2013;1:69.
41. Abdolmajid F, Ghodrattollah SS, Hushang R, Mojtaba MB, Ali MM, Abdolghayoum M. Identification of Leishmania species by kinetoplast DNA-polymerase chain reaction for the first time in Khaf district, Khorasan-e-Razavi province, Iran. *Trop Parasitol*. 2015;5:50-54.
42. Rezaee AR, Shamsian SA, Naseri A, Bagherpoor MR, Moghaddas E. Identification of Leishmania Species for Cutaneous leishmaniasis in Gonabad, Bardaskan and Kashmar, Central Khorasan, 2015. *JUNDISHAPUR J Microbiol* [Internet]. 2017;10.
43. Fata A, Moghaddas E, Rezaee A, Abdali A, Jarahi L, Shamsian A. Epidemiological Study of Cutaneous Leishmaniasis and Identification of Etiological Species. *J Mazandaran Univ Med Sci* [Internet]. 2018;27:123-31.
44. Moghaddas E, Fata A, Gholampour A, Jarahi L, Soleimanpour S, Shamsian SA. Species Identification of Cutaneous Leishmaniasis in Quchan, Northeast of Iran. *J Kermanshah Univ Med Sci* [Internet]. 2019 ;In Press(In Press).
45. Aflatoonian MR, Sharifi I, Aflatoonian B, Shirzadi MR, Gouya MM, Kermanizadeh A. A Review of Impact of Bam Earthquake on Cutaneous Leishmaniasis and Status: Epidemic of Old Foci, Emergence of New Foci and Changes in Features of the Disease. *J Arthropod-Borne Dis* [Internet]. 2016;10:271-280.
46. Mahmoodi M, Masoud M, Afshari J, Shakeri M, Panah M, Berengi F, et al. Molecular identification of Leishmania species causing cutaneous leishmaniasis in Mashhad, Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 2010;3.

Enterobius vermicularis Infestation Mimicking Rectal Malignancy

Rektal Maligniteyi Taklit Eden Enterobius vermicularis Enfestasyonu

© Ozan Akıncı¹, © Nuray Kepil², © Yusuf Ziya Erzin³, © Abdullah Kağan Zengin⁴

¹Hakkari State Hospital, Clinic of General Surgery, Hakkari, Turkey

²İstanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Department of Pathology, İstanbul, Turkey

³İstanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Department of Gastroenterology, İstanbul, Turkey

⁴İstanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Department of General Surgery, İstanbul, Turkey

Cite this article as: Akıncı A, Kepil N, Erzin YZ, Zengin AK. Enterobius vermicularis Infestation Mimicking Rectal Malignancy. Türkiye Parazitoloj Derg 2020;44(1):58-60.

ABSTRACT

Enterobius vermicularis is a common intestinal nematode of humans that can be considered relatively harmless. A polypoid lesion mimicking malignancy was detected in the rectum of a 66-year-old female patient who had been operated for sigmoid colon adenocarcinoma in the past. Histopathological examination of the lesion revealed no malignancy but there was adult *E. vermicularis* nematodes and eggs. In this case report, we aimed to present an enterobiasis infestation that produces non-necrotizing granuloma tissue in the rectum.

Keywords: *Enterobius vermicularis*, rectal polyp, malignancy

ÖZ

Enterobius vermicularis insan barsağında yaygın bulunan nispeten zararsız kabul edilebilen bir nematoddur. Altmış altı yaşında sigmoid kolon adenokarsinomu nedeniyle daha önce opere edilmiş olan bir kadın hastanın rektumunda maligniteyi taklit eden bir polipoid lezyon saptandı. Lezyonun histopatolojik incelemesi sonucunda erişkin *E. vermicularis* nematodları ve yumurtaları görüldü, maligniteye rastlanmadı. Bu olgu sunumunda rektumda non-nekrotizan granülom dokusu oluşturan bir enterobiasis enfestasyonunu sunmayı amaçladık.

Anahtar Kelimeler: *Enterobius vermicularis*, rektal polip, malignite

INTRODUCTION

Enterobius vermicularis is a common intestinal nematode that is common all over the world, especially in temperate regions, where fecal sanitation is poor, and rarely leads to symptomatic diseases. The most typical symptom of *E. vermicularis* infestation is pruritus ani which particularly exacerbates at nights. It is not zoonotic, its life cycle is simple and human is its only natural host. It is spread through the fecal-oral route and is transmitted by inhalation or ingestion of the helminth egg. The female helminths migrate to the

anus and empty their eggs into the perianal region, leading to pruritus ani. An adult female helminth can live in the bowel for about six weeks. If the infection becomes chronic, the inflammatory reaction process may progress up to polyp development in the colon mucosa. In the literature, this infestation has been reported to have the potential to cause acute appendicitis, salpingitis, ileocolitis, mesenteric abscess and urinary tract infection (1). It has been further reported to create granuloma in the cecum, sigmoid colon, anal canal and extraintestinal tissues such as liver and ovary (2-7).



Received/Geliş Tarihi: 07.10.2019 Accepted/Kabul Tarihi: 04.12.2019

Address for Correspondence/Yazar Adresi: Ozan Akıncı MD, Hakkari State Hospital, Clinic of General Surgery, Hakkari, Turkey
Phone/Tel: +90 537 749 06 41 E-mail/E-Posta: ozanakinci1987@hotmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0002-7149-6854

There are only a few case reports in the literature that *E. vermicularis* mimics malignancy (4,6-8). Similarly, other helminths such as *Schistosoma* species, *Fasciola hepatica*, *Echinococcus* species and *Ascaris* species have been shown to cause lesions mimicking malignancy (9,10).

In this case report we aimed to present a case of rectal polyp physical appearance of which met the criteria for malignancy but whose etiology was, in fact, found to be inflammatory and infective.

CASE REPORT

A 66-year-old female patient, who had been operated for sigmoid colon adenocarcinoma six months ago in İstanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Medical Faculty, Department of General Surgery, applied for a follow-up examination after adjuvant chemotherapy. During the digital rectal examination, a palpable lesion was detected on the posterior wall of the rectum approximately 2 cm proximal to the rectal exit. Positron emission tomography-computed tomography showed high fluorodeoxyglucose levels in the rectum ($SUV_{max}=6.1$). Colonoscopy revealed that the anastomosis line at 20 cm was natural, but there was a collapsed and ulcerated polypoid lesion of 1 cm in diameter which was located 1 cm proximal to the linea dentata in the rectum (Figure 1). Multiple biopsies were obtained from the lesion which was considered as possible second primary tumor (T2N0Mx) on the endoscopic ultrasound examination. No tumor finding was observed in the histological examination and endoscopic mucosal resection was performed. Histopathological examination of resection material showed dense lymphoplasmacytic cells in and around the ulcer in the rectum, neutrophil infiltration, concomitant eosinophils, and granulation tissue (Figure 2). Fragments, which were thought to belong to the parasite, were seen in the serial sections (Figure 3). No malignancy was observed. In the microbiology consultation, the morphological features of the parasite were reported to be compatible with *Enterobius vermicularis*. No recurrence was observed in the control colonoscopy performed following



Figure 1. A collapsed and ulcerated polypoid lesion which was located 1 cm proximal to the linea dentata in the rectum

the albendazole treatment. Written informed consent was obtained from the patient who participated in this study. Ethical approval was obtained for this study (approval date and number: 10.09.2019/303098).

DISCUSSION

Gastrointestinal infection due to *Enterobius vermicularis* occurs worldwide and is considered to be the most common helminthic infection. Although seen in all ages and socioeconomic levels, there is a distinct predilection for the pediatric population and women (11). As previously mentioned, the mature worm of *E. vermicularis* lives in the proximal part of the ascending colon, caecum, appendix and the terminal ileum. If it is not diagnosed and treated appropriately, it can cause granulation tissue development as a result of chronic inflammation in the organs. This granulation tissue is sometimes similar to malignant lesions and may lead to unnecessary investigations and invasive

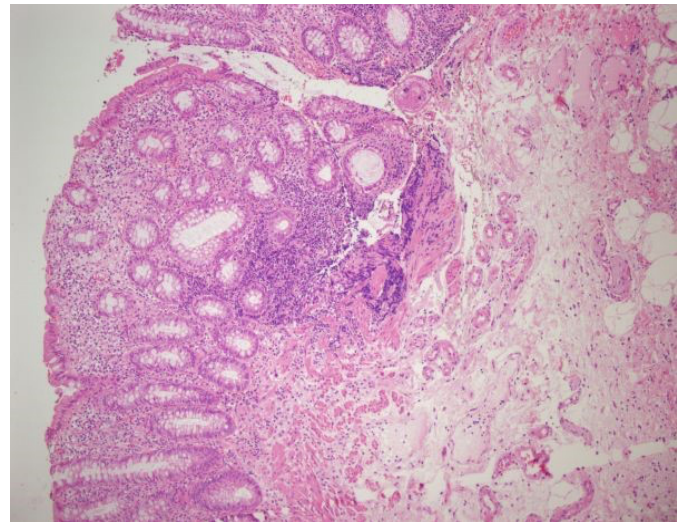


Figure 2. Dense lymphoplasmacytic cells, neutrophil infiltration, concomitant eosinophils in and around the ulcer in the rectum (X40 H&E)

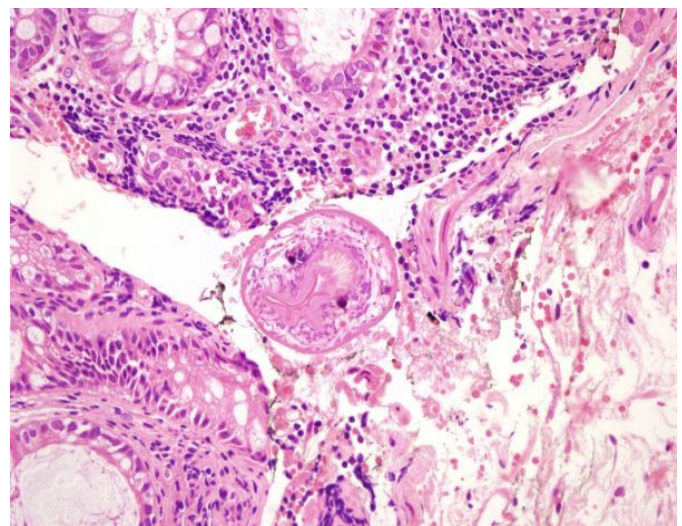


Figure 3. Nematode fragments in the ulcerated area of mucosa (X400 H&E)

treatments.

Elsaid et al. (7) reported that *E. vermicularis* infestation was the etiology of a malignant polypoid lesion localized in the cecum. In addition, Bharathi et al. (4) presented a case of *E. vermicularis* mimicking a pseudo-tumor located in the anal canal. In the present case, an ulcerated polypoid lesion detected in the distal rectum of the patient who had undergone surgery for sigmoid colon adenocarcinoma 6 months ago, caused suspicion of second primary malignancy and the definitive diagnosis could be made as a result of histological examination performed following the endoscopic mucosal resection.

In the literature, several cases have been reported too that chronic infestation of *E. vermicularis* in the liver parenchyma as well as in the digestive tract leads to mass lesions mimicking malignancy (6,12,13).

While eradication of *E. vermicularis* can be achieved with oral anthelmintic agents such as albendazole or pyrantel pamoate, in some case reports, radical treatment methods that can reach up to surgical resection are seen (6,8,12). Since our patient was suitable for endoscopic mucosal resection, there was no need for radical surgical resection.

Not only *E. vermicularis*, but also some other nematode, cestode and trematode species have been reported to cause lesions mimicking malignancy (9,10,14,15). The most commonly reported are *Schistosoma* and *Echinococcus* species, respectively (9).

The differential diagnosis of malignancy and the parasitic infestation cannot be made based on laboratory tests or radiological imaging methods. As in our case, biopsy and histological examination are mandatory and of critical importance for the definitive diagnosis in patients with suspected colorectal malignancy. Therefore, it is important to recognize that the various modalities used for diagnosis in medicine do not offer a definitive diagnosis in all cases. Findings should be interpreted judiciously, taking into account the sensitivity and specificity of the technique used.

It should be kept in mind that *Enterobius vermicularis* may cause lesions that are difficult to differentiate from malignancy as a result of chronic infestation in gastrointestinal tract.

* Ethics

Informed Consent: Written informed consent was obtained from the patient who participated in this study.

Peer-review: Internally peer-reviewed.

* Authorship Contributions

Surgical and Medical Practices: Y.Z.E., A.K.Z., O.A., Concept:

O.A., N.K., Design: O.A., N.K., Data Collection or Processing: O.A., N.K., Analysis or Interpretation: Y.Z.E., A.K.Z., Literature Search: O.A., N.K., Writing: O.A.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

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

REFERENCES

- Sodergren MH, Jethwa P, Wilkinson S, Kerwat R. Presenting features of *Enterobius vermicularis* in the vermiform appendix. *Scand J Gastroenterol* 2009;44:457-61.
- Podgajski M, Kukura V, Duic Z, Gasparov S, Madzarac M. Ascites, high CA-125 and chronic pelvic pain in an unusual clinical manifestation of *Enterobius vermicularis* ovarian and sigmoid colon granuloma. *Eur J Gynaecol Oncol* 2007;28:513-5.
- Avolio L, Avoltini V, Ceffa F, Bragheri R. Perianal granuloma caused by *Enterobius vermicularis*: report of a new observation and review of the literature. *J Pediatr* 1998;132:1055-6.
- Bharathi K, Anuradha S, Chandrasekar VA, Thirunaryanan R. *Enterobius vermicularis* worm granuloma mimicking like a pseudo tumor in the anal canal: An unusual clinical presentation. *Trop Parasitol* 2012;2:124-6.
- Vafai M, Mohit P. Granuloma of the anal canal due to *Enterobius vermicularis*. Report of a case. *Dis Colon Rectum* 1983;26:349-50.
- Arkoulis N, Zerbini H, Simatos G, Nisiotis A. *Enterobius vermicularis* (pinworm) infection of the liver mimicking malignancy: Presentation of a new case and review of current literature. *Int J Surg Case Rep* 2012;3:6-9.
- Elsaid N, Mahmood H, Tekkis P, Tan E. Enterobiasis-related inflammatory caecal polyp masquerading as a malignancy. *BMJ Case Rep* 2014.
- Furnée EJ, Spoto C, de Graaf MJ, Smakman N. *Enterobius vermicularis* infection of the liver in a patient with colorectal carcinoma with suspected liver metastasis. *BMJ Case Rep* 2015;5:2015.
- Pilszczek FH. Helminthic infections mimicking malignancy: a review of published case reports. *J Infect Dev Ctries* 2010;4:425-9.
- Kim YH, Kang KJ, Kwon JH. Four cases of hepatic fascioliasis mimicking cholangiocarcinoma. *Korean J Hepatol* 2005;11:169-75.
- Aydin O. Incidental parasitic infestations in surgically removed appendices: a retrospective analysis. *Diagnost Pathol* 2007;2:16.
- Ng W.S., Gallagher J., McCaughan G. "Pinworm" infection of the liver: unusual CT appearance leading to hepatic resection. *Dig Dis Sci* 2004;49:466-8.
- Mondou E.N., Gnepp D.R. Hepatic granuloma resulting from *Enterobius vermicularis*. *Am J Clin Pathol* 1989;91:97-100.
- Galán-Puchades MT, Fuentes MV. On Taeniasis/Cysticercosis Mimicking Lymphoma on PET/CT Imaging. *Clin Nucl Med* 2015;40:614.
- Omonisi AE, Odujoko OO, Aluko JA, Akinyemi HA, Alatishe OI, Omoniyi-Esan GO. Human cysticercosis of the breast mimicking breast cancer: a report of a case from Ile-Ife, Nigeria. *Niger J Med* 2014;23:351-4.

A Rare Cause of Hemoptysis: Oropharyngeal Leech

Nadir Bir Hemoptizi Nedeni: Orofaringeal Sülük

© İdris Çıldır

Karaman State Hospital, Clinic of Otolaryngology, Karaman, Turkey

Cite this article as: Çıldır İ. A Rare Cause of Hemoptysis: Oropharyngeal Leech. Türkiye Parazitoloj Dergisi 2020;44(1):61-3.

ABSTRACT

We report the case of a 33-year-old patient who presented with dyspnea and hemoptysis due to an oropharyngeal leech infestation. The patient was a shepherd and his detailed history revealed that he had been drinking water from natural springs. In the examination, a vivid dark green colored foreign body moving towards the nasopharynx and hypopharynx was detected in the oropharynx. The leech was removed under local anesthesia by gently grasping with the help of a long clamp. It should be noted that leeches are common in rural water sources and they can cause severe morbidity and even mortalities due to serious complications such as severe anemia and airway obstructions. A thorough oral and oropharyngeal examination will be sufficient to identify such cases, indicating the importance of physical examination in patients that present with otherwise unexplained airway obstruction and hemoptysis.

Keywords: Leech, hemoptysis, respiratory foreign body

ÖZ

Bu çalışmada, orofaringeal sülüğe bağlı dispne ve hemoptizi şikayeti ile başvuran 33 yaşında bir hasta sunuldu. Hasta bir çobandı ve ayrıntılı özgeçmişinde doğal kaynaklardan su içme öyküsü bulunuyordu. Muayenede orofarinkste, nazofarinks ve hipofarinks yönüne doğru hareket eden canlı koyu yeşil renkli yabancı cisim tespit edildi. Sülük lokal anestezi altında uzun bir klemp yardımıyla yardımıyla hafifçe tutularak çıkarıldı. Sülüklerin kırsal su kaynaklarında yaygın olduğu ve şiddetli anemi ve havayolu tıkanıklığı gibi ciddi komplikasyonlar nedeniyle ciddi morbidite ve hatta ölümlere neden olabileceği bildirilmiştir. Açıklanamayan hava yolu tıkanıklığı ve hemoptizi ile başvuran hastalarda fizik muayenenin önemli olduğunu gösteren bu tür olguları belirlemek için ayrıntılı bir oral ve orofaringeal muayene yeterli olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Sülük, hemoptizi, solunum yolunda yabancı cisim

INTRODUCTION

Leeches are blood-sucking hermaphrodite parasites that are classified in the phylum Annelida of the class Hirudinea (1,2). Leech infestations often occur with aquatic leeches and are more common in the rural regions of Asia, the Mediterranean countries and Africa (3). Aquatic leeches may enter the body through oral or nasal routes when individuals wash and drink, while the urogenital route is also observed when individuals swim or bathe in infested water (4). Leech saliva contains also anesthetic agents; therefore, the host often does not perceive leech as a foreign body, they may not even feel the entity even during attachment. Despite this, depending on the location they have attached to, leeches may cause various symptoms such as continuous bleeding, hematemeses,

nosebleeds, hemoptysis and cough (4,5). Stridor and even death may occur if the leech reaches the larynx and trachea.

CASE REPORT

A 33-year-old male patient who was admitted to the emergency outpatient clinic with complaints of hemoptysis was referred to the ear, nose and throat (ENT) department with a preliminary diagnosis of oropharyngeal leech after he was examined by the emergency physician. In his detailed history, the patient stated that he was a shepherd and often drank from the spring water in the mountains. He said that blood had been coming from his mouth for the last 3-4 days, he was snoring, and also had weakness, dry coughs and occasional breathing difficulties. In the



Received/Geliş Tarihi: 25.11.2019 Accepted/Kabul Tarihi: 13.12.2019

Address for Correspondence/Yazar Adresi: İdris Çıldır MD, Karaman State Hospital, Clinic of Otolaryngology, Karaman, Turkey
Phone/Tel: +90 505 789 89 74 E-mail/E-Posta: idriscildir@gmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0003-3615-8734

ENT examination, a vivid dark green colored foreign body moving towards the nasopharynx and hypopharynx was detected in the oropharynx (Figure 1).

The patient was admitted to the clinic with a preliminary diagnosis of leech. Laboratory tests revealed a hemoglobin value of 8.5 g/dL. The leech located in the oropharynx was removed under local anesthesia by gently grasping with the help of a long clamp (Figure 2, 3).

After the procedure, the oropharynx was controlled and the minimal bleeding was stopped by applying pressure (Figure 4). The patient was discharged with a favorable general condition and was referred to the hematology outpatient clinic for anemia evaluation.

DISCUSSION

Leeches can generally pass into the human body via the excretory orifices of individuals who drink or bathe in infested waters (4). Because of this mode of transmission, nearly all cases have been reported from underdeveloped countries where the use of safe water is a common problem, particularly in rural areas (6). Clinical features are variable and depend mostly on the site of attachment. A meta-analysis by Saki and colleagues reviewed 28 leech infestation cases from Iran and 62 cases from the other countries. The majority of the cases were reported from Near Eastern countries such as Iran, Pakistan, Israel, Syria and Turkey. Reported cases had a wide age distribution (2 to 70 years) and were mostly associated with drinking from or swimming in spring waters. It was found that upper respiratory tract infestation was a common site and related symptoms such as cough, bloody sputum production, frank hemoptysis, and dyspnea were common (7). The most common clinical feature of leech parasites is nasal infestation and recurrent unexplained epistaxis (8). In a 19-patient study conducted between 2012 and 2016, it was shown that all patients (12 nasal, 6 nasopharynx, 1larynx) presented with at least one of the following findings: epistaxis, hemoptysis, coughing, foreign body sensation at the site, and bloody stool (9). In our case, hemoptysis and shortness of breath due to leech

attachment to the oropharyngeal region and mild anemia were observed.

When localized in the oropharynx, leech infestation may simulate the symptoms of angioedema. Symptoms of mechanical obstruction, including nasal obstruction, dysphagia, dysphonia



Figure 2, 3. Image of leech after removal



Figure 1. The appearance of the leech during oropharyngeal examination



Figure 4. View of the oropharynx after the procedure

or dyspnea can progress over time, since the leech will grow with feeding (10). Such cases in the airways require urgent intervention since hypoxia may be a real possibility that could further lead to severe obstructions and even death (11). For instance, Kunduracıoğlu et al. (12) reported a case of almost complete obstruction of the rima glottis in a 77-year-old male patient, and Güloğlu et al. (13) reported a case of a 23-year-old male patient that had died due to respiratory obstruction caused by a leech located just below the epiglottis.

Severe or even life-threatening anemia is a common finding in patients with leech infestation (14). In the literature, cases of leech infestation with severe anemia that required blood transfusions have been reported (2,14,15). Cundall et al. (14) reported leech infestations in six cases; three had severe anemia and one had died. In a case reported by Ağin et al. (15), hemoglobin level was shown to have decreased to 3.8g/dL and urgent blood transfusions were required.

In the literature, in addition to mechanical separation/removal, additional treatment models including superficial administration of local anesthetics or hypertonic saline, have been reported (1,2). For the removal of nasopharyngeal leeches, 5% cocaine or 4% lidocaine solution was injected directly into the leech, causing paralysis (4). In addition, physiological saline, nit, turpentine oil and alcohols was reported to assist in the separation of leeches (4). In our case, the leech located in the oropharynx was removed under local anesthesia by gentle grasping and pulling with a long clamp.

CONCLUSION

Hirudiniasis should be part of the differential diagnosis in patients presenting with unexplained hemoptysis or anemia, especially if they live in less developed rural areas where clean drinking water is not always available. Careful examination of the upper respiratory tract and digestive tract may provide early detection of leech infestation. Early diagnosis and treatment are important in preventing fatal complications due to long-term leech exposure. Because of the risk of contamination, people living in endemic areas should be educated to avoid drinking water directly from natural sources and they should be encouraged to use boiled and/or filtered water.

* Ethics

Informed Consent: Informed consent was obtained.

Peer-review: Internally peer reviewed.

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

REFERENCES

1. White G. Leeches and leech infestation. Manson's tropical diseases, 20th edn. Saunders, London. 1998:1523-5.
2. El-Awad ME, Patil K. Haematemeses due to leech infestation. Annals of Tropical Paediatrics. 1990;10:61-2.
3. Walker DH, Guerrant RL and Weller PF. *Essentials of tropical infectious diseases*. Churchill Livingstone, 2001. ISBN 0443079099.
4. Bilgen C, Karci B and Uluöz Ü. A nasopharyngeal mass: leech in the nasopharynx. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 2002;64:73-6.
5. Chen WC, Chien CY, Yang CH, Li JH, Hwang CF. Nasal leech infestation: report of seven leeches and literature review. European Archives of Otorhino-Laryngology 2010;267:1225-9.
6. Solomon E. Leech--an unusual cause of (laryngo-tracheal) obstruction. Ethiopian Medical Journal 1991;29:141-2.
7. Saki N, Rahim F, Nikaghlagh S and Saki G. Meta analysis of the leech as a live foreign body: detection, precaution and treatment. Pakistan Journal of Biological Sciences 2009;12:1556-63.
8. Chen WC, Chien CY, Yang CH, Li JH and Hwang CF. Nasal leech infestation: report of seven leeches and literature review. European Archives of Otorhino-Laryngology: Official journal of the European Federation of Otorhino-Laryngological Societies (EUFOS) 2010;267:1225-9.
9. Harun K. Management of upper airway leech infestations. Ear Nose Throat Journal 2019;145561319860527.
10. Aluiz C, Yasar NF, Uzun O and Polat E. Oropharyngeal leech infestation: A Case Report. Firat Tıp Dergisi. 2013; 18.
11. Kuehnemund M, Bootz F. Rare living hypopharyngeal foreign body. Head Neck 2006;28:1046-8.
12. Kunduracıoğlu A, Karasu I, Afrashi A, Özsoz A, Çakan A, Aksel N. Larinkste sülük infestasyonuna bağlı hemoptizi. Solunum Derg 2009;11:134-6.
13. Güloğlu C, Al B, Özhasenekler A, Güllü N, Aldemir M. Üst solunum yolu obstrüksiyonu, burun kanaması ve kronik aneminin nadir bir sebebi olarak sülük: İki olguluk deneyimimiz. Tıp Araştırmaları Dergisi 2004;2:45-8.
14. Cundall DB, Whitehead SM, Hechtel FO. Severe anaemia and death due to the pharyngeal leech *Myxobdella africana*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1986;80:940-4.
15. Ağin H, Ayhan FY, Gülfidan G, Cevik D, Derebaşı H. Severe anemia due to the pharyngeal leech *Limnatis nilotica* in a child. Turkiye Parazitoloj Derg 2008;32:247-8.

Bir Kaplumbağada (*Testudo graeca*) *Angusticaecum holopteron* (Rudolphi, 1819) Olgusu

A Case of *Angusticaecum holopteron* (Rudolphi, 1819) in a Turtle (*Testudo graeca*)

© Ceylan Ceylan, © Bilal Dik, © Onur Ceylan

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

Cite this article as: Ceylan C, Dik B, Ceylan O. Bir Kaplumbağada (*Testudo graeca*) *Angusticaecum holopteron* (Rudolphi, 1819) Olgusu.. Türkiye Parazitoloj Derg 2020;44(1):64-7.

ÖZ

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'na ezilmiş bir kaplumbağanın içerisinden çıkarılan yedi adet nematod getirilmiştir. Parazitlerin birkaç tanesi şeffaflandırma amacıyla laktofenole konulmuş ve yaklaşık olarak üç hafta boyunca bu şekilde bekletilmişlerdir. Parazitler saydamlaştırıldıktan sonra mikroskopik olarak apikal ve lateral pozisyonlarda incelenmiştir. Ayrıca dişi ve erkekleri ayırmak için örneklerin posterior uçları incelenmiştir. Mikroskopik inceleme sonucu laboratuvara getirilen yedi parazitin beşinin dişi, diğer ikisinin ise erkek olduğu belirlenmiş ve parazitler morfolojik özellikleri dikkate alınarak *Angusticaecum holopteron* (Rudolphi, 1819) olarak teşhis edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Angusticaecum holopteron*, askarit, kaplumbağa, nematod, *Testudo graeca*

ABSTRACT

Seven nematodes collected from a crushed turtle were brought to Selçuk University Faculty of Veterinary Parasitology Department. A few of them were transparented in lactophenol approximately for three weeks. After the parasites were cleared, their head regions were examined microscopically in apical and lateral positions. The posterior ends of the samples were also examined to separate male and females. According to the results of the microscopic examinations, it was found that five of seven parasites were female and remain two were male and parasites were identified as *Angusticaecum holopteron* (Rudolphi, 1819) considering their morphological characteristics.

Keywords: *Angusticaecum holopteron*, ascarid, nematode, *Testudo graeca*, turtle

GİRİŞ

Güney Avrupa'da yaşayan *Testudo* kaplumbağalarının Palearktık türleri, *Testudo hermanni* (*T. hermanni hermanni*, *T. hermanni boettgeri*), *Testudo graeca* (*T. graeca graeca*, *T. graeca iberica*) ve *Testudo marginata*'dır. Akdeniz Mahmuzlu kaplumbağasının (*T. graeca*) Kuzey Afrika, Güney İspanya, İsrail, Suriye, Kuzey Yunanistan, Romanya, Bulgaristan, Türkiye, Transkafkasya, Rusya ve İran'da görüldüğü bildirilmiştir (1,2).

Türkiye'de *Testudo* cinsine ait dört alt tür bulunmaktadır. Bunlardan *T. graeca iberica* Karadeniz Bölgesi hariç geniş bir dağılıma sahipken, *T. graeca terrestris* Türkiye'nin güneyinde, *T. graeca anamurensis*

Türkiye'nin güneybatısında dağılım göstermektedir. Türkiye'nin doğusunda dağılım gösteren *T. graeca armeniaca* ise diğer bir alt tür olup, hakkında sınırlı düzeyde bilgi mevcuttur (3,4). Literatür bilgilerle karşılaştırıldığında, kaplumbağalardaki parazitik enfeksiyonlarla ilgili çalışmalar son zamanlarda dikkat çekmeye başlamıştır. *Testudo* cinsi kaplumbağalarda görülen nematodlar Pharyngodonidae, Atractidae, Ascarididae ve Capillaridae ailelerinde yer almaktadır. Ancak bu nematodlarla ilgili veriler parazitlerin taksonomi ve morfolojisi ile ilgili olup, parazitlerin biyolojisi, epidemiyolojisi, konak-parazit-çevre etkileşimi ve bireysel risk faktörleri ile ilgili bilgiler yetersizdir (5).



Geliş Tarihi/Received: 24.09.2019 Kabul Tarihi/Accepted: 20.12.2019

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Ceylan Ceylan, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye
Tel/Phone: +90 534 716 15 01 E-Posta/E-mail: ceylanilhan@selcuk.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0001-8072-2983

Türkiye’de, omurgalıların nematodları üzerine yapılan bir çalışmada kara kaplumbağalarında (*Testudo graeca iberia*) üç cinse ait 12 nematod türüne (*A. holoptera*, *Tachygonetria conica*, *T. dentata*, *T. longicollis*, *T. macrolaimus*, *T. microstoma*, *T. robusta*, *T. stylosa*, *T. thupari*, *T. uncinata*, *T. vivipara*, *Atractis dactyluris*) rastlanmıştır. Yapılan bu çalışmada incelenen sekiz kaplumbağanın hepsinde *A. holoptera*’un larva veya erginleri tespit edilmiş, larvaların genel olarak akciğerlerde, erginlerin ise bağırsaklarda saptandığı bildirilmiştir (6). Daha önceleri *Ascaris holoptera* ve *Angusticaecum brevispiculum* gibi isimlerle bilinmekte olan *A. holoptera*, çoğunluğu Avrupa’da olmak üzere dünyanın birçok yerinden ve farklı kaplumbağa türlerinden bildirilmiştir. *A. holoptera*; *Testudo marginata*, *T. horsfieldii*, *T. graeca iberia*, *T. graeca graeca*, *T. hermanni*, *Chelonoidis denticulata*, *Kinyxix belliana*, *Emys orbicularis*, *Terrapene carolina* gibi birçok kaplumbağa türünden rapor edilmiştir (7). *Angusticaecum holoptera* yaklaşık olarak 13-17 cm uzunluğunda, 6,51-7,79 mm özefagus uzunluğuna sahip bir kaplumbağa askaritidir (8). Kaplumbağaların bağırsaklarında yaşadığı bildirilmekle birlikte, yapılan akciğer dokusu incelemelerinde *A. holoptera* larvalarına rastlandığı belirtilmektedir. Bu durum parazitin yaşam döngüsü içerisinde vücutta göç geçirdiğinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (6,9). *A. holoptera*’un Türkiye’deki kaplumbağalarda varlığı ile ilgili çalışma sayısı oldukça azdır. Bu nedenle hazırlanmış olan bu olgu sunumunun konuyla ilgili çalışan bilim insanlarına faydalı olması amaçlanmıştır.

OLGU SUNUMU

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı’na ezilmiş bir kaplumbağanın içerisinden çıkarılan yedi nematod getirilmiştir. Kaplumbağa ezilmiş olduğu için parazitlerin hangi organdan alındığı anlaşılamamıştır. Laboratuvara getirilen parazitler ilk olarak makroskopik ve mikroskopik olarak incelenmişlerdir. Daha sonra parazitlerin birkaçı laktofenole konulmuş ve yaklaşık olarak üç hafta boyunca saydamlaşmaya

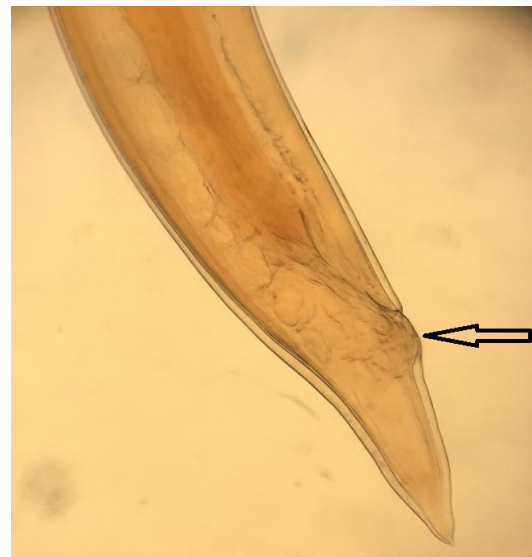
bırakılmıştır. Parazitler şeffaflandırdıktan sonra mikroskopik olarak baş bölgeleri apikal ve lateral pozisyonlarda incelenmiştir. Ayrıca, dişi ve erkekleri ayırmak için vücudun posterior uçları incelenmiştir. Aynı zamanda parazitlerin boyları da bir cetvel yardımıyla ölçülmüş ve fotoğrafları çekilmiştir. Mikroskopik inceleme sonucu, laboratuvara getirilen parazitler, ilgili literatürler (8,10) doğrultusunda *A. holoptera* olarak teşhis edilmiştir. Parazitlerin dudak yapıları ile erkek bireylerin spikülüm yapısına, preanal ve postanal papillaların sayısına, gubernaculumun bulunup bulunmaması durumuna bakılarak; beşinin dişi diğer ikisinin ise erkek olduğu gözlenmiştir. Dişi *A. holoptera*’ların 16,5-22 cm, erkeklerin ise 11,5-12,5 cm uzunlukta oldukları belirlenmiştir. Yine erkeklerde gubernaculumun olmadığı, altı çift preanal papillanın bulunduğu ve spikülümün eşit olduğu tespit edilmiştir.



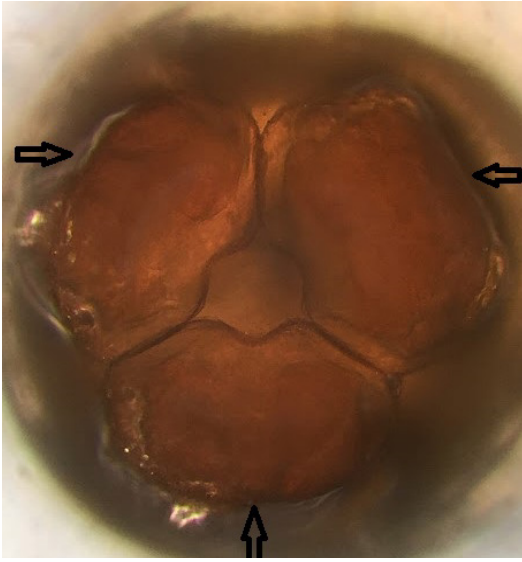
Resim 2. Erkek *Angusticaecum holoptera*’un spikül yapısı, orijinal



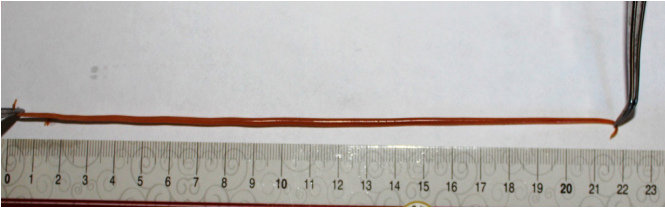
Resim 1. *Angusticaecum holoptera*’un baş ve boyun yapısı, orijinal



Resim 3. Dişi *Angusticaecum holoptera*’un genital çıkıntısı, orijinal



Resim 4. *Angusticaecum holopteron*'un dudak yapısı, orijinal



Resim 5. *Angusticaecum holopteron*, dişi, orijinal

TARTIŞMA

Angusticaecum holopteron, Türkiye'de ve diğer bazı ülkelerde çeşitli kaplumbağa türlerinde bildirilmesine rağmen bu nematod ile ilgili çalışma sayısı yetersizdir. Bu çalışmada da *T. graeca* türü kaplumbağaların bağırsaklarında yaşayan *A. holopteron* nematodu teşhis edilmiştir. Laboratuvara getirilen askaritlerin spikülüm, preanal ve postanal papilla sayıları, gubernaculumun olup olmaması, dudak yapısı ve boyları ile ilgili morfolojik ölçümler teşhis amacıyla kullanılan literatürlerle (8,10) uyumlu bulunmuştur. Zalesny ve ark. (8) dişi *A. holopteron*'ların boylarının 128-165 mm aralığında olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada incelenen dişi örneklerden birinin 22 cm olduğu gözlenmiştir (Resim 5). Her ne kadar bu örneğin uzunluğu Zalesny ve ark. (8) nın bildirilerine oranla daha büyük olsa da, morfolojik özelliklerinin *A. holopteron*'la aynı olmasından ötürü bu dişi nematod da *A. holopteron* olarak teşhis edilmiştir. *Testudo* cinsi kaplumbağa popülasyonu üzerinde sınırlayıcı etkisi olan parazitlerin rolleri yeterince anlaşılamamıştır. Bu kaplumbağaların Helmintofauna üyeleri arasında birçok tür bildirilse de, dünyanın değişik yerlerinde ve Türkiye'de *T. graeca* üzerine yapılmış çalışma sayısı oldukça azdır (5,11). Irak'ta aralarında *T. graeca terrestris*'in de bulunduğu bazı sürüngenlerde helmint faunasını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada *T. graeca terrestris* kaplumbağalarının ince bağırsakları ve midelerinde *A. holopteron*'a rastlanmıştır. Bu nematodun dışında yine mide ve ince bağırsaklarda *Atractis dactyluris* ve rektumda ise *Tachygonetria nicolli* tespit edilmiştir. *A. holopteron*'un

neden olduğu enfeksiyonlara erkek kaplumbağaların %27,3'ünde, dişi kaplumbağaların ise %36,4'ünde rastlanmıştır (12). Almanya'da yapılan bir çalışmada son yıllarda pet hayvanı olarak kullanımı yaygınlaşan kaplumbağalarda protozoon ve helmint enfeksiyonlarının yaygınlığı 19 farklı türde ve 1005 adet kaplumbağada araştırılmıştır. İncelenen kaplumbağa dışkılarında en fazla oxyurid nematodların (%43,18) ve ardından ise ikinci sırada *Angusticaecum* spp.'nin (%0,01) teşhis edildiği bildirilmiştir. Araştırmada 12 kaplumbağada *Angusticaecum* teşhis edilmiş ve bu nematodun bulundukları kaplumbağa türleri ise *T. hermanni*, *Stigmochelys pardalis*, *Centrochelys sulcata* ve bir kısmı ise bilinmeyen kaplumbağa türleri olarak sıralanmıştır. Çalışmada ayrıca ölü olan 49 adet kaplumbağaya nekropsi yapılmış ve bunların 14'ünün (%28,6) şiddetli paraziter enfeksiyona bağlı olarak öldükleri bildirilmiştir (13). İspanya'nın güneyinde 2010 yılında yapılan bir çalışmada; kafeste bakılan ve serbest yaşayan 107 kaplumbağanın dışkı incelemelerinde toplam 16 Oxyurid türü ve askaritlerden *A. holopteron* tespit edilmiştir. Oxyurid familyasına bağlı türlerin yumurta ve erişiklerinin oranları %94 ve %70 olarak tespit edilirken; askarit yumurtalarının ve erişiklerinin oranı ise %26 ve %5 olarak tespit edilmiştir (11). Nevşehir ili sınırları içerisinde Kapadokya'da yapılan bir çalışmada; dışkılama sırasında anüsten dışarı atılırken ve dışkıların makroskobik incelemeleri sırasında gözlenen *Angusticaecum* spp., Kaplumbağa Vadisi'ndeki dişi bireylere ait dışkı örneklerinin %40'ında, erkek bireylere ait dışkı örneklerinin ise %50'sinde gözlenmiştir. *Angusticaecum* spp. örnekleri Nar Vadisi'nde ise dişi bireylere ait dışkı örneklerinin %50'sinde, erkek bireylere ait dışkı örneklerinin %100'ünde gözlenmiştir (14). Yıldırımhan ve ark. (1) yapmış oldukları çalışmada; Bursa'da incelemiş oldukları *T. graeca*'ların sindirim sisteminde *A. dactyluris*, *A. holopteron*, *Mehdiella microstoma*, *M. uncinata*, *T. conica*, *T. dentate* ve *T. longicollis* tespit etmişlerdir. Schad ve ark. (8)'da Türkiye'de *T. graeca iberica* türü kaplumbağalarda *A. holopteron* varlığını bildirmişlerdir. Bu çalışmaların dışında Türkiye'de *A. holopteron*'un *T. graeca* türü kaplumbağalarda varlığıyla ilgili başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada kaplumbağanın kendisi incelenemediğinden, diğer helmint türleriyle enfekte olup olmadığı hakkında bir yorum yapılamamış, sadece laboratuvarımıza getirilen örnekler incelenebilmiştir. Bu incelemeler sonucu örneklerin *A. holopteron* olduğu anlaşılmıştır. Bu olgu sunumu Türkiye'de *T. graeca*'larda *A. holopteron*'un varlığının bildirildiği ender çalışmalardan birisi olup, çalışma *A. holopteron*'a ait çeşitli morfolojik yapıları gösteren fotoğraflarla zenginleştirilmiştir.

SONUÇ

Mahmuzlu Akdeniz kaplumbağası (*T. graeca*) Avrupa, Asya ve Afrika kıtalarında dağılım göstermesine ve Batı Palearktik'te en yaygın kaplumbağa türü olmasına rağmen, savunmasız türler olarak sınıflandırılmakta ve küresel popülasyonu azalmaktadır. Popülasyondaki azalmanın sebeplerinden bir tanesinin de parazitler olduğu düşünülmekte olup, bu durumun önlenmesi amacıyla gereken tedbirlerin alınması gerekmektedir. Yapılan taramalar neticesinde kaplumbağa helmintleri ile ilgili sınırlı sayıda kaynağa ulaşılmıştır. Kaplumbağa helmintlerinin Türkiye'deki yaygınlığını belirlemek amacıyla daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. İlerde kaplumbağalarla ilgili yapılabilecek çalışmalara katkı sağlaması açısından bu makale yazılmış ve çeşitli resimler ile de zenginleştirilmiştir.

*** Etik**

Hasta Onayı: Makalede açıklanan parazitler, fakültemizde okumakta olan bir öğrenci tarafından parçalanmış halde bulunan ölü bir kaplumbağanın içinden toplanarak bize getirilmiştir. Bu sebeple hasta onay bilgisi mevcut değildir.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu ve dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

*** Yazarlık Katkıları**

Cerrahi ve Medikal Uygulama: B.D., Konsept: C.C., B.D., Dizayn: C.C., B.D., Veri Toplama veya İşleme: C.C., B.D., O.C., Analiz veya Yorumlama: C.C., B.D., O.C., Literatür Arama: C.C., O.C., Yazan: C.C., B.D., O.C.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Yıldırımhan HS, Güven A, Sümer N. The helminth parasites of the Mediterranean spur-thighed tortoise, *Testudo graeca* (L, 1758) from Bursa, Turkey. *Biharean Biol* 2018;12:10-12.
2. Bertolero A, Cheylan M, Hailey A, Livoreil B, Willemsen RE. *Testudo hermanni* (Gmelin 1789) -Hermann's Tortoise. In Rhodin AGJ, Pritchard PCH, Saumure RA, Buhlmann KA, Iverson JB and Mittermaier RA (Eds.) *Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A compilation project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group. Chelonian Research Monographs* 2011; ISSN 1088-7105.
3. Türkozan O, Kiremit F, Parham JF, Olgun K, Taskavak E. A quantitative reassessment of morphology-based taxonomic schemes for Turkish tortoises (*Testudo graeca*). *Amphibia-Reptilia* 2010;31:69-83.
4. Türkozan O, Kiremit F, Lavin B, Bardakçı F, Parham JF. Morphological and mitochondrial variation of spur-thighed tortoises, *Testudo graeca*, in Turkey. *Herpetol J* 2018;28,1-9.
5. Traversa D, Capelli G, Iorio R, Bouamer S, Angelo C. Epidemiology and biology of nematodofauna affecting *Testudo hermanni*, *Testudo graeca* and *Testudo marginata* in Italy. *Parasitol Res* 2005;98:14-20.
6. Schad GA, Kuntz RE, Wells WH. Nematode parasites from Turkish vertebrates: An annotated list. *Can J Zool* 1960;38:949-963.
7. Bouamer S, Morand S. Nematodes Parasites of Testudinidae (Chelonia): List of Species and Biogeographical Distribution. *Ann Zool* 2006;56:225-240.
8. Zalesny G, Popiolek M, Jarnecki H, Luczynski T. *Angusticaecum holopteron* (Rudolphi, 1819) (Nematoda, Ascaridoidea): potential alien invasive species in Polish nematofauna. *Biologia i Hodowla Zwierząt* 2009;58,179-183.
9. Rataj AV, Lindtner-Knific R, Vlahovic K, Mavri U, Dovc A. Parasites in pet reptiles. *Acta Vet Scand* 2011;53:33.
10. Yamaguti S. *Systema Helminthum: By Saytu Yamaguti Volume III, The Nematodes of Vertebrates Part I. Interscience Publishers* 1961; p.167.
11. Chávarri M, Eduardo B, Andrés G, Eva G, Carlos MC, Juana M, Ortiz RRY. Differences in helminth infections between captive and wild spur-thighed tortoises *Testudo graeca* in southern Spain: a potential risk of reintroductions of this species, *Vet Parasitol* 2012;187:491-7.
12. Al-Barwari SE, Saeed I. On the Helminth Fauna of Some Iraqi Reptiles. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2007;31:330-6.
13. Hallinger MJ, Taubert A, Hermsilla C, Mutschmann F. Occurrence of health-compromising protozoan and helminth infections in tortoises kept as pet animals in Germany. *Parasit Vectors* 2018;11:352.
14. Arslan G. Kapadokya Bölgesi'nde (Nevşehir) Kara Kaplumbağası (*Testudo graeca* Linnaeus, 1758) Üzerine Biyo-Ekolojik Çalışmalar (Tez). Hacettepe Üniversitesi. 2013.