

— TURKISH JOURNAL OF PARASITOLOGY —

Özgün Araştırmalar / Original Investigations

Denizli'deki Sularda Protozoon Parazitlerin Varlığı

The Presence of Protozoon Parasites in Waters in Denizli

Tuğba Sağlam, Serdar Düşen, Ülkü Karaman, Ergun Mete; Bolu, Denizli, Ordu, Türkiye

Pneumocystis jirovecii in Lung Cancer Patients

Akciğer Kanseri Hastalarda Pneumocystis jirovecii

Ahmed Galip Halidi, Merhamet Ölçen, Esra Gürbüz, Abdurrahman Ekici, Selahattin Aydemir, Hasan Yılmaz; Muş, Şanlıurfa, Van, Turkey

Endoskopik ve Kolonoskopik Örneklerde Parazitler

Parasites in Endoscopic and Colonoscopic Samples

Mehmet Tugay Eren, Serpil Değerli, Özlem Yöner; Sivas, Türkiye

Toxoplasma gondii Seropositivity in Pregnants

Gebelerde Toxoplasma gondii Seropozitifliği

Enis Fuat Tüfekçi, Melike Yaşar Duman, Büşra Çalışır, Çetin Kılınç, Ahmet Uzel; Kastamonu, Turkey

Survey of Anaplasma phagocytophilum and Related Strains

Anaplasma phagocytophilum ve ilişkili Suşların Araştırılması

Ufuk Erol, Ömer Faruk Şahin, Kürşat Altay; Sivas, Turkey

Conjunctival Flora in Demodex Blepharitis

Demodex Blefaritinde Konjonktival Flora

Ayten Gündüz, Ersan Ersin Demirel, Murat Fırat; Malatya, Turkey

Determination of Resistance in Anopheles superpictus

Anopheles superpictus'ta Direncin Belirlenmesi

Sare İlknur Yavaşoğlu, Fatih Mehmet Şimşek; Aydın, Turkey

Anopheles sacharovi Nesillerinde Sterol Taşıyıcı Protein

Sterol-carrier protein-2 in Anopheles sacharovi

Sümeyye Aygün, Önder Düzü, Alparslan Yıldırım; Kayseri, Türkiye

Petek Güvesine Karşı Laboratuvar Denemeleri

Laboratory Experiments Against Wax Moth

Ahmet Onur Girişgin, Nurgül Çimenlikaya, Levent Aydın, Suna Aslı Zengin; Bursa, İstanbul, Türkiye

Pediculosis in Karaisalı, Adana

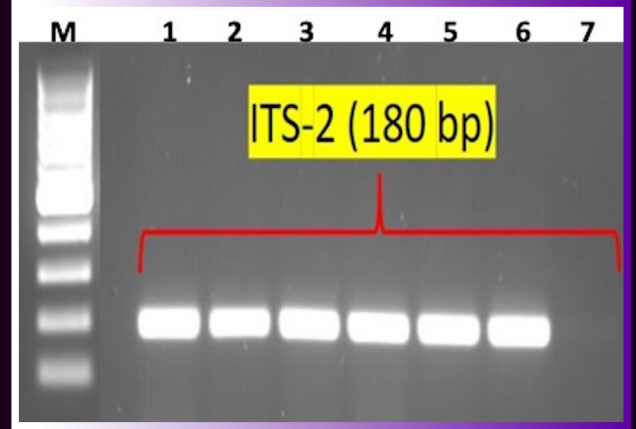
Adana Karaisalı'da Pedikülozis

Hakan Kavur, Halil Özkurt, Fatma Büyükkatran, Gülşah Eyyapan, Sümeyye Kalkan, Zehra Çelik, Emine Kurcan, Duran Ali Karataş, Davut Alptekin; Adana, Van, Turkey

Adjunctive Agent in Scabies Treatment

Skabiyes Tedavisinde Yardımcı Ajan

Aslan Yürekli; Aydın, Turkey



EDİTÖRDEN

2022 yılının dördüncü ve son sayısını 11 özgün araştırma makalesi, 1 olgu sunumu, 1 derleme ve 2 editöre mektup olmak üzere 15 makale ile çıkarmaktayız.

Özgün araştırmalarda tıbbi ve veteriner parazitoloji alanlarından makaleler arasında; sularda protozoon parazitlerin araştırılması, kanser hastalarında *P. jirovecii* varlığının incelenmesi, endoskopi ve kolonoskopi yapılan hastalarda parazitlerin belirlenmesi, gebelerde toxoplasmosis, koyun ve keçilerde *A. phagocytophilum* varlığı, Blefarit nedeni olarak *Demodex*, Anopheles popülasyonlarında yapılan genetik çalışmalar, Adana ilimizde baş biti durumunun belirlenmesi ve uyuz tedavisinde çay ağacı yağının kullanılması gibi farklı alanlarından makalelere yer verilmiştir.

Derleme makalemizde ise hem ülkemizin hem de Dünya'da birçok ülkenin önemli sorunlarından biri olan *Toxoplasma gondii* enfeksiyonuna karşı geliştirilmeye çalışılan rekombinant protein tabanlı aşılarda ilgili detaylı bir incelenme sunulmuştur. Olgu sunumunda da endemik alan dışında da görülebileceğine ilişkin ve klinisyenlerin de dikkatini çekeceğini umduğumuz iki KKKA olgusuna yer verilmiştir.

Bilindiği üzere dergimiz Türkiye Parazitoloji Derneği'nin (TPD) oldukça kısıtlı kaynakları ile yayın hayatını sürdürmektedir. Derginin çıkartılması en büyük harcama kaynağını oluşturduğundan kaynaklar sürekli eksiye doğru gitmektedir. Bu nedenle 2023 yılı başından itibaren dergimize gönderilecek olan makalelerden dernek üyesi olan ve olmayan yazarlar için farklı olacak şekilde makale başına belli bir ücret alınmasına TPD Yönetim Kurulu tarafından karar verilmiştir.

Dergimizin ESCI için de başvurusu yeniden yapılmış olup sonucu beklenmektedir. Bu sürece büyük katkısı olan ve gönderilen makalelere özveri ile hakemlik yapan, bu sayının sonunda da listesi yayınlanan akademisyenlerimize de teşekkür etmek ve minnetlerimi sunmak isterim.

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

Prof. Dr. Yusuf Özbel

Baş Editör

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

Yusuf Özbek

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 Özbek

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
Fuat Hocalar
Turgay Akpınar

Grafik Departmanı/Graphics Department
Ayda Alaca
Çiğdem Birinci
Gülşah Saday
Gülşah Özgül

Finans Koordinatörü/Finance Coordinator
Sevinç Çakmak
Emre Kurtulmuş

Proje Koordinatörleri/Project Coordinators

Aybuke Ayvaz
Ayşel Balta
Gamze Aksoy
Gülşah Akın
Hatice Sever
Melike Eren
Nuran Akti
Özlem Çelik Çekil
Pınar Akpınar
Rabia Palazoğlu
Sümeyye Karadağ

Araştırma&Geliştirme/Research&Development
Nihan Karamanlı

Dijital Pazarlama Uzmanı/Digital Marketing
Specialist
Ümit Topluoğlu

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

Online Publication Date: Aralık / December 2022

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
hccetin@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 Nursery, 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 Gönenç

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 Kuvçak

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

Bilal Dik

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

Bilge Karatepe

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

Burk A. Dehority

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

Cem Ecmel Şaki

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

Cem Vuruşaner

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, 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 Akısı

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

Esma 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 Arıkan

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

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

Kirami Ölgün

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

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 Açıçı

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 Güllüz 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 Elaldi

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

Nermin Şakrı

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

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 Sarımeçmetoğlu

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



Renate Radek

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

Bülent Altın

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 Yılğör 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 Vatansever

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

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



HAKKIMIZDA

TARİHÇE

YAYIN POLİTİKASI

İNDEKSLENME

TELİF HAKKI

DİJİTAL ARŞİVLEME VE KORUMA POLİTİKASI

Tarihçe

Türkiye Parazitoloji Dergisi (Türkiye Parazitol 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.

İlk olarak 1978 yılında yayınlanmaya başlanan 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 2004'ten beri internet ortamında açık erişimle uluslararası literatüre katkı sunmaktadır.

Dergi Adı (İngilizce): Turkish Journal of Parasitology

Dergi Adı (Türkçe): Türkiye Parazitoloji Dergisi

Resmi Kısaltma: Türkiye Parazitol Derg

E-ISSN: 2146-3077

Yayın Politikası

Gönderim, değerlendirme ve yayın sürecinde yazarlardan herhangi bir ücret talep edilmez. Dergi uygulamaları, etik kurallar, teknik bilgiler ve gerekli formlar derginin web sayfasında belirtilir.

Yazılar, dergi web sitesinde temsil edilen JournalAgent çevrimiçi makale sistemi aracılığıyla gönderilmektedir.

İndekslenme

PubMed/MEDLINE

BIOSIS-Zoological Record

EBSCO Host

Index Copernicus

Gale

ProQuest

CINAHL

BIOSIS Previews Biological Abstracts

CABI

SCOPUS

Embase

J-Gate

TÜBİTAK ULAKBİM TR Dizin

DOAJ

ARDI

GOALI

Hinari

OARE

Turkish Medline

Turkish Citation Index

Telif Hakkı

Yayın kararı alındıktan ve kabul edildikten sonra başvurulara "Telif Hakkı Devir Formu" eklenmelidir. Form, derginin makale gönderme ve değerlendirme sitesinden de indirilebilir. Telif Hakkı Devir Formu, katkıda bulunan tüm yazarlar tarafından imzalanmalı ve bu ıslak imzalı belgenin taranmış bir versiyonu gönderilmelidir.

Yazar(lar), makalelerinin yayına kabul edilmesi durumunda, makalelerinin telif haklarını Türkiye Parazitoloji Dergisi'ne devrederler. Telif hakkı, makalenin herhangi bir biçimde (baskı, elektronik ortam veya başka bir biçimde) çoğaltılması ve dağıtılması için münhasır ve sınırsız hakları kapsar; ayrıca tüm diller ve ülkeler için çeviri haklarını da kapsar.

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

Yayınlanan tüm içerikler çevrimiçi ve ücretsiz olarak <https://www.turkiyeparazitolderg.org/> mevcuttur. Derginin içeriği, üçüncü şahısların, orijinal çalışmaya atıfta bulunmak ve ticari amaçlarla kullanmamak şartıyla, içeriği paylaşmasına ve uyarlamasına izin veren Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC-ND) 4.0 Uluslararası Lisansı (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) ile lisanslanmıştır.

Dijital Arşivleme ve Koruma Politikası

Dijital koruma, uzun vadeli, sürekli erişimi garanti etmek için artık dijital formatlarda mevcut olan bilgilerin alınmasını ve dağıtılmasını sağlayan bir dizi süreç ve aktivitedir. Koruma politikası aşağıdaki eylemleri içerir:

Web Sitesi

Elektronik içeriğin tamamı (web sitesi, makale vb.) üç farklı kaynaktan saklanmaktadır. Bir sunucudaki içerik çevrimiçidir ve okuyucular tarafından erişilebilir. Aynı içeriğin bir kopyası, diğer iki kaynaktan yedek olarak korunur. Bir sunucu arızalanırsa, diğer kaynaklar çevrimiçi hale getirilebilir ve web sitesinin 24-36 saat içinde kullanıma sunulması beklenir.

İndeksleme Hizmetleri

Dergimizin indeksleme hizmetleri, makaleler hakkında temel bilgileri depolar. Ayrıca bazı indeksleme servisleri makale ile ilgili metadataları ve makalelerin elektronik versiyonlarını arşivlemektedir. Bu sayede dergilere alternatif olarak makalelerin kopyaları bu sistemler aracılığıyla bilim camiasına sunulmaktadır.



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, editöre mektup ve video makale 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 alanlarda eğitim gören lisans ve lisansüstü öğrencilerdir.

Derginin editöryal ve yayın süreçleri ile etik kuralları 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) gibi uluslararası kuruluşların kurallarına uygun olarak şekillenmektedir. Dergimiz, şeffaf olma ilkeleri ve "akademik yayıncılıkta en iyi uygulamalar ilkeleri" (doaj.org/bestpractice) ile uyum içindedir.

Türkiye Parazitoloji Dergisi, PubMed/MEDLINE, BIOSIS-Zoological Record, EBSCO Host, Index Copernicus, Gale, ProQuest, CINAHL, BIOSIS Previews Biological Abstracts, CABI, SCOPUS, Embase, J-Gate, TÜBİTAK ULAKBİM TR Dizin, DOAJ, ARDI, GOALI, Hinari, OARE, Türk Medline ve Türkiye Atıf Dizini tarafından indekslenmektedir.

Dergi Adı (İngilizce): Turkish Journal of Parasitology

Dergi Adı (Türkçe): Türkiye Parazitoloji Dergisi

Resmi Kısaltma: Türkiye Parazitoloj Derg

E-ISSN: 2146-3077

Açık Erişim Politikası

Bu dergi, araştırmaları kamuya ücretsiz olarak sunmanın daha büyük bir küresel bilgi alışverişini desteklediği ilkesine dayanarak içeriğine anında açık erişim sağlar.

Yazarlar ve telif hakkı sahipleri, Türkiye Parazitoloji Dergisi 'nde yayınlanan makaleler için tüm kullanıcılara ücretsiz olarak erişim sağlar. Makaleler kaynak gösterilmek şartıyla kullanıma açıktır.

Açık Erişim Politikası, Budapeşte Açık Erişim Girişimi'nin (BOAI) kurallarına dayanmaktadır <https://www.budapestopenaccessinitiative.org/read/> (hyperlink), "açık erişim" ile, onun ücretsiz erişilebilirliğini kastedilmektedir. Herhangi bir kullanıcının bu makalelerin tam metinlerini okumasına, indirmesine, kopyalamasına, dağıtmasına, yazdırmasına, aramasına veya bağlantı vermesine, indeksleme için taramasına, yazılıma veri olarak iletmesine veya başka herhangi bir yasal amaç için internetin kendisine erişim elde etmekten ayrılmaz olanlar dışında finansal, yasal veya teknik engeller olmadan kullanmasına izin verir. Çoğaltma ve dağıtım üzerindeki tek kısıtlama ve bu alandaki

telif hakkının tek rolü, yazarlara çalışmalarının bütünlüğü üzerinde kontrol ve uygun şekilde tanınma ve alıntılanma hakkı vermek olmalıdır.

Gönderim, değerlendirme ve yayın sürecinde yazarlardan herhangi bir ücret talep edilmez.

Creative Commons

Creative Commons lisansı, telif hakkıyla korunan çalışmaların veya çalışmaların ücretsiz dağıtımını sağlayan bir kamu telif hakkı lisansıdır. Yazarlar, çalışmalarını kullanma, paylaşma veya değiştirme hakkını üçüncü şahıslara devretmek için CC lisansını kullanır. Bu dergi, Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) altında lisanslanmıştır ve bu, üçüncü tarafların bu bilgileri orijinal çalışmaya uygun şekilde referans vererek paylaşmasına ve uyarlamasına ticari olmayan amaçlar için izin verir.

Reklam Politikası

Potansiyel reklam verenler, Yazı İşleri ile iletişime geçmelidir. Reklam görselleri sadece Genel Yayın Yönetmeni'nin onayı ile yayınlanır.

Materyal Sorumluluk Reddi

Dergide yayınlanan makalelerde yer alan ifadeler veya görüşler editörlerin, yayın kurulunun ve/veya yayıncının görüşlerini yansıtmaz. Editörler, yayın kurulu ve yayıncı bu tür materyaller için herhangi bir sorumluluk veya yükümlülük kabul etmez. Dergide yayınlanan tüm görüşler, makalelerin yazarlarına aittir.

Yazışma Adresi

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

Yayınevi Yazışma Adresi

Galenos Yayınevi Tic. Ltd. Şti.

Adres: Molla Gürani Mah. Kaçamak Sk. No: 21, 34093 Fındıkzade-İstanbul/Türkiye

Tel: +90 212 621 99 25 Faks: +90 212 621 99 27

E-posta: info@galenos.com.tr



YAZARLARA BİLGİ

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, editöre mektup ve video makale 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:

Çalışmanın konseptine/tasarımına; ya da çalışma için verilerin toplanmasına, analiz edilmesine ve yorumlanmasına önemli katkı sağlamış olmak; **VE**

Yazı taslağını hazırlamış ya da önemli fikrî içeriğin eleştirel incelemelerini yapmış olmak; **VE**

Yazının yayından önceki son halini gözden geçirmiş ve onaylamış olmak; **VE**

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,

YAZARLARA BİLGİ

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.

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



YAZARLARA BİLGİ

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.

Tablolar

Tablolar ana dosyaya eklenmeli, kaynak listesi sonrasında sunulmalı, ana metin içerisindeki geçiş sıralarına uygun olarak numaralandırılmaz. Tabloların üzerinde tanımlayıcı bir başlık yer almalı ve tablo içerisinde geçen kısaltmaların açılımları 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, asteriksler ve benzer işaretler kullanılabilir. Makalenin geri kalanında olduğu gibi resimler de kör olmalıdır. Bu sebeple, resimlerde yer alan kişi ve kurum bilgileri de körleştirilmelidir. Görsellerin minimum çözünürlüğü 300DPI olmalıdır. Değerlendirme sürecindeki aksaklıkları önlemek için gönderilen bütün görsellerin çözünürlüğü net ve boyutu büyük (minimum boyutlar 100x100 mm) olmalıdır. Resim altyazıları ana metnin sonunda yer almalıdır.

Makale içerisinde geçen tüm kısaltmalar, ana metin ve 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 **sırayla** numara verilerek atıf yapılmalıdır.

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

Kaynaklar

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

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



YAZARLARA BİLGİ

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

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

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

Yazar olarak editör(ler): Norman LJ, 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.

Editöryal Ofis

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

Yayınevi Yazışma Adresi

Galenos Yayınevi Tic. Ltd. Şti.

Adres: Molla Gürani Mah. Kaçamak Sk.

No: 21, 34093 Fındıkzade-İstanbul-Türkiye

Tel: +90 212 621 99 25

Faks: +90 212 621 99 27

E-posta: info@galenos.com.tr



YAYIN ETİĞİ

Hakem Değerlendirmesi, Yayın Etiği ve Kötüye Kullanım

Hakem Değerlendirmesi

Makalelerin daha önce yayınlanmamış olması ve aynı anda başka bir yere gönderilmemiş olması koşuluyla başvuru kabul edilir; yazarlar, içeriği okuduğunu, onayladığını, tüm yazarların çıkar çatışmalarını beyan ettiğini, çalışmanın etik onaya uygun olduğunu ve uluslararası kabul görmüş etik standartlarda yürütüldüğünü kabul eder. Etik suistimallerden şüphelenilmesi durumunda, Yayın Kurulu ilgili uluslararası yayın etiği kurallarına (COPE yönergelerine) uygun olarak hareket edecektir.

Derginin yayın politikaları, Bilim Konseyi Editörleri tarafından önerilen kurallarda belirtildiği gibi yürütülür ve Biyomedikal Dergilere Gönderilen Makaleler için Tekdüzen Gereklilikler: Biyomedikal Yayın için Yazma ve Düzenleme (<http://www.icmje.org/>)'da yansıtılır. Buna göre yazarlar, gözden geçirenler ve editörlerin bu bildirimde yer alan etik davranışa ilişkin en iyi uygulama kılavuzlarına uymaları beklenmektedir.

Gönderilen yazılar çift-kör hakem değerlendirmesine tabi tutulur. Dergide yayımlanacak yazıların seçimine rehberlik eden bilim kurulu, derginin seçilmiş uzmanlarından ve gerekirse ilgili araştırma alanında ulusal ve uluslararası uzmanlardan seçilmiş uzmanlardan oluşur. Tüm yazılar editör, bölüm yardımcı editörleri ve en az üç dahili ve harici uzman hakem tarafından incelenir. Tüm araştırma makaleleri de bir istatistik editörü tarafından yorumlanır.

İnsan ve Hayvan Araştırmaları

Deneyisel, klinik, ilaç ve insan çalışmaları için, etik kurul onayı ve çalışma protokolünün uluslararası anlaşmalara uygunluğuna dair bir beyan (World Medical Association Association of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects," Ekim 2013, www.wma.net) gereklidir. Deneyisel hayvan çalışmalarında yazarlar, izlenen prosedürlerin hayvan haklarına uygun olduğunu (Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanım Kılavuzu, www.nap.edu.catalog/5140.html) belirtmeli ve hayvan Etik Kurul Onayı almalıdır. Etik Kurul Onayı belgesi, makale ile birlikte Türkiye Parazitoloji Dergisi'ne gönderilmelidir.

Etik Kurul Onayı ile yukarıda belirtilen uluslararası kılavuzlara uyum ve hastanın aydınlatılmış onamının alındığına dair beyan "Materyal ve Yöntem" bölümünde belirtilmeli ve kullanılan veri/medyanın hastanın kimliğini ortaya çıkarabileceği durumlarda vaka raporları gerekmektedir. Yazarlar, kurumlar arasında çıkar çatışması beyanı, herhangi bir mali veya maddi desteğin kabulünün belirtilmesi makale gönderen yazarlar için zorunludur ve bu açıklama makalenin sonunda yer almalıdır. Hakemler, yazarlar veya kurumlar ile aralarında herhangi bir potansiyel çıkar çatışması varsa, bunu rapor etmelidir.

İntihal ve Etik Suistimal

Türkiye Parazitoloji Dergisi, tüm makaleleri yayınlanmadan önce "iThenticate" kullanarak intihal taramasına tabi tutar.

Yazarların aşağıda yazılanlar gibi her türlü intihal ve etik suistimallerden kaçınmaları önemlidir:

İntihal: Başka bir yazarın yayınındaki bir içeriğin tamamını veya bir kısmını kaynak göstermeden yeniden yayınlamak.

Fabrikasyon (Uydurma): Var olmayan veri ve bulguları/sonuçları yayınlamak.

Çoğaltma: Bir makalenin farklı dillerde yeniden yayınlanmasını içeren başka bir yayından alınan verileri kullanmak.

Dilimleme (Salamizasyon): Bir çalışmanın sonuçlarını bölerek birden fazla yayın oluşturma.

Veri Manipülasyonu/Yanlışlığı: Yanlış bir izlenim vermek için araştırma verilerini manipüle etmek veya kasıtlı olarak çarpıtmak.

İntihal, fabrikasyon, çoğaltma, veri manipülasyonu ve dilimleme gibi etik olmayan uygulamaları ve yazarlık hediye etme, uygunsuz teşekkür ve COPE akış şemalarına uygun olmayan referanslar gibi uygulamalarla inceleme sürecini etkilemeye yönelik çabaları onaylamıyoruz.

Gönderilen yazılar ayrıca otomatik yazılım tarafından intihal ve yayın değerlendirmesine tabi tutulur. Yazarlar, çalışma sonuçlarını tamamen veya kısmen özet şeklinde yayınlayıp yayınlamadıklarını bildirmekle yükümlüdür.

A. YAYINCININ GÖREVLERİ:

Etik Olmayan Yayınlama Davranışının Ele Alınması

Yayıncı, iddia edilen veya kanıtlanmış bilimsel suistimal, hileli yayın veya intihal durumlarında, söz konusu makaleyi editörlerle yakın iş birliği içinde değiştirmek için tüm uygun önlemleri alacaktır. Bu, en ciddi durumda, etkilenen çalışmanın bir yanlışlık sonucu yayınlanmasını, ifşa edilmesini veya geri çekilmesini içerir. Yayıncı, editörlerle birlikte, araştırma suistimalinin meydana geldiği makalelerin yayınlanmasını tespit etmek ve önlemek için makul adımları atacak ve hiçbir koşulda bu tür kötüye kullanımın gerçekleşmesine teşvik etmeyecek veya bilerek izin vermeyecektir.

Editöryal Özerklik

Türkiye Parazitoloji Dergisi, herhangi birinin veya ticari ortakların etkisi olmaksızın editöryal kararların özerkliğini sağlamayı taahhüt eder.

Fikri Mülkiyet ve Telif Hakkı

Türkiye Parazitoloji Dergisi, dergide yayınlanan makalelerin mülkiyetini ve telif haklarını korur ve her makalenin yayınlanmış kaydını tutar. Dergi, yayınlanan her makalenin bütünlüğünü ve şeffaflığını sağlar.

Bilimsel Suistimal

Türkiye Parazitoloji Dergisi'nin yayıncısı, hileli yayın veya intihal ile ilgili gerekli tüm önlemleri almaktadır.

B. EDITÖRLERİN GÖREVLERİ:

Yayın Kararı ve Sorumluluğu

Dergi editörü, dergideki her şeyi kontrol altında tutar, okuyucuların ve yazarların ihtiyaçlarını karşılamaya çalışır.



YAYIN ETİĞİ

Editör ayrıca dergiye gönderilen makalelerin hangilerinin yayınlanması gerektiğine karar vermekten ve hakaret, telif hakkı ihlali ve intihal ile ilgili yasal gerekliliklere tabi politikalar tarafından yönlendirilmekten sorumludur. Editör, yayın kararları verirken hakemlerle tartışabilir. Yayının içeriğinden ve genel kalitesinden editör sorumludur. Editör, adil ve uygun bir hakemlik süreci sağlamalıdır.

Nesnellik

Dergiye gönderilen makaleler her zaman önyargısız olarak değerlendirilir.

Gizlilik

Editör, gönderilen bir makaleyle ilgili herhangi bir bilgiyi, editör kadrosu, hakemler ve yayıncı dışında hiç kimseye açıklamamalıdır.

Çıkar Çatışmaları ve İfşa

Türkiye Parazitoloji Dergisi, yazarlar, hakemler ve editörler gibi taraflar arasında herhangi bir çıkar çatışmasına izin vermez. Gönderilen bir makaledeki yayınlanmamış materyaller, yazarın açık izni olmaksızın hiç kimse tarafından kullanılmamalıdır.

Yayımlanan Eserlerde Temel Hatalar

Yazarlar, yayımlanan çalışmada önemli hatalar veya yanlışlıklar tespit edilirse, derhal dergi editörlerini veya yayıncısını bilgilendirmek ve makaleyi düzeltmek veya geri çekmek üzere onlarla iletişim sağlamakla yükümlüdür. Editörler veya yayıncı, yayımlanan bir çalışmanın önemli bir hata veya yanlışlık içerdiğini üçüncü bir taraftan öğrenirse, yazarlar makaleyi derhal düzeltmeli, geri çekmeli veya dergi editörlerine makalenin doğruluğuna dair kanıt sağlamalıdır.

C. HAKEMLERİN GÖREVLERİ:

Değerlendirme

Hakemler, yazarların kökeni, cinsiyeti, cinsel yönelimi veya politik felsefesini gözetmeksizin yazıları değerlendirir. Hakemler ayrıca değerlendirme sırasında gönderilen yazılar için adil bir kör hakem incelemesi sağlar.

Gizlilik

Gönderilen makalelerle ilgili tüm bilgiler gizli tutulur. Hakemler, editör tarafından izin verilmedikçe başkalarıyla tartışılmamalıdır.

Çıkar Çatışmaları ve İfşa

Hakemlerin yazarlar, fon sağlayıcılar, editörler vb. taraflarla ilgili herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Editöre Katkı

Hakemler, editöre karar vermede ve makaleyi geliştirmede yardımcı olabilir.

Nesnellik

Daima objektif bir değerlendirme yapılır. Hakemler görüşlerini uygun destekleyici argümanlarla açıkça ifade eder.

Kaynakların Onaylanması

Hakemler, yazarların atıfta bulunmadığı ilgili yayınlanmış bir çalışmayı tanımlamalıdır. Hakemler ayrıca, makale ile

kişisel bilgilerine sahip oldukları diğer yayınlanmış makaleler arasındaki önemli benzerlikleri veya örtüşmeleri editörün dikkatine sunarlar.

D. YAZARLARIN GÖREVLERİ:

Raporlama Standartları

Gönderilen bir makale orijinal olmalı ve yazarlar, makalenin daha önce herhangi bir dergide yayınlanmamış olmasını sağlamalıdır. Araştırmanın verileri makalede tam anlamıyla sunulmalıdır. Bir makale, başkalarının çalışmayı yeniden kopyalamasına izin vermek için gerekli ayrıntı ve referansları içermelidir.

Özgünlük

Çalışmalarını dergiye göndermek isteyen yazarlar, çalışmalarının tamamen özgün olduğundan emin olmalıdır. Literatürden alınan kelime ve cümleler uygun şekilde alıntılanmalıdır.

Çoklu Yayınlar

Yazarlar, aynı çalışmayı başka bir dergide yayınlanmak veya değerlendirilmek üzere göndermemiş olmalıdır. Aynı çalışmanın birden fazla dergiye aynı anda gönderilmesi kabul edilemez ve etik dışı bir davranış olarak nitelendirilir.

Kaynakların Belirtilmesi

Başkalarının çalışmalarının uygun bir şekilde alıntılanması gerekir. Yazarlar, çalışmayı belirlemede etkili olan yayınlara atıfta bulunmalıdır. Çalışmanın sürecini kapsayan tüm kaynaklar belirtilmelidir.

Makale Yazarlığı

Bir makalenin yazarlığı, çalışmaya kayda değer bir katkı yapmış olanlarla sınırlı olmalıdır. Başkaları araştırmaya katılmışsa, katkıda bulunanlar olarak listelenmelidir. Yazarlık aynı zamanda bir derginin editörü ile iletişim halinde olan bir sorumlu yazarı da içerir. Sorumlu yazar, tüm uygun ortak yazarların bir makaleye dahil edilmesini sağlamalıdır.

Çıkar Çatışmaları ve İfşa

Tüm finansal destek kaynakları açıklanmalıdır. Tüm yazarlar, çalışmalarını oluşturma sürecinde (varsa) çıkar çatışmasını ifşa etmelidir. Gönderilen bir çalışma için bireylerden veya kurumlardan alınan mali yardımlar veya diğer destekler, Türkiye Parazitoloji Dergisi Yayın Kurulu'na açıklanmalıdır. ICMJE Potansiyel Çıkar Çatışması Bildirim Formu, olası bir çıkar çatışmasını açıklamak için katkıda bulunan tüm yazarlar tarafından doldurulmalı ve gönderilmelidir. Derginin Yayın Kurulu, editörler, yazarlar veya hakemler arasında olası bir çıkar çatışması durumlarında COPE ve ICMJE yönergeleri kapsamında hareket eder.

Mali veya şahsi fayda sağlayan koşullar, bir çıkar çatışması doğurur. Bu durum, bilimsel sürecin ve yayımlanan makalelerin güvenilirliği, bilimsel çalışmaların planlanması, uygulanması, yazılması, değerlendirilmesi, düzenlenmesi ve yayınlanması sırasında çıkar çatışmalarının objektif olarak ele alınması ile doğrudan ilişkilidir.

Finansal ilişkiler en kolay tespit edilen çıkar çatışmalarıdır ve derginin, yazarların ve bilimin güvenilirliğini zedelemesi kaçınılmazdır. Bu çatışmalara bireysel ilişkiler, akademik



YAYIN ETİĞİ

rekabet veya entelektüel yaklaşımlar neden olabilir. Yazarlar, çalışmanın tüm verilerine ulaşmalarını veya makalelerini analiz etme, yorumlama, hazırlama ve yayınlama olanaklarını kısıtlayan kâr veya başka bir avantaj elde etme düşüncesiyle sponsorlarla anlaşmalardan mümkün olduğunca kaçınmalıdır. Editörler, çalışmalarını değerlendirirken aralarında ilişki olabilecek kişileri bir araya getirmekten kaçınmalıdır. Makaleler hakkında nihai kararı verecek olan editörlerin, karar verecekleri konulardan hiçbirisiyle kişisel, mesleki veya mali bağı olmamalıdır. Yazarlar, makalelerinin bağımsız bir değerlendirme süreci ile etik ilkeler çerçevesinde değerlendirilmesini sağlamak için olası çıkar çatışmalarını yayın kuruluna bildirmelidir.

Editörlerden birinin herhangi bir yazıda yazar olması durumunda editör, makale değerlendirme sürecinden çıkarılır. Herhangi bir çıkar çatışmasını önlemek için makale değerlendirme süreci çift- kör olarak yapılmaktadır. Çift- kör değerlendirme sürecinden dolayı Baş Editör dışında hiçbir yayın kurulu üyesine, uluslararası danışma kurulu üyesine veya hakemlere, makalenin yazarları veya yazarların kurumları hakkında bilgi verilmemektedir.

Yayın ekibimiz tüm bu durumları göz önünde bulundurarak değerlendirme sürecinin tarafsız bir şekilde yürütülmesi için özveriyle çalışmaktadır.

Her yazarın imzalaması gereken Çıkar Çatışması Formu makale gönderimi sırasında yüklenmelidir.



ABOUT US

JOURNAL HISTORY

FREE-OF-CHARGE PUBLICATION

ABSTRACTING AND INDEXING

COPYRIGHT

DIGITAL ARCHIVING AND PRESERVATION POLICY

Journal History

Turkish Journal of Parasitology (Türkiye Parazitolojisi Dergisi) is the double-blind peer-reviewed, open access, international publication of Turkish Society for Parasitology since 2004. 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, which was first published in 1978; Since 2004, has been contributing to the international literature with open access on the internet, with articles with high scientific standards published in the form of clinical and experimental research articles, case reports, reviews and letters to the editor on parasitology in the fields of medicine, veterinary and biology.

English Title: Turkish Journal of Parasitology

Turkish title: Türkiye Parazitoloji Dergisi

Official abbreviation: Türkiye Parazitolojisi Dergisi

E-ISSN: 2146-3077

Free-of-Charge Publication

No fee is charged from the authors during the submission, evaluation and publication process. Journal practices, ethical rules, technical information and necessary forms are specified on the journal's web page.

The manuscripts must be submitted via the JournalAgent online article system, represented on the journal website.

Abstracting and Indexing

PubMed/MEDLINE

BIOSIS-Zoological Record

EBSCO Host

Index Copernicus

Gale

ProQuest

CINAHL

BIOSIS Previews Biological Abstracts

CABI

SCOPUS

Embase

J-Gate

TÜBİTAK ULAKBİM TR Dizin

DOAJ

ARDI

GOALI

Hinari

OARE

Turkish Medline

Turkish Citation Index

Copyright

After the publication decision is made and accepted, the "Copyright Transfer Form" should be attached to the submissions. The form can also be downloaded from the journal's article submission system. The Copyright Transfer Form must be signed by all contributing authors and a scanned version of this wet-signed document must be submitted.

By citing the author and the journal at the same time, without any profit-making motive, and only for educational purposes, the readers can copy the article without the permission of the copyright holder.

Turkish Journal of Parasitology is an open access publication, and the journal's publication model is based on Budapest Open Access Initiative (BOAI) declaration (<https://www.budapestopenaccessinitiative.org/read/>). All published content is available online, free of charge at <https://www.turkiyeparazitolojisi.org/>. The journal's content is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC-ND) 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) which permits third parties to share and adapt the content for non-commercial purposes by giving the appropriate credit to the original work.

Digital Archiving and Preservation Policy

Digital preservation is a set of processes and activities that ensure the retrieval and distribution of information now available in digital formats to guarantee long-term, perpetual access. The preservation policy includes the following measures:

Website Archiving

All of the electronic content (website, manuscript, etc.) is stored in three different sources. Content on a server is online and accessible to readers. A copy of the same content is preserved as a backup on two other sources. Should a server fail, other resources can be brought online, and the website is expected to be available in 24-36 hours.

Abstracting/Indexing Services

Our journal's Abstracting/Indexing services store essential information about articles. In addition, some of our journals' Abstracting/Indexing services archive metadata about the article and electronic versions of the articles. In this way, copies of articles are presented to the scientific community through these systems as an alternative to journals.



AIMS AND SCOPE

Turkish Journal of Parasitology (Türkiye Parazitol 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, letters to the editor and video articles 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, EBSCO Host, Index Copernicus, Gale, ProQuest, CINAHL, BIOSIS Previews Biological Abstracts, CABI, SCOPUS, Embase, J-Gate, TÜBİTAK ULAKBİM TR Dizin, DOAJ, ARDI, GOALI, Hinari, OARE, Turkish Medline and Turkish Citation Index.

English Title: Turkish Journal of Parasitology

Turkish title: Türkiye Parazitoloji Dergisi

Official abbreviation: Türkiye Parazitol Derg

E-ISSN: 2146-3077

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.

Author (s) and copyright owner (s) grant access to all users for the articles published in the Turkish Journal of Parasitology as free of charge. Articles may be used provided that they are cited.

Open Access Policy is based on rules of Budapest Open Access Initiative (BOAI) <https://www.budapestopenaccessinitiative.org/read/> . 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.

Turkish Journal of Parasitology not demand any subscription fee, publication fee or similar payment for access to electronic resources.

Creative Commons

A Creative Commons license is a public copyright license that provides free distribution of copyrighted works or studies. Authors use the CC license to transfer the right to use, share or modify their work to third parties. This journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) which permits third parties to share and adapt the content for non-commercial purposes by giving the appropriate credit to the original work.

Open access is an approach that supports interdisciplinary development and encourages collaboration between different disciplines. Therefore, Turkish Journal of Parasitology contributes to the scientific publishing literature by providing more access to its articles and a more transparent review process.

Advertisement Policy

Potential advertisers should contact the Editorial Office. Advertisement images are published only upon the Editor-in-Chief's approval.

Material Disclaimer

Statements or opinions stated in articles published in the journal do not reflect the views of the editors, editorial board and/or publisher; The editors, editorial board and publisher do not accept any responsibility or liability for such materials. All opinions published in the journal belong to the authors.

Contact

Editorial Office

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

Publisher Info

Galenos Publishing House

Address: Molla Gürani Mahallesi Kaçamak Sokak No: 21 34093 Fındıkzade - İstanbul/Turkey

Phone: +90 (212) 621 99 25

Fax: +90 (212) 621 99 27

E-mail: info@galenos.com.tr



INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Instructions for Authors

Turkish Journal of Parasitology (Türkiye Parazitol Derg) is the double-blind peer-reviewed, open access, international publication organ of the Turkish Society for Parasitology. The journal is a quarterly publication, published in 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, letters to the editor and video articles biological, medical and veterinary parasitology.

The editorial and publication process of the Journal of the Turkish Academy of Dermatology 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.

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

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

All those designated as authors should meet all four criteria for authorship, and all who meet the four criteria should be identified as authors. Those who do not meet all four criteria should be acknowledged on 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,



INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

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

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

When submitting a manuscript to the Turkish Journal of Parasitology, authors accept to assign the copyright of their manuscript to the 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 the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) 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, PRISMA guidelines for systematic reviews and meta-analysis, ARRIVE guidelines and Guide for the Care and Use of Laboratory Animals for experimental animal studies and Helsinki Declaration as revised in 2013 for human research.

Manuscripts can only be submitted through the journal's online manuscript submission and evaluation system, available at <http://turkiyeparazitolderg.org/>. 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 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 did not fulfil 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



INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

contributors to medical journals. Br Med J 1983; 7; 1489-93). Information on statistical analyses should be provided with a separate subheading under the Materials and Methods section, and the statistical software that was used during the process must be specified.

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

Editorial Comments: Editorial comments aim to provide a brief critical commentary by reviewers with expertise or with a 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.

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 labelled (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 should also 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 the 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 shortcomings of original articles should be mentioned in the Discussion section before the conclusion paragraph.

References

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

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



INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

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

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

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

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

Manuscripts Accepted for Publication, Not Published Yet: Slots J. The microflora of black stain on primary human 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>.

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 cancelled. 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.

Editorial Office

Editor in Chief: Yusuf Özbel, MD, Prof

Address: Ege University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, 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

Publisher Info

Galenos Publishing House

Address: Molla Gürani Mahallesi Kaçamak Sokak

No: 21 34093 Fındıkzade - İstanbul/Turkey

Phone: +90 (212) 621 99 25

Fax: +90 (212) 621 99 27

E-mail: info@galenos.com.tr



ETHICAL POLICY

Peer Review, Publication Ethics and Malpractice Statement

Peer- Review

Submission is considered on the conditions that papers are previously unpublished and are not offered simultaneously elsewhere; that authors have read and approved the content, and all authors have also declared all competing interests; and that the work complies with the Ethical Approval and has been conducted under internationally accepted ethical standards. If ethical misconduct is suspected, the Editorial Board will act in accordance with the relevant international rules of publication ethics (i.e., COPE guidelines).

Editorial policies of the journal are conducted as stated in the rules recommended by the Council of Science Editors and reflected in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication (<http://www.icmje.org/>). Accordingly, authors, reviewers, and editors are expected to adhere to the best practice guidelines on ethical behavior contained in this statement.

Submitted manuscripts are subjected to double-blinded peer-review. The scientific board guiding the selection of the papers to be published in the journal consists of elected specialists of the journal and, if necessary, selected from national and international experts in the relevant field of research. All manuscripts are reviewed by the editor, section associate editors and at least three internal and external expert reviewers. All research articles are interpreted by a statistical editor as well.

Human and Animal Rights

For the experimental, clinical and drug human studies, approval by ethical committee and a statement on the adherence of the study protocol to the international agreements (World Medical Association Association of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects," amended October 2013, www.wma.net) are required. In experimental animal studies, the authors should indicate that the procedures followed were by animal rights (Guide for the care and use of laboratory animals, www.nap.edu/catalog/5140.html), and they should obtain animal ethics committee approval. The Ethics Committee approval document should be submitted to the Turkish Journal of Parasitology together with the manuscript.

The approval of the ethics committee, statement on the adherence to international guidelines mentioned above and that the patient's informed consent is obtained should be indicated in the 'Material and Method' section and is required for case reports whenever data/media used could reveal the identity of the patient. The declaration of the conflict of interest between authors, institutions, acknowledgement of any financial or material support, aid is mandatory for authors submitting a manuscript, and the statement should appear at the end of the manuscript. Reviewers are required to report if any potential conflict of interest exists between the reviewer and authors, institutions.

Plagiarism and Ethical Misconduct

This journal uses "iThenticate" to screen all submissions for plagiarism before publication.

It is essential that authors avoid all forms of plagiarism and ethical misconduct as represented below.

Plagiarism: To Republish whole or part of a content in another author's publication without attribution.

Fabrication: To publish data and findings/results that do not exist.

Duplication: Using data from another publication that includes republishing an article in different languages.

Salamisation: Creating multiple publications by supernaturally splitting the results of a study.

Data Manipulation/Falsification: Manipulating or deliberately distorting research data to give a false impression.

We disapprove of such unethical practices as plagiarism, fabrication, duplication, data manipulation/falsification and salamisation and efforts to influence the review process with such practices as gifting authorship, inappropriate acknowledgements, and references in line with the COPE flowcharts. ([hperlink](https://publicationethics.org/guidance/Flowcharts)) <https://publicationethics.org/guidance/Flowcharts>

Submitted manuscripts are also subjected to the evaluation of plagiarism, duplicate publication by automatic software. Authors are obliged to acknowledge if they published study results in whole or in part in the form of abstracts.

DUTIES OF PUBLISHER:

Handling of unethical publishing behaviour

The publisher will take all appropriate measures to modify the article in question, in close cooperation with the editors, in cases of alleged or proven scientific misconduct, fraudulent publication, or plagiarism. This includes the prompt publication of an erratum, disclosure, or retraction of the affected work in the most severe case. Together with the editors, the publisher will take reasonable steps to detect and prevent the publication of articles in which research misconduct occurs and will under no circumstances promote or knowingly allow such abuse to occur.

Editorial Autonomy

Turkish Journal of Parasitology is committed to ensuring the autonomy of editorial decisions without influence from anyone or commercial partners.

Intellectual Property and Copyright

Turkish Journal of Parasitology protects the property and copyright of the articles published in the journal and maintains each article's published version of the record. The journal provides the integrity and transparency of each published article.

Scientific Misconduct

Turkish Journal of Parasitology's publisher always takes all appropriate measures regarding fraudulent publication or plagiarism.



ETHICAL POLICY

DUTIES OF EDITORS:

Decision on Publication and Responsibility

The editor of the journal keeps under control everything in the journal and strives to meet the needs of readers and authors. The editor is also responsible for deciding which articles submitted to the journal should be published and guided by the policies subjected to legal requirements regarding libel, copyright infringement, and plagiarism. The editor might discuss with reviewers while making publication decisions. The editor is responsible for the contents and overall quality of the publication. Editor ought to provide a fair and appropriate peer-review process.

Objectivity

Articles that are submitted to the journal are always evaluated without any prejudice.

Confidentiality

The editor must not disclose any information about a submitted article to anyone other than editorial staff, reviewers, and publisher.

Conflicts of Interest and Disclosure

Turkish Journal of Parasitology does not allow any conflicts of interest between the parties such as authors, reviewers and editors. Unpublished materials in a submitted article must not be used by anyone without the express written assent of the author.

Fundamental Errors in Published Works

Authors are obliged to notify the journal's editors or publisher immediately and to cooperate with them to correct or retract the article if significant errors or inaccuracies are detected in the published work. If the editors or publisher learn from a third party that a published work contains a material error or inaccuracy, the authors must promptly correct or retract the article or provide the journal editors with evidence of the accuracy of the article.

DUTIES OF REVIEWERS:

Evaluation

Reviewers evaluate manuscripts without origin, gender, sexual orientation or political philosophy of the authors. Reviewers also ensure a fair blind peer review of the submitted manuscripts for evaluation.

Confidentiality

All the information relative to submitted articles is kept confidential. The reviewers must not be discussed with others except if authorized by the editor.

Disclosure and Conflict of Interest

The reviewers have no conflict of interest regarding parties such as authors, funders, editors, etc.

Contribution to editor

Reviewers help the editor in making decisions and may also assist the author in improving the manuscript.

Objectivity

They always do objective judgment evaluation. The reviewers express their views clearly with appropriate supporting arguments.

Acknowledgement of Sources

Reviewers ought to identify a relevant published study that the authors have not cited. Reviewers also call to the editor's attention any substantial similarity or overlap between the manuscript and any other published paper of which they have personal knowledge.

DUTIES OF AUTHORS:

Reporting Standards

A submitted manuscript should be original, and the authors ensure that the manuscript has never been published previously in any journal. Data of the research ought to be represented literally in the article. A manuscript ought to include adequate detail and references to allow others to replicate the study.

Originality

The authors who want to submit their study to the journal must ensure that their study is entirely original. The words and sentences getting from the literature should be appropriately cited.

Multiple Publications

Authors should not submit the same study for publishing in any other journals. Simultaneous submission of the same study to more than one journal is unacceptable and constitutes unethical behaviour.

Acknowledgement of Sources

Convenient acknowledgement of the study of others has to be given. Authors ought to cite publications that have been efficient in determining the study. All of the sources that used the process of the study should be remarked.

Authorship of a Paper

Authorship of a paper ought to be limited to those who have made a noteworthy contribution to the study. If others have participated in the research, they should be listed as contributors. Authorship also includes a corresponding author who is in communication with the editor of a journal. The corresponding author should ensure that all appropriate co-authors are included in a paper.

Disclosure and Conflicts of Interest

All sources of financial support should be disclosed. All authors ought to disclose a meaningful conflict of interest in the process of forming their study. Any financial grants or other support received for a submitted study from individuals or institutions should be disclosed to the Editorial Board of the Turkish Journal of Parasitology. The ICMJE Potential Conflict of Interest Disclosure Form should be filled in and submitted by all contributing authors to disclose a potential conflict of interest. The journal's Editorial Board determines cases of a potential conflict of interest of the editors,

ETHICAL POLICY

authors, or reviewers within the scope of COPE and ICMJE guidelines.

Conditions that provide financial or personal benefit bring about a conflict of interest. The reliability of the scientific process and the published articles is directly related to the objective consideration of conflicts of interest during the planning, implementation, writing, evaluation, editing, and publication of scientific studies.

Financial relations are the most easily identified conflicts of interest, and it is inevitable that they will undermine the credibility of the journal, the authors, and the science. These conflicts can be caused by individual relations, academic competition, or intellectual approaches. The authors should refrain as much as possible from making agreements with sponsors in the opinion of gaining profit or any other advantage that restrict their ability to access all data of the study or analyze, interpret, prepare, and publish their articles. In order to prevent conflicts of interest, editors should refrain from bringing together those who may have any relationship between them during the evaluation of the studies. The editors, who make the final decision about

the articles, should not have any personal, professional or financial ties with any of the issues they are going to decide. Authors should inform the editorial board concerning potential conflicts of interest to ensure that their articles will be evaluated within the framework of ethical principles through an independent assessment process.

If one of the editors is an author in any manuscript, the editor is excluded from the manuscript evaluation process. In order to prevent any conflict of interest, the article evaluation process is carried out as double-blinded. Because of the double-blinded evaluation process, except for the Editor-in-Chief, none of the editorial board members, international advisory board members, or reviewers is informed about the authors of the manuscript or institutions of the authors.

Our publication team works devotedly to ensuring that the evaluation process is conducted impartially, considering all these situations.

The conflict of interest form that each author has to sign must be uploaded during the manuscript submission.



İÇİNDEKİLER/CONTENTS

ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / ORIGINAL INVESTIGATIONS

- 271** Denizli İl Merkezindeki İçme Sularında ve Çevresel Sulara Protozoon Parazitlerinin Varlığı
The Presence of Protozoan Parasites in Drinking Waters and Environmental Waters in Denizli City Center
Tuğba Sağlam, Serdar Düşen, Ülkü Karaman, Ergun Mete; Bolu, Denizli, Ordu, Türkiye
- 276** Investigation of *Pneumocystis jirovecii* in Lung Cancer Patients with the Nested PCR Method
Akciğer Kanseri Hastalarında Pneumocystis jirovecii'nin Nested PZR Yöntemi ile Araştırılması
Ahmed Galip Halidi, Merhamet Ölçen, Esra Gürbüz, Abdurrahman Ekici, Selahattin Aydemir, Hasan Yılmaz; Muş, Şanlıurfa, Van, Turkey
- 281** Endoskopi ve Kolonoskopi Yapılan Hastalarda *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* ve *Cryptosporidium* spp. Varlığının Araştırılması
Investigation of the Presence of Entamoeba histolytica, Giardia intestinalis and Cryptosporidium spp. in Patients Who Undergone Endoscopy and Colonoscopy
Mehmet Tugay Eren, Serpil Değerli, Özlem Yöner; Sivas, Türkiye
- 288** Investigation of *Toxoplasma gondii* Seropositivity in Pregnant Women in Kastamonu Province, Turkey
Kastamonu İlindeki Gebelerde Toxoplasma gondii Seropozitifliğinin Araştırılması
Enis Fuat Tüfekci, Melike Yaşar Duman, Büşra Çalışır, Çetin Kılıç, Ahmet Uzel; Kastamonu, Turkey
- 293** Molecular Survey of *Anaplasma phagocytophilum* and Related Strains in Sheep and Goats from Sivas; with a High Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*-like 1
Sivas Koyun ve Keçilerinde Anaplasma phagocytophilum ve Suşlarının Moleküler Yöntemlerle Araştırılması; Anaplasma phagocytophilum-like-1'in Yüksek Prevalansı
Ufuk Erol, Ömer Faruk Şahin, Kürşat Altay; Sivas, Turkey
- 301** Evaluation of Aerobic Conjunctival Flora in Patients with *Demodex* Blepharitis
Demodex Blefaritli Hastalarda Aerobik Konjonktival Floranın Değerlendirilmesi
Ayten Gündüz, Ersan Ersin Demirel, Murat Fırat; Malatya, Turkey
- 307** Allele Specific Polymerase Chain Reaction (AS-PCR) Assay to Detect Knockdown and Acetylcholinesterase Mutations in *Anopheles superpictus*
Anopheles superpictus'ta Knockdown ve Asetilkolinesteraz Mutasyonlarının Belirlenmesinde Allel Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (AS-PCR) Kullanılması
Sare İlknur Yavaşoğlu, Fatih Mehmet Şimşek; Aydın, Turkey
- 312** Molecular Characterization and Expression Analysis of the Sterol-carrier Protein-2 Fragment in *Anopheles sacharovi* Generations
Anopheles sacharovi Nesillerinde Sterol Taşıyıcı Protein-2 Fragmanının Moleküler Karakterizasyonu ve Ekspresyon Analizleri
Sümeyye Aygün, Önder Düzlü, Alparslan Yıldırım; Kayseri, Türkiye
- 322** Petek Güvesi Larvalarına Karşı Bazı Bitkisel Uçucu Yağların ve Entomopatojenik Mantarın Laboratuvar Koşullarında Denenmesi
Experimentation of Essential Oils and Entomopathogenic Fungi Against Wax Moth Larvae in Laboratory Conditions
Ahmet Onur Girişgin, Nurgül Çimenlikaya, Levent Aydın, Suna Aslı Zengin; Bursa, İstanbul, Türkiye
- 327** Effect of Education and Regular Examination on the Prevalence of Head Louse Infestations in Adana
Adana'da Eğitim ve Düzenli Muayenenin Baş Biti Enfestasyonlarının Prevalansına Olan Etkisi
Hakan Kavur, Halil Özkurt, Fatma Büyükkatran, Gülşah Evyapan, Sümeyye Kalkan, Zehra Çelik, Emine Kurcan, Duran Ali Karataş, Davut Alptekin; Adana, Van, Turkey



İÇİNDEKİLER/CONTENS

- 334** Adjunctive Agent for Treating Scabies: *In vitro* Killing Activity of Permethrin and Tea Tree Oil on *Sarcoptes scabiei* Collected from Patients
Skabiyes Tedavisinde Yardımcı Bir Ajan: Skabiyes Hastalarından Alınan Sarcoptes scabiei Paraziti Üzerinde Permetrin ve Çay Ağacı Yağının İn vitro Öldürme Aktivitesi
 Aslan Yürekli; Aydın, Turkey

OLGU SUNUMU / CASE REPORT

- 339** Kurban Bayramı'nda Endemik Olmayan Bir İlde Saptanan İki Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Olgusu
Two Cases of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Detected in a Non-endemic Feast of Sacrifice
 Ali Gümüş, Merve Sefa Sayar, Ali Asan; Bursa, Türkiye

DERLEME / REVIEW

- 342** Toksoplazmozise Karşı Geliştirilen Biyoteknolojik Tabanlı Rekombinant Protein Aşıları
Biotechnological Based Recombinant Protein Vaccines Developed Against Toxoplasmosis
 Tuğba Karakavuk, Ceren Gül, Muhammet Karakavuk, Aytül Gül, Sedef Erkunt Alak, Hüseyin Can, Cemal Ün, Mert Döşkaya, Adnan Yüksel Gürüz, Aysu Değirmenci Döşkaya; İzmir, Türkiye

EDİTÖRE MEKTUPLAR / LETTERS TO THE EDITOR

- 358** Malacological Epidemiology of *Opisthorchis* spp. and Sewage Viral Epidemiology of SARS-CoV-2: Interrelationship in Big City
Opisthorchis spp. Malakolojik Epidemiyoloji ve SARS-CoV-2'nin Kanalizasyon Viral Epidemiyolojisi: Büyük Şehirde Karşılıklı İlişki
 Pathum Sookaromdee, Viroj Wiwanitkit; Bangkok, Thailand; Pune, India
- 360** Golgi-to-endosome Protein Pathway, Monkeypox and Malaria: Correspondence
Golgi-endozom Proteini Patika, Maymun Hastalığı ve Sıtma: Uygunluk
 Rujittika Mungmunpuntipantip, Viroj Wiwanitkit; Bangkok, Thailand; Pune, India

2022 İNDEKS / 2022 INDEX

2022 Hakem Dizini - 2022 Referee Index
 2022 Yazar Dizini - 2022 Author Index
 2022 Konu Dizini - 2022 Subject Index



Denizli İl Merkezindeki İçme Sularında ve Çevresel Sulara Protozoon Parazitlerinin Varlığı

The Presence of Protozoan Parasites in Drinking Waters and Environmental Waters in Denizli City Center

İD Tuğba Sağlam¹, İD Serdar Düşen², İD Ülkü Karaman³, İD Ergun Mete⁴

¹Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bolu, Türkiye

²Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Denizli, Türkiye

³Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

⁴Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye

Cite this article as: Sağlam T, Düşen S, Karaman Ü, Mete E. The Presence of Protozoan Parasites in Drinking Waters and Environmental Waters in Denizli City Center. Türkiye Parazitol Derg 2022;46(4):271-5.

Öz

Amaç: Bu çalışmada, Denizli il merkezindeki tarımsal sulama ve içme suyu kaynaklarında protozoon parazitlerinin varlığı ilk kez detaylı olarak incelenmiştir.

Yöntemler: Araştırma, Ekim 2017-Ekim 2018 tarihleri arasında yapılmıştır ve Denizli il merkezinden belirlenen yedi farklı istasyondan toplam 84 adet su örneği alınmıştır. Örnekler direkt bakı (Native-Lugol) ile incelendikten sonra kinyonun asit fast, giemsa ve trichrome boyaları ile boyanmıştır. Preparatlar ışık mikroskobunda parazitolojik açıdan değerlendirilmiştir.

Bulgular: Çalışma süresince toplanan 36 tarımsal sulama suyu örneğinin 21'inde (%25) *Cryptosporidium* spp., 5 örnekte (%5,95) *Cyclospora cayetanensis* ve 12 örnekte (%14,28) *Giardia* spp. tespit edilmiştir. Toplanan 48 içme suyu örneğinde ise parazit bulgusuna rastlanılmamıştır.

Sonuç: Örnek alınan istasyonlarda hayvancılığın ve tarımın yaygın olarak yapılarak otlak alanı olarak kullanılması, evsel atık suların hiçbir işleme tabii tutulmadan bu sulara karışması ve mevsimsel şartlar tespit edilen protozoon parazitlerin belirli dönemlerde fazla görülmesine neden olmaktadır. Halk sağlığı ve çevre hayvancılığı açısından gerekli önemlerin alınması ile ileride oluşabilecek su kaynaklı protozoon enfeksiyonların önemli ölçüde engellenebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, Denizli, *Giardia* spp., halk sağlığı

ABSTRACT

Objective: The presence of protozoan parasites in agricultural irrigation and drinking water resources at Denizli city center was investigated in detail for the first time.

Methods: The research was carried out between October 2017 and October 2018 and 84 water samples were taken from 7 different stations identified from the Denizli city center. After examining the samples by direct visualization (Native-Lugol), they were stained with quinton's acid fast, giemsa and trichrome dyes. The preparations were evaluated parasitologically under a light microscope.

Results: *Cryptosporidium* spp. was detected in 21 (25%) of 36 agricultural irrigation water samples collected during the study, *Cyclospora cayetanensis* in 5 samples (5.95%) and *Giardia* spp. in 12 samples (14.28%). No parasite findings were found in any of the 48 drinking water samples collected.

Conclusion: The widespread use of animal husbandry and agriculture as grazing land in the sampling stations, the mixing of domestic wastewater into these waters without any treatment, and seasonal conditions cause the protozoan parasites to be seen more in certain periods. It is thought that waterborne protozoan infections that may occur in the future can be significantly prevented by taking the necessary precautions in terms of public health and environmental animal husbandry.

Keywords: *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, Denizli, *Giardia* spp., public health



Geliş Tarihi/Received: 16.11.2021 Kabul Tarihi/Accepted: 25.05.2022

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Tuğba Sağlam, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bolu, Türkiye
Tel/Phone: +90 507 867 96 67 E-Posta/E-mail: tugbasaglam32@hotmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0003-1654-2261

GİRİŞ

Yaşamımızın vazgeçilmezi olan su, taşıyabileceği çeşitli organik-inorganik maddeler ve mikroorganizmalar ile birçok hastalığa neden olmaktadır (1). Türkiye’de ve dünyada bağırsak parazitleri önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bu parazitlerin görülme sıklığını ise sosyo-ekonomik ve eğitim düzeyinin düşüklüğü, iklim ve çevre koşulları, beslenme alışkanlıklarının parazitin yaşama, üreme ve bulaşmasına uygun olması ve benzer faktörlerin artırdığı bilinmektedir (2). Hastalıklı veya hastalığı taşıyan insan ve hayvan dışkısı ile çevreye bırakılan parazitik oookistler ve/veya kistlerin çevresel sulara ve dolaylı olarak içme sularına karışarak parazitik enfeksiyonlara neden olmaktadır (3-6). Parazitler hastalıklar genellikle asemptomatik veya atipik, bulgularla seyreden bağırsak parazitizmaları, zihinsel ve bedensel gelişme geriliğinin yanı sıra işgücü kaybına neden olarak halk sağlığını ve ülke ekonomisini olumsuz yönden etkilemektedir (7). Hızlıca artan nüfus, gelişen sanayileşme ve atık suların baraj, göl ve derelere karışması ise su kirliliğini hızlandırmaktadır (8). Türkiye’de sulardan bulaşan protozoon parazitlerin tespiti ve bulaşma yolu ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Denizli ilinde ise Sağlam ve ark.’nın (9) 2015 yılında yapmış olduğu bir ön çalışma haricinde içme ve kullanma sularında parazitlerin araştırıldığı çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada Denizli il merkezinde yer alan tarımsal sulama ve içme suyu kaynaklarında sucül protozoonların belirlenmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Araştırmada Ekim 2017-Ekim 2018 tarihleri arasında belirlenen 7 farklı istasyondan (Şekil 1) 10’ar litrelik tek kullanımlık plastik bidonlar ile toplamda 84 su örneği alınmıştır. Su örneklerine 10 mL alüminyum sülfat $Al_2(SO_4)_3$ eklenerek pH 5,4-5,8 olacak şekilde ayarlanmıştır. Çökeltmenin gerçekleşmesi için örnekler yaklaşık 20-24 saat karanlık koşulda oda sıcaklığında bekletilmiştir. Örneklerin üst kısmındaki süpernatant 1 L kalana kadar atılmıştır ve daha sonra 2,100 rpm’de 4 °C’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı atılarak 50 mL’lik pellet kullanılıncaya kadar +4 °C’deki buzdolabında saklanmıştır.

Santrifüj işleminden sonra elde edilen 50 mL’lik pelletten yayma preparatlar hazırlanarak önce direkt bakı (Native-Lugol) ile incelendikten sonra kinyonun asit fast ve trichrome boyaları ile boyanmıştır. Preparatlar ışık mikroskopunda parazitolojik açıdan değerlendirilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Protozoon varlığı açısından pozitifliği saptanan örnekler için, hem istasyonlarda bulunma yoğunluğuna göre hem de mevsimsel olarak yoğunluklarına göre yüzde hesaplaması yapılmıştır (Tablo 1 ve 2, Şekil 1-3).

BULGULAR

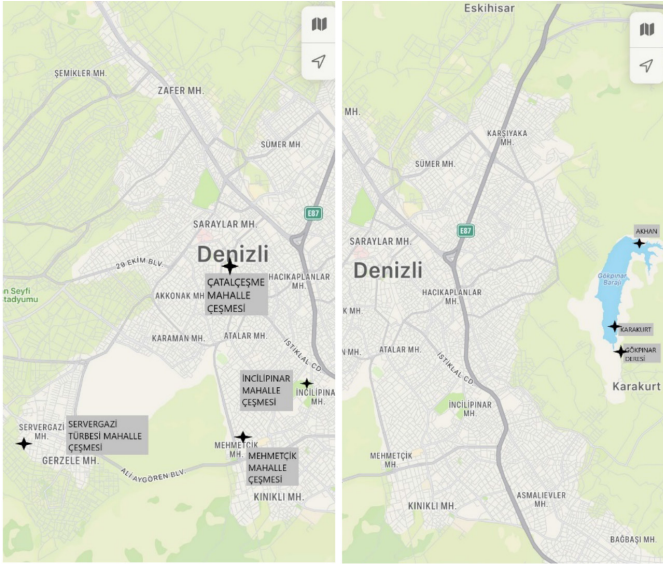
Çalışmada incelenen 84 su örneğinin 36’sı tarımsal sulamada kullanılan su, 48’i de içme suyu olup; direkt bakı (Native-Lugol)

Tablo 1. Trichrome ve direkt bakı (Native-Lugol) ile tespit edilen *Giardia spp.*’nin istasyonlara göre dağılımı

Örnek alınan bölge	Belirlenen istasyonlar	İncelenen örnek sayısı	Trichrome boyama ile <i>Giardia spp.</i> pozitif örnek sayısı (n) (%)	Native-Lugol ile <i>Giardia spp.</i> pozitif örnek sayısı (n) (%)
Mahalle çeşmeleri	Bütün	48	0	0
Ara toplam pozitif	istasyonlar	48	%0	%0
Tarımsal sulamada kullanılan sular (Vali Recep Yazıcıoğlu Barajı)	Gökpınar deresi	12	1	0
	Karakurt	12	6	7
	Akhan	12	5	5
Ara toplam Pozitif		36	12 %33,33	12 %33,33
Genel toplam Pozitif		84	12 %14,28	12 %14,28

Tablo 2. Kinyonun asit-fast boyama ile tespit edilen *Cryptosporidium spp.* ve *Cyclospora cayatensis*’in istasyonlara göre dağılımı

Örnek alınan bölge	Belirlenen istasyonlar	İncelenen örnek sayısı	Pozitif saptanan <i>Cryptosporidium spp.</i> örnek sayısı (n) (%)	Pozitif saptanan <i>Cyclospora cayatensis</i> örnek sayısı (n) (%)
Mahalle çeşmeleri	Bütün	48	0	0
Ara toplam pozitif	istasyonlar	48	%0	%0
Tarımsal Sulamada Kullanılan Sular (Vali Recep Yazıcıoğlu Barajı)	Gökpınar deresi	12	3	0
	Karakurt	12	9	2
	Akhan	12	9	3
Ara toplam Pozitif		36	21 %58,33	5 %13,88
Genel toplam Pozitif		84	21 %25	5 %5,95

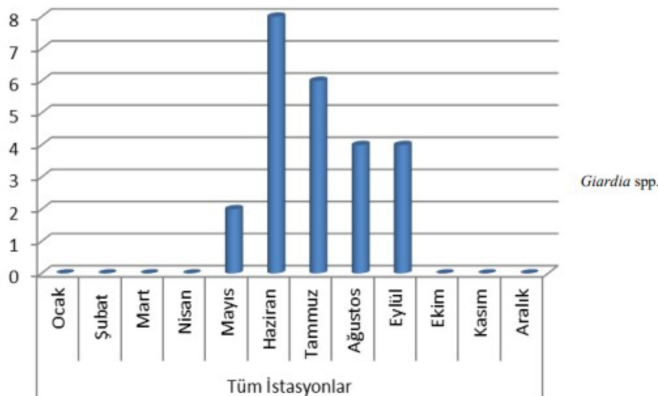


Şekil 1. Denizli il merkezinde belirlenen istasyonlar

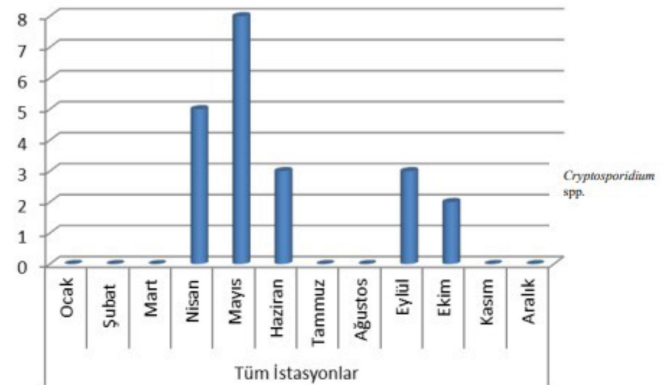
ve trichrome boyama ile 12 örnekte (%14,28) *Giardia* spp. tespit edilmiştir. Kinyonun asit fast boyama ile toplanan 84 su örneğinin 21'inde (%25) *Cryptosporidium* spp. ve 5'inde (%5,95) *Cyclospora cayatensis* varlığı tespit edilmiştir. Tespit edilen bütün parazitler tarımsal amaçlı kullanılan sularda tespit edilirken mahalle çeşmelerinden toplanan 48 içme suyunda hiçbir parazit örneğine rastlanılmamıştır. Tespit edilen parazitlerin istasyonlara göre dağılımlar Tablo 1 ve 2'de, mevsimsel olarak dağılımları da Şekil 2,3,4'te verilmiştir.

TARTIŞMA

Dünyada ki içme suyu kaynaklarının her geçen gün azalması ve buna rağmen gün geçtikçe artan nüfus yoğunluğu, kullanılabilir su kaynaklarının daha dikkatli ve titiz kullanılmasını gerektirmektedir. Suyla bulaşan enfeksiyonların önüne geçilmesi için ise, suların büyük ölçüde hem bakteriyel hem de parazitik kontaminasyonda olabildiğince engellenmesi gerekmektedir (10). Bu çalışmada, Ekim 2017-Ekim 2018 tarihleri arasında Denizli il merkezinde belirlenen 7 istasyondan toplanan su örneklerinin incelenmesi sonucunda; *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. ve *Cyclospora cayatensis* tespit edilmiştir.

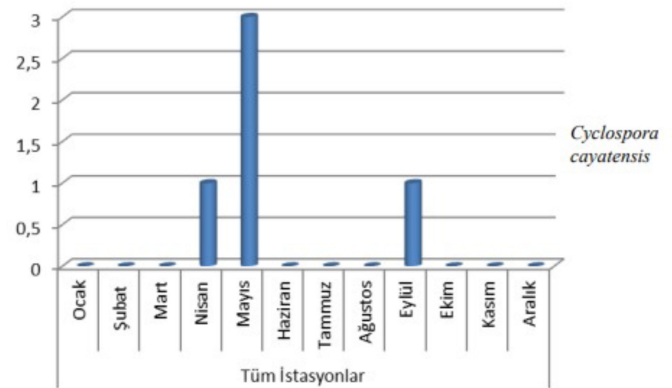


Şekil 3. Tüm istasyonlardan tespit edilen *Giardia* spp.'nin aylara göre dağılımı



Şekil 2. Tüm istasyonlardan tespit edilen *Cryptosporidium* spp. ookistinin aylara göre dağılımı

Ayaz (6) tarafından yapılan bir çalışmada, Giresun ve Samsun illerinde bulunan su kaynaklarından DNA izole ederek Nested PZR ile 18S rRNA geni, ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP) yöntemiyle SAM-1 hedef geni kullanılarak *Cryptosporidium* varlığının araştırıldığı bir çalışmada içme suyu örneklerinin hiçbirinde *Cryptosporidium* DNA'sına rastlanmamıştır. Ancak 420 çevresel su örneğinde *Cryptosporidium* DNA'sı tespit edilmiştir [Ayaz (6)]. Mevcut çalışmamızda da benzer olarak kinyonun asit fast boyama ile 21 örnekte (%25) *Cryptosporidium* spp. tespit edilmiş ancak içme sularında parazite rastlanılmamıştır. Ayrıca Ayaz (6) *Cryptosporidium* spp. ookist yoğunluğunun mevsimsel dağılımı açısından İlkbahar aylarında (Mart, Nisan ve Mayıs) artış gösterdiğini bildirmiştir. Sunulan çalışmada da İlkbahar (Nisan, Mayıs) ve yaz mevsiminin ilk ayı Haziran ayında artış olmuştur (Şekil 2). Haziran ayındaki parazit artış sebebinin ise, Denizli ilindeki iklim şartlarından, büyükbaş ve küçükbaş hayvancılığın yoğun yapıldığı bölgelerin su kaynaklarına yakın alanlarda olması ve hayvan atıklarının bu sulara bulaşma ihtimalinin yüksek olmasından, örnek alınan bölgede yer alan mahallelerin atık su ve kanalizasyon sularının baraj sularına karışmış olabilesinden kaynaklanmış olabileceği öngörülmektedir. Mevcut parazitlerin yaşam döngüsü de dikkate alındığında, bahar aylarında hava sıcaklığının artışı ve nemin fazla olması parazitin ookist sayısını önemli derecede artırabileceği düşünülmektedir. Wilkes ve ark. (11), tarım arazileri ile zengin olan bölgelerdeki çevresel sularda *Cryptosporidium* ookisti, *Giardia* kisti, patojenik bakteriler ve indikatör bakteriler arasındaki mevsimsel ilişkileri incelemişlerdi



Şekil 4. Tüm istasyonlardan tespit edilen *Cyclospora cayatensis*'in aylara göre dağılımı

ve sonbahar ve kış mevsimlerinde indikatör bakterilerle beraber parazitlerin sayılarında artış olduğunu tespit etmişlerdir (11). Sağlam ve ark. (12) Eğirdir Gölü'nde (Isparta) *Cryptosporidium* spp. ve *Giardia* spp. parazitlerinin varlığını mevsimsel açıdan değerlendirmişlerdir. Çalışmada mevsimsel olarak en fazla yaz aylarında ortalama %99,2 yoğunluk ile *Cryptosporidium* spp., ve %93,3 yoğunluk ile *Giardia* spp. varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca, çalışmada sonbahar ve kış aylarında da parazitlerin yine yoğun bir şekilde tespit edildiği bildirilmiştir (12). Sunulan çalışmada da benzer olarak *Cryptosporidium* spp. ookistleri Sonbahar (Eylül, Ekim) mevsiminde artış göstermiştir (Şekil 2).

Giresun ve Samsun illerinde *Giardia* spp. pozitifliğinin araştırıldığı bir çalışmada çevresel ve içme suyu örneklerinden DNA izole edilerek Nested PZR ile 18S rRNA geni, Semi Nested PZR ile GDH hedef geni ve LAMP metotlarıyla parazitin varlığını araştırılmıştır. Çalışmada Samsun ve Giresun illerinden alınan içme suyu örneklerinin hiçbirinde *Giardia* DNA'sı tespit edilemezken 420 çevresel su örneğinde ise *Giardia* DNA'sı tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde yağışlara paralel olarak parazit kist yoğunluğunun arttığı veya azaldığı da bildirilmiştir (13). Castro-Hermida ve ark. (14), 2007 yılında ilkbahar-yaz-sonbahar-kış mevsimlerinde İspanya'da belirledikleri 22 farklı lokasyondan, 50 L'lik su örnekleri toplamışlardır ve ve suları parazit varlığı açısından incelemişlerdir. Çalışma sonucunda su örneklerindeki *Cryptosporidium* ookist miktarı ve *Giardia* kist miktarının sonbahar ve kış aylarına göre bahar ve yaz aylarında çok yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (14). Mevsimsel olarak, giyardiyoisin yazları ve erken sonbaharda daha fazla görüldüğünü ve hastalığın belli derecede mevsimsel karakter taşıdığı bildirmiştir. Ancak giyardiyoisin mevsim ile olan ilişkisi tam olarak aydınlatılamamıştır (13). Mevcut çalışmada da parazit kist yoğunluğu mevsimsel olarak benzerlik göstermektedir. Şekil 3'te *Giardia* spp. kistlerinin aylara göre dağılımı verilmiştir. Amerika'da Chicago Hastanesi'nde 1990 yılındaki bir salgında 21 personelde *Cyclospora cayatensis* saptanmış ve kaynak olarak da personelin yatahanesinde kullandığı su gösterilmiştir (15). Karaman ve ark. (2) Samsun ilinden alınan 228 su örneğini direkt baki, kinyonun asit fast, modifiye trichrome ve trichrome boyaları ile incelemişlerdir. Çalışma sonucunda 142 *Giardia* sp., 132 *Cryptosporidium* spp., 56 *Cyclospora* spp., 38 *Microsporidia*, 47 *Blastocystis* spp., 38 *Entamoeba coli* kisti, 18 *Dientamoeba*, 9 *Chilomastix*, 9 *Strongyloides* spp., ve 6 kancalı kurt tespit etmişlerdir (2).

Bu çalışmada da Denizli ilindeki tarımsal sulama sularında *Cyclospora cayatensis* varlığı tespit edilmiştir. *Cyclosporiasis*te mevsimsel bir döngü olduğu da düşünülmektedir. Türkiye'de özellikle yağmurların çok yağdığı yağışlı mevsimlerde parazit yoğunluğunda önemli artışların yaşandığı da bildirilmiştir (16). Şekil 4'te *Cyclospora cayatensis*'in aylara göre dağılımı verilmiştir. Bu veriye göre İlkbahar ayları (Nisan, Mayıs) ve Sonbahar mevsiminin Eylül ayında, yani mevsimsel olarak yağışların bol olduğu dönemlerde Denizli il merkezindeki tarımsal sulama amaçlı kullanılan sularda bu parazitin varlığı tespit edilmiştir.

SONUÇ

Çalışmamız sonucunda tarımsal sulama amaçlı kullanılan suların bölgedeki yerleşim yerlerinin evsel atık suları ve kanalizasyon sularının hiçbir işleme tabi tutulmadan baraj suyuna karıştığı saptanmıştır. Ayrıca çalışmanın yapıldığı ilde akarsuların günlük

ihtiyacı karşılamak ve tarımsal amaçlı sulamada da kullanıldığı belirlenmiştir. Bölgede atık su arıtım tesislerinin yetersizliği de düşünüldüğünde kontamine olmuş sular aracılığıyla parazitlerin bulaş riskinin artabileceği sonucuna varılmıştır. Bu doğrultuda çalışmamızın yapıldığı bölgede insanlardaki ve hayvanlardaki parazit epidemiyolojisinin belirlenmesine yönelik çalışmaların planlanması ve elde edilen bulgulara göre parazitlerden korunma yolları ile ilgili programların yapılması gerektiği önerileri sunulmuştur.

*Etik

Etik Kurul Onayı: Sularda çalışıldığı için etik kurul onayı gerekmemektedir.

Hasta Onayı: Sularda çalışıldığı için hasta onay bilgisi gerekmemektedir.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulunda olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

*Yazarlık Katkıları

Konsept: T.S., S.D., Ü.K., Dizayn: T.S., S.D., Ü.K., Veri Toplama veya İşleme: T.S., Analiz veya Yorumlama: T.S., S.D., Ü.K., E.M., Literatür Arama: T.S., Yazan: T.S., S.D., Ü.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından 017FE067 numaralı proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Miman Ö, Aktepe OC. İçme Sularında Protozoon Parazitlerin Dezenfeksiyonu. Kocatepe Tıp Dergisi 2008; 9: 31-5.
2. Karaman Ü, Kolören Z, Seferoğlu O, Ayaz E, Demirel E. Samsun il ve ilçelerinden alınan çevresel sularda parazitlerin varlığı. Türkiye Parazit Derg 2017; 41: 19-21.
3. Bilgehan H. Klinik mikrobiyoloji özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları. 10. basım. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi: İzmir; 2000.p.1-704.
4. Yousefi RA. Ankara'nın bazı bölgelerindeki yer altı sularında enterik bakterilerin aranması. MSc Dissertation, Hacettepe Üniversitesi, 1991.
5. Aysal S. Isparta bölgesindeki çeşitli su kaynaklarında *Cryptosporidium parvum*, *Giardia intestinalis*, Enterohemorrajik *E. coli* ve diğer Entero Patojenlerin Araştırılması. MSc Dissertation. Süleyman Demirel Üniversitesi, 2004.
6. Ayaz E. Samsun ve Giresun illerinden alınan su örneklerinde *Cryptosporidium parvum*'un moleküler teknikler kullanılarak tespit edilmesi. MSc Dissertation, Ordu Üniversitesi, 2015.
7. Yazar S, Yaman O, Gözkenç N, Şahin İ. [Distribution of intestinal parasites among patients who presented at the Department of Parasitology of the Erciyes University Medical School]. Türkiye Parazit Derg 2005; 29: 261-3.
8. Kolören Z, Taş B, Kaya D. Microbiological Pollution of Gaga Lake in Ordu (Turkey). Black Sea J Sci 2011; 1: 74-85.
9. Sağlam T, Yaka Gül H, Düşen S. Denizli şehir merkezinde içme suyu ve tarla sulamasında kullanılan bazı su kaynaklarında tek hücreli (=Protozoa) parazitlerin incelenmesi üzerine bir ön araştırma. 19.Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Uluslararası Katılımlı Ekinokokkozis Sempozyumu; 2015 Ekim 5-9; Erzurum: Türkiye; 2015.p. 158.
10. Anonim. Suyun Canlılar İçin Önemi. Erişim adresi: <http://www.diyadinnet.com/YararlıBilgiler-933&Bilgi=suyun-canlılarıiçinönemi->, 2013, Erişim tarihi: 13.05.2018.
11. Wilkes G, Thomas E, Gannon V, Jokinenc C, Lyautey E, Medeiros D, et al. Seasonal relationships among indicator bacteria, pathogenic bacteria,

- Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts and hydrological indices for surface waters within an agricultural landscape. Water Res 2009; 43: 2209-23.
12. Sağlam T, Düşen S, Apaydın Yağcı M, Yağcı A. Eğirdir Gölü'nde (Isparta) *Cryptosporidium* spp. ve *Giardia* spp. varlığının araştırılması. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg 2021; 51: 363-7.
 13. Seferoğlu O. Samsun ve Giresun illerinden alınan su örneklerinde *Giardia intestinalis*'in moleküler teknikler kullanılarak tespit edilmesi. MSc Dissertation, Ordu Üniversitesi. 2014.
 14. Castro-Hermida, JA, Garcia-Presedo I, Almeida A, Gonzales-Warleta M, Da Costa JMC, Mezo M. Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: A health risk for humans and animals. Water Res 2009; 43: 4133-42.
 15. Özcel MA, Özbel Y, Ak M. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:22; İzmir: 2007. p. 3-75.
 16. Özcel MA, Tanyüksel M, Eren H. Moleküler Parazitoloji. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları: İzmir: 2009.p. 824.

Investigation of *Pneumocystis jirovecii* in Lung Cancer Patients with the Nested PCR Method

Akciğer Kanserli Hastalarda *Pneumocystis jirovecii*'nin Nested PZR Yöntemi ile Araştırılması

Ahmed Galip Halidi¹, Merhamet Ölçen², Esra Gürbüz³, Abdurrahman Ekici⁴,
Selahattin Aydemir⁴, Hasan Yılmaz⁴

¹Muş Alparslan University, Bulanık Vocational School, Muş, Turkey

²Şanlıurfa Training and Research Hospital, Clinic of Chest Diseases, Şanlıurfa, Turkey

³University of Health Sciences Turkey, Van Training and Research Hospital, Clinic of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Van, Turkey

⁴Van Yüzüncü Yıl University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Van, Turkey

Cite this article as: Halidi AG, Ölçen M, Gürbüz E, Ekici A, Aydemir S, Yılmaz H. Investigation of *Pneumocystis jirovecii* in Lung Cancer Patients with the Nested PCR Method. Türkiye Parazitol Derg 2022;46(4):276-80.

ABSTRACT

Objective: *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*) is an opportunistic pathogen in humans. Early diagnosis and optimal treatment of patients with *P. jirovecii* pneumonia (PJP) remains a key priority. This study investigated *P. jirovecii* in patients with lung cancer using the nested-polymerase chain reaction (PCR) method and examined the relationship between *P. jirovecii* and clinical findings.

Methods: The study included 60 patients with lung cancer and 30 patients without lung cancer. The bronchoalveolar lavage (BAL) fluid samples of these 90 individuals were taken for diagnostic purposes in the University of Health Sciences Turkey, Van Training and Research Hospital, Clinic of Chest Diseases. Patient information was recorded. After DNA isolation from the BAL fluid samples taken from patients, the nested-PCR protocol for amplification of mtLSUrRNA in *P. jirovecii* was performed.

Results: *P. jirovecii* DNA was detected in 40 (66.67%) of the lung cancer patients included in the study and in six (20%) patients without lung cancer, that is, in 46 (51.11%) patients. The rate of nested-PCR positivity in the lung cancer group was significantly higher than that in the non-lung cancer group ($p=0.0001$). Additionally, a statistically significant correlation was found between anorexia and weight loss, fever and sputum *P. jirovecii* positivity in patients with lung cancer ($p<0.005$).

Conclusion: These findings suggest that lung cancer patients should be evaluated for PJP.

Keywords: *Pneumocystis jirovecii*, bronchoalveolar lavage, nested PCR, Turkey

ÖZ

Amaç: *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*) insanlar için fırsatçı bir patojendir. *P. jirovecii* pnömonisi (PJP) olan hastaların erken teşhisi ve optimal tedavisi önemli bir öncelik olmaya devam etmektedir. Bu çalışmada, akciğer kanserli hastalarda *P. jirovecii*'nin nested-polimeraz zincir reaksiyon (PZR) yöntemi ile araştırılması ve *P. jirovecii* ile klinik bulgular arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışmaya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Van Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göğüs Hastalıkları Kliniği'nde tanısı amaçla bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvı örnekleri alınan 60 akciğer kanserli hasta ve 30 akciğer kanseri olmayan hasta dahil edildi. Hastalara ait bilgiler kaydedildi. Hastalardan alınan BAL sıvı örneklerinden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra *P. jirovecii* mtLSUrRNA gen bölgesinin amplifikasyonu için nested-PZR protokolü uygulandı.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen akciğer kanserli hastaların 40'ında (%66,67), akciğer kanseri olmayan hastaların 6'sında (%20) olmak üzere toplam 46 (%51,11) hastada *P. jirovecii* DNA'sı saptandı. Akciğer kanseri grubunda nested-PZR pozitiflik oranı, akciğer kanseri olmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek yüksekti ($p=0,0001$). Ayrıca akciğer kanserli hastalarda iştahsızlık ve kilo kaybı, ateş ve balgam ile *P. jirovecii* pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ($p<0,005$).

Sonuç: Sonuç olarak akciğer kanseri hastalarının, PJP yönünden mutlaka değerlendirilmesi gerektiği kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: *Pneumocystis jirovecii*, bronkoalveolar lavaj, nested PZR, Türkiye



Received/Geliş Tarihi: 11.01.2022 Accepted/Kabul Tarihi: 01.06.2022

Address for Correspondence/Yazar Adresi: Selahattin Aydemir, Van Yüzüncü Yıl University Faculty of Medicine Department of Parasitology, Van, Turkey

Phone/Tel: +90 530 777 87 08 E-mail/E-Posta: saydmr23@gmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0002-0941-2779

INTRODUCTION

Pneumocystis jirovecii (*P. jirovecii*) is a single-celled eukaryotic microorganism and an opportunistic pathogen for humans (1,2). *P. jirovecii* shows tropism to the lung alveoli. There are trophozoite, precyst, and cyst forms in its life cycle (3).

The mode of transmission of *P. jirovecii* is not fully understood, and its environmental source is not known. It is thought that the infection is mostly transmitted by air. *P. jirovecii* infections are asymptomatic in immunocompetent individuals (3,4). The clinical course may be severe in patients with AIDS or those whose immune system is suppressed for other reasons (5). The most common clinical symptoms of patients are dyspnea, tachypnea, non-productive cough, mild fever, and cyanosis. Rarely, chest pain may also occur (6,7).

Early diagnosis and optimal treatment of patients with *P. jirovecii* pneumonia (PJP) remains a key priority (8,9). Definitive diagnosis of infection is made by microscopic detection of cysts and/or trophozoites of the agent in respiratory system samples. Although bronchoalveolar lavage (BAL) fluid samples are the first choice for diagnosis, presence of this parasitic agent is also tested in patient samples such as induced sputum, bronchial lavage, nasopharyngeal aspiration, lung biopsy, and oral washing fluid (1,10). These samples are stained with various staining methods such as methenamine silver, toluidine blue O, Wright-Giemsa, and Gram-Weigert (10). Direct and indirect immunofluorescence staining methods are also frequently used (1). However, the low number of parasitic agents in non-AIDS immunosuppressed patients or individuals with intact immune system reduces the sensitivity of microscopic diagnosis. This makes molecular methods, which are more sensitive in diagnosis and based on the detection of *P. jirovecii* DNA, more attractive (11).

Detection of *P. jirovecii* DNA in clinical samples does not mean that the patient has definitive PJP. In clinically asymptomatic individuals, detection of the organism or its DNA is defined as colonization. Clinical evaluation is very important to distinguish between infection and colonization (12,13).

This study investigated *P. jirovecii* in patients with lung cancer using the nested-polymerase chain reaction (PCR) method and examined the relationship between *P. jirovecii* and clinical findings.

METHODS

The study was approved by the Scientific Research and Publication Ethics Committee of Muş Alparslan University (27/09/2019-29). Patients who did not receive anti-PJP treatment and whose BAL fluid samples were taken for diagnostic purposes in the Chest Diseases Department of the University of Health Sciences Turkey, Van Training and Research Hospital between January 2020 and November 2021 were included in this study. BAL fluid samples taken from 60 patients with lung cancer and 30 without lung cancer (19 pneumonia, 9 idiopathic pulmonary fibrosis, 2 pulmonary vasculitis) were brought to Van Yüzüncü Yıl University Faculty of Medicine Department of Parasitology Research Laboratory. Patient information was recorded.

Sample Preparation

On average, 2 mL of BAL liquid samples were placed in centrifuge tubes. Then, distilled water was added to make a total volume of 10 mL. These tubes were centrifuged at 1.500 rpm for 10 minutes.

After centrifugation, the supernatant was taken, and the bottom precipitate was removed and stored at -20 °C.

DNA Extraction

DNA was extracted from stored BAL samples using an GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Lithuania) according to the manufacturer's recommendations.

Nested-PCR

The nested-PCR protocol for amplification of mtLSUrRNA in *P. jirovecii* was performed as previously described by Özkoç et al. (1). The primers pAZ102-E (5'-GATGGCTGTTTCCAAGCCCA-3') and pAZ102-H (5'-GTGTACGTTGCAAAGTACTC-3') were used in the first step of the nested-PCR. The reaction was adjusted to a total volume of 50 µL containing 25 µL of Tag 2x Master Mix (12.5 mM MgCl₂, 0.5 mM MgCl, 0.2 µM from each primer, and 1 µL of sample DNA. 1 µL of the obtained amplicon was used for the second step of the nested-PCR. In the second step, the primers pAZ102-X (5'-GTGAAATACAAATCGGACTAGG-3') and pAZ102-Y (5'-TCACTTAATAATTAATTGGGGAGC-3) were used, which amplify the 267 bp long region. The reaction was carried out under the conditions specified in the previous step.

Reactions were run on the Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler PCR instrument. The same amplification protocol was used for both PCRs. The PCR was programmed for a total of 35 cycles of 30 seconds each at 94 °C, 30 seconds at 50 °C (49 °C for the second step), and 90 seconds at 72 °C. In both PCR processes, an additional 15-minute denaturation step at 95 °C was applied before the first cycle, and a 10-minute extension step at 72 °C was applied after the last cycle.

Agarose-gel Electrophoresis

In order to display the results of the nested-PCR process, 15 µL agarose gel (1.5%) from the reaction products was subjected to electrophoresis and displayed in the UVP gel documentation system.

Statistical Analysis

Comparisons of the *P. jirovecii* prevalence for research groups, gender, and clinical signs and symptoms were analyzed by independent two proportions Z (t) test. The statistical significance level was considered as 5% (p<0.05) (MINITAP; ver: 14).

RESULTS

P. jirovecii DNA was detected in the BAL samples by the nested-PCR method (Figure 1) in 40 (66.67%) of patients with lung

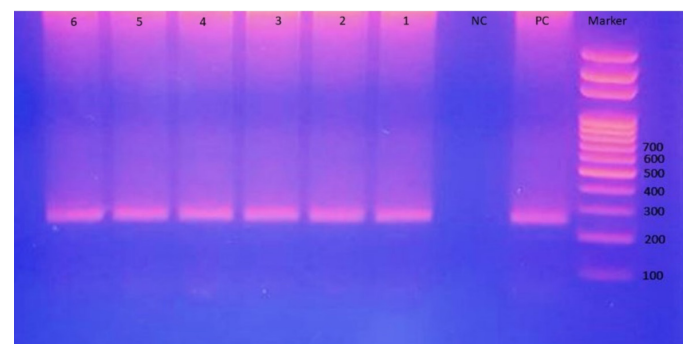


Figure 1. Agarose gel image of positive samples of *P. jirovecii*

cancer diagnosis and 6 (20%) of the patients without lung cancer. That is, *P. jirovecii* DNA was detected in the BAL samples in a total of 46 (51.11%) patients. Twenty-seven (58.7%) of these patients were male; 19 (41.3%) were female (Table 1). Their mean age was 52.1 years.

In the study, the rate of nested-PCR positivity in the lung cancer group was significantly higher than in the non-lung disease group ($p=0.0001$). However, no significant correlation was found between the incidence of *P. jirovecii* and age and gender.

The clinical signs and symptoms of the patients with lung cancer diagnosis and *P. jirovecii* positivity are compared in Table 2. Of the 40 *P. jirovecii* nested-PCR positive patients, 35 (87.5%) had cough, 21 (52.5%) had dyspnea, 24 (60%) had sputum, 9 (22.5%) had anorexia and weight loss, and 15 (37.5%) had fever. Of the 20 *P. jirovecii* nested-PCR negative patients, 15 (75%) had cough, 9 (45%) had dyspnea, 5 (25%) had sputum, none had anorexia and weight loss, and none had fever. Although a statistically significant relationship was found between sputum, anorexia and weight loss, fever and *P. jirovecii* positivity, no statistically significant relationship was found between other clinical signs and symptoms and *P. jirovecii* positivity (Table 2).

DISCUSSION

P. jirovecii is an important pathogen in immunocompromised patients (14). It is an important risk factor especially for patients

with organ transplantation, solid tumors, and hematological malignancies and in individuals with inflammatory and rheumatic diseases (15). The use of chemotherapy regimens and immunomodulatory drugs has increased the number of patients at high risk for *P. jirovecii* (16). Especially in patients with primary brain cancer or metastatic cancer, the use of high-dose systemic corticosteroids increases the risk (17). In addition to these, there is a high rate of *P. jirovecii* colonization in patients with chronic lung complaints (18). Detection of *P. jirovecii* DNA in individuals without pneumonia signs and symptoms has been defined as colonization (12). Colonization of *P. jirovecii* does not indicate that the person has PJP, but it may affect the pathophysiology of respiratory diseases and may suggest that the person is at risk for *P. jirovecii* disease (13).

In other studies conducted with BAL samples, it was reported that the sensitivity of the PCR method was 100% and the specificity was between 84% and 93%. Although positive results in conventional PCR cannot distinguish colonization from infection, it is a reliable method for detecting individuals at risk (4). In this study also, it was not determined whether there was colonization or infection in *P. jirovecii* positive patients determined by PCR method.

The data obtained in some studies show that chronic lung diseases pave the way for the colonization of *P. jirovecii*, and the data obtained in some other studies show that *P. jirovecii* causes inflammatory changes in the lungs and these changes play a role in the pathophysiology of chronic lung diseases (1,18-20). Both

Table 1. The distribution of *P. jirovecii* positivity according to research groups and gender

Group	<i>P. jirovecii</i>		P
	Positive n (%)	Negative n (%)	
Patients with lung cancer diagnosis (n=60)	40 (66.7)	20 (33.3)	0.001
Patients without lung cancer (n=30)	6 (20)	24 (80)	
Pneumonia (n=19)	4 (21.1)	15 (78.9)	0.763
Idiopathic pulmonary fibrosis (n=9)	2 (22.2)	7 (77.8)	
Pulmonary vasculitis (n=2)	0 (0)	2 (100)	
Male (n=49)	27 (55.1)	22 (44.9)	0.406
Female (n=41)	19 (46.4)	22 (53.6)	
Total (n=90)	46 (51.1)	44 (48.9)	-

Table 2. Relationship between *P. jirovecii* prevalence and some clinical symptoms in patients with lung cancer diagnosis

Clinical signs and symptoms		Patients with lung cancer diagnosis (n=60)		
		<i>P. jirovecii</i> positive n (%)	<i>P. jirovecii</i> negative n (%)	P
Cough	Positive (n=50)	35 (70)	15 (30)	0.221
	Negative (n=10)	5 (50)	5 (50)	
Dyspnea	Positive (n=30)	21 (70)	9 (30)	0.584
	Negative (n=30)	19 (63.3)	11 (36.7)	
Sputum	Positive (n=29)	24 (82.8)	5 (17.2)	0.011
	Negative (n=31)	16 (51.6)	15 (48.4)	
Anorexia and weight loss	Positive (n=9)	9 (100)	0 (0)	0.021
	Negative (n=51)	31 (60.8)	20 (39.2)	
Fever	Positive (n=15)	15 (100)	0 (0)	0.002
	Negative (n=45)	25 (55.6)	20 (44.4)	

possibilities have prompted researchers to investigate *P. jirovecii* colonization in people with lung disease. One study showed that 31.8% of the patients with positive PCR results had a history of PJP or will develop PJP (21). Therefore, although colonization-infection distinction was not made, the positivity rate determined in patients with lung cancer diagnosis in this study shows that patients with lung cancer are at risk for PJP.

In studies conducted with patients with lung disease symptoms, *P. jirovecii* colonization has been reported to be in the range of 2.6-55% (10,11,18,20). In an autopsy study evaluating lung cancer cases, *P. jirovecii* colonization was detected in all 10 patients who died of small cell lung cancer (22). Özkoç et al. (1) detected *P. jirovecii* colonization in eight (57.1%) of 14 patients with lung cancer. The data of these two studies (22) and the data obtained in our study may be consistent or convergent.

HIV-infected patients with PJP typically present with subacute symptoms beginning with cough, dyspnea, and fever (14,23). Studies have reported that some symptoms may also occur in patients who are not infected with HIV but are found to have *P. jirovecii*. Özmen et al. (10) reported that the clinical findings of patients with *P. jirovecii* colonization included cough, sputum, dyspnea, hemoptysis, chest pain, and fever.

In a study by Roux et al. (24), in which they compared the clinical signs and symptoms of patients with and without AIDS diagnosed with PJP, they reported that patients in both groups had fever and dyspnea, and cough was more common in AIDS patients with a statistically significant difference. Bienvenu et al. (25) also compared the clinical signs and symptoms of patients with and without HIV who were diagnosed with PJP. In their study, it was reported that cough and dyspnea were observed less frequently in non-HIV patients compared to HIV patients, and fever was a symptom seen in both groups. In our study, the patients did not have HIV infection, and some clinical signs and symptoms such as fever and weight loss were detected in the patients. Considering the data obtained from the studies conducted by Roux et al. (24) and Bienvenu et al. (25) and the data in our study, we suggest that fever and sputum may be a clinical symptom in lung cancer patients with *P. jirovecii* colonization, and cough, dyspnea may develop independently of lung colonization.

In this study, anorexia and weight loss were seen more frequently in lung cancer patients with *P. jirovecii* colonization compared to patients without colonization. No information could be found in the literature on the relationship between anorexia and weight loss and *P. jirovecii* colonization. Therefore, further studies are needed to confirm this finding.

CONCLUSION

The colonization rate of *P. jirovecii* in patients with lung cancer is high and should not be ignored. Colonization may turn into an infection following the use of immunosuppressive drugs in patients with cancer. For this reason, lung cancer patients should be evaluated for PJP during the treatment process.

*Ethics

Ethics Committee Approval: The study was approved by the Scientific Research and Publication Ethics Committee of Muş Alparslan University (27/09/2019-29).

Informed Consent: Informed consent was taken from all present patients in this study.

Peer-review: Internally and externally peer-reviewed.

*Authorship Contributions

Concept: A.E., A.G.H., E.G., Design: A.E., S.A., H.Y., Data Collection or Processing: E.G., M.Ö., Analysis or Interpretation: S.A., A.E., A.G.H., Literature Search: S.A., A.E., E.G., A.G.H., Writing: S.A., A.E., E.G., A.G.H.

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

Financial Disclosure: No financial support was reported by the authors.

REFERENCES

- Özkoç S, Delibas SB, Erbaycu AE, Ergüden C, Akısı Ç. [Investigation of *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with pulmonary diseases]. Türkiye Parazitol Derg 2014; 38: 214-9.
- Hafez HM, Mostafa NN, Abdulwahab HE. Detection of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia by nested Polymerase Chain Reaction among patients with hematological malignancies. Egypt J Lab Med 2017; 47: 47-56.
- Skalski JH, Kottom TJ, Limper AH. Pathobiology of *Pneumocystis* pneumonia: life cycle, cell wall and cell signal transduction. FEMS Yeast Res 2015; 15: fov046.
- Tekinşen FF, Koç AN. [Investigation of *Pneumocystis jirovecii* in clinical specimens by different methods]. Mikrobiyol Bul 2013; 47: 658-67.
- Krajicek BJ, Limper AH, Thomas Jr CF. Advances in the biology, pathogenesis and identification of *Pneumocystis* pneumonia. Curr Opin Pulm Med 2008; 14: 228-34.
- Elbüken G. *Pneumocystis jirovecii* enfeksiyonu ve akciğer tutulumu. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2007; 33: 97-103.
- Thomas Jr CF, Limper AH. *Pneumocystis* pneumonia. N Engl J Med 2004; 350: 2487-98.
- Novosad SA, Winthrop KL. Beyond tumor necrosis factor inhibition: the expanding pipeline of biologic therapies for inflammatory diseases and their associated infectious sequelae. Clin Infect Dis 2014; 58: 1587-98.
- Ko Y, Jeong BH, Park HY, Koh WJ, Suh GY, Chung MP, et al. Outcomes of *Pneumocystis* pneumonia with respiratory failure in HIV-negative patients. J Crit Care 2014; 29: 356-61.
- Özmen A, Mistik R, Alver O, Coşkun F, Ursavaş A, Uzaslan E. [The *Pneumocystis jirovecii* colonization in bronchoalveolar lavage (BAL) and bronchial washing and the comparison of methods which are used in diagnosis]. Tuberk Toraks 2013; 61: 303-11.
- Özkoç S, Delibaş SB. [Investigation of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia and colonization in iatrogenically immunosuppressed and immunocompetent patients]. Mikrobiyol Bul 2015; 49: 221-30.
- Matsumura Y, Ito Y, Iinuma Y, Yasuma K, Yamamoto M, Matsushima A, et al. Quantitative real-time PCR and the (1→3)-β-D-glucan assay for differentiation between *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization. Clin Microbiol Infect 2012; 18: 591-7.
- Fily E, Lachkar S, Thiberville L, Favennec L, Caron F. *Pneumocystis jirovecii* colonization and infection among non HIV-infected patients. Med Mal Infect 2011; 41: 526-31.
- Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and Its Role in Disease. Clin Microbiol Rev 2012; 25: 297-317.
- Li MC, Lee NY, Lee CC, Lee HC, Chang CM, Ko WC. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromised patients: delayed diagnosis and poor outcomes in non-HIV-infected individuals. J Microbiol Immunol Infect 2014; 47: 42-7.
- Bollée G, Sarfati C, Thiéry G, Bergeron A, de Miranda S, Menotti J, et al. Clinical picture of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in cancer patients. Chest 2007; 132: 1305-10.
- Torres HA, Chemaly RF, Storey R, Aguilera EA, Nogueras GM, Safdar A, et al. Influence of type of cancer and hematopoietic stem cell transplantation

- on clinical presentation of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in cancer patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2006; 25: 382-8.
18. Calderón EJ, Rivero L, Respaldiza N, Morilla R, Montes-Cano MA, Friaza V, et al. Systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease who are colonized with *Pneumocystis jirovecii*. Clin Infect Dis 2007; 45: e17-9.
 19. Gutiérrez S, Respaldiza N, Campano E, Martínez-Risquez MT, Calderón EJ, De La Horra C. *Pneumocystis jirovecii* colonization in chronic pulmonary disease. Parasite 2011; 18: 121-6.
 20. Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. Epidemiology and clinical significance of *Pneumocystis* colonization. J Infect Dis 2008; 197: 10-7.
 21. Lu Y, Ling G, Qiang C, Ming Q, Wu C, Wang K, et al. PCR diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia: a bivariate meta-analysis. J Clin Microbiol 2011; 49: 4361-3.
 22. de la Horra C, Varela JM, Fernández-Alonso J, Medrano FJ, Respaldiza N, Montes-Cano MA, et al. Association between human-*Pneumocystis* infection and small-cell lung carcinoma. Eur J Clin Invest 2004; 34: 229-35.
 23. Kales CP, Murren JR, Torres RA, Crocco JA. Early predictors of in-hospital mortality for *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. Arch Intern Med 1987; 147: 1413-7.
 24. Roux A, Canet E, Valade S, Gangneux-Robert F, Hamane S, Lafabrie A, et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with or without AIDS, France. Emerg Infect Dis 2014; 20: 1490-7.
 25. Bienvenu AL, Traore K, Plekhanova I, Bouchrik M, Bossard C, Picot S. *Pneumocystis* pneumonia suspected cases in 604 non-HIV and HIV patients. Int J Infect Dis 2016; 46: 11-7.

Endoskopi ve Kolonoskopi Yapılan Hastalarda *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* ve *Cryptosporidium* spp. Varlığının Araştırılması

Investigation of the Preceence of Entamoeba histolytica, Giardia intestinalis and Cryptosporidium spp. in Patients Who Undergone Endoscopy and Colonoscopy

© Mehmet Tugay Eren¹, © Serpil Değerli², © Özlem Yönm³

¹Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas, Türkiye

²Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

³Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

Cite this article as: Eren MT, Değerli S, Yönm Ö. Investigation of the Preceence of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium* spp. in Patients Who Undergone Endoscopy and Colonoscopy. Türkiye Parazitol Derg 2022;46(4):281-7.

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada, farklı ön tanımlarla endoskopi ve/veya kolonoskopi yapılan hastalardan işlem sırasında alınan örneklerde ve aynı hastaların dışkılarında *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* ve *Cryptosporidium* spp.'nin varlığının ELISA ve direkt mikroskopi yöntemleri ile araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Endoskopi yapılan 49, kolonoskopi yapılan 39 hasta olmak üzere toplam 88 hastadan endoskopik ve kolonoskopik yıkama/sürüntü materyali ve ayrıca aynı hastalardan dışkı örnekleri alınmıştır. Alınan tüm örnekler parazitoloji laboratuvarına aynı gün getirilerek direkt mikroskobik incelemeleri yapılmış, ELISA uygulanıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Bulgular: Tüm örnekler direkt mikroskopi ve ELISA yöntemi ile incelenmiştir. ELISA yöntemiyle yapılan incelemelerde; dışkı örneklerinin, 2'sinde (%2,3) *E. histolytica*, 4'ünde (%4,5) ise *G. intestinalis* saptanmıştır. Kolonoskopi yapılan hastaların kolonoskopik yıkama/sürüntü örneklerinin 6'sında (%6,8) *G. intestinalis*, 1'inde (%1,1) *Cryptosporidium* spp. saptanmıştır. Kolonoskopi yapılan hastaların dışkı örneklerinin hiçbirinde ve endoskopik yıkama/sürüntü örneklerinde ELISA ile parazit varlığı saptanmamıştır. Direkt inceleme yöntemiyle dışkı ve yıkama/sürüntü örneklerinde parazit saptanmamıştır. Endoskopi ve kolonoskopi yapılan hastalardan alınan yıkama/sürüntü örneklerinde *G. intestinalis* görülme durumu istatistiksel olarak karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Endoskopi yapılan hastaların dışkılarında *G. intestinalis* görülme durumu karşılaştırıldığında cinsiyetler arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Sonuç: Gastrointestinal şikayeti olan, ve endoskopi ve kolonoskopi yapılan hastalarda direkt mikroskopi ile dışkı incelemesi ile parazit varlığının araştırılması yetersiz kalabilmektedir. Dışkı örneğinin direkt incelemesinin yanında endoskopi ve kolonoskopi işlemi sırasında kolayca alınabilecek yıkama/sürüntü materyallerinde parazit antijenlerinin araştırılmasının tanı koymada gerekli ve önemli olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: ELISA, endoskopi, kolonoskopi, *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp.

ABSTRACT

Objective: In this study, it was aimed to investigate the presence of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium* spp. in the samples taken during the procedure from patients who underwent endoscopy and/or colonoscopy with different prediagnoses, and in the stools of the same patients, by ELISA and direct microscopy methods.

Methods: A total of 88 patients' endoscopic and colonoscopic pre-washed materials, which consisted of 49 individuals who belong former group and 39 individuals to the next group, were, respectively, obtained, and the stool samples were also included to study from the same group. All the specimens were immediately transferred to the parasitology research laboratory within the same day and stored C until for the next step of ELISA applications.

Results: All the samples were examined by direct microscopy and ELISA method. In the examinations performed using the ELISA method; *E. histolytica* was detected in 2 (2.3%) stool samples, and *G. intestinalis* was found in 4 (4.5%) stool samples. In the colonoscopic wash/swab samples of the patients who underwent colonoscopy, 6 (6.8%) *G. intestinalis*, 1 (1.1%) *Cryptosporidium*



Geliş Tarihi/Received: 29.12.2021 Kabul Tarihi/Accepted: 24.06.2022

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Serpil Değerli, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

Tel/Phone: +90 533 495 64 41 E-Posta/E-mail: sdegerli@cumhuriyet.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0003-2229-1737

spp. detected. No parasites were detected by ELISA in any of the stool samples or endoscopic washing/swab samples of the patients who underwent colonoscopy. No parasites were detected in stool and wash/swab samples by the direct examination method.

When the incidence of *G. intestinalis* in washing/swab samples taken from patients who underwent endoscopy and colonoscopy was statistically compared, the difference was found to be significant ($p < 0.05$). When the incidence of *G. intestinalis* in the stools of patients who underwent endoscopy was compared, the difference between genders was found to be significant ($p < 0.05$).

Conclusion: In patients with gastrointestinal complaints and undergoing endoscopy and colonoscopy, investigation of the presence of parasites by stool examination with direct microscopy may be insufficient. In addition to the direct examination of the stool sample, it is thought that the investigation of parasite antigens in the wash/swab materials that can be easily taken during the endoscopy and colonoscopy procedure is necessary and critical in the diagnosis

Keywords: ELISA endoscopy, colonoscopy, *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp.

GİRİŞ

Parazit hastalıkları gelişmekte olan tüm ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de önemli sağlık sorunlarının başında gelmektedir (1). İklim, nüfus artışı, yetersiz ve kontamine su kaynaklarına bağlı olarak bazı bölgelerde bağırsak parazitlerine daha sık rastlanmaktadır (2). Genelde fekal-oral yolla bulaşan bu hastalıklarla mücadelede kişisel hijyen ve eğitim oldukça önemlidir (3). Dünya nüfusunun yaklaşık dörtte birinin, bir veya birden fazla parazite konaklık ettiği ve bu insanların çoğunun da geri kalmış ülkelerde yaşadığı tahmin edilmektedir. İnsanlarda bulunan bağırsak parazitlerinin tanısı temel olarak dışkı, daha seyrek olarak da duodenal sıvı ve biyopsi örneklerinde parazitin çeşitli formlarının saptanmasına dayanmakta ve kullanılan direkt veya boyalı olarak dışkı mikroskopisinin birçok avantajı bulunmaktadır (4,5). Amoebiosis, *Entamoeba histolytica*'nın neden olduğu bir paraziter hastalık olup bağırsak ve bağırsak dışı amoebiosis olarak seyretmektedir. Bağırsak amoebiosisi sıklıkla asemptomatik olarak gözlenmekte ve ishalden dizanteriye kadar seyreden çeşitli semptomlara neden olabilmektedir. Parazit, insanın öncelikle kalın bağırsağına yerleşmekte ve kalın bağırsak mukozasına girerek kanlı mukuslu ishal tablosu şekillendirmektedir. Bağırsak dışı amoebiosis ise karaciğer, akciğer, beyin gibi diğer organlarda yerleşerek apse oluşumuna sebep olur (6). Giardiyoza çocuklarda çok fazla rastlanmakta ve uzun süreli olarak devam etmektedir. Reenfeksiyonlarla hastalığın yenilenmesi sindirim sisteminin çalışmasında ciddi sorunlara yol açmaktadır. Özellikle kırsal bölgelerde, giardiasisin neden olduğu sindirim ve beslenme bozukluklarına bağlı olarak malnütrisyon, malabsorbsiyon ve çocuklarda çok ağır seyreden zihinsel ve bedensel gelişim bozukluklarına yol açmaktadır (7). *Cryptosporidiosis*, farklı genotipteki *Cryptosporidium* türlerinin insan ve hayvanlarda asemptomatik enfeksiyondan akut enterite kadar değişebilen semptomlara yol açtığı bilinen bir hastalıktır. İnsanlarda 1982 yılına kadar daha çok bağırsak sistemi baskılanmış bireylerin enfeksiyonu olarak bilinen *cryptosporidiosis*, özellikle laboratuvar tanı yöntemlerinin gelişmesiyle bağışıklık sistemi sağlam bireylerde de görülebileceği ve hastalık oluşturabileceği belirlenmiştir. *Cryptosporidiosis* insandan insana direkt temasla, su veya besin yoluyla, hayvanlarla temas yoluyla, hava yoluyla, toprak ve taşıyıcı konaklarla, indirekt yolla ve seksüel yolla bulaşabilir (8). Patojen *E. histolytica* ve apatojen *E. dispar* için en güvenilir ayırt edici tanı yine spesifik antijenlerin ELISA gibi yöntemlerle gösterilmesidir. Giardiyozun ve *Cryptosporidiosis*ın dışkı ve duodenal sıvınının direkt mikroskopisi, ince bağırsak örnek ve biyopsilerinin incelenmesi ile tanı konur. Bu gibi geleneksel yöntemler hem zaman alıcıdır hem de deneyimli personele ihtiyaç gerektirir (9). Kist atımı düzenli olmadığı için, tek bir örnek incelenmesi ile %10-50 oranında yanlış sonuçlara yol açabilmektedir. Bu nedenle özgüllük ve duyarlılık yönünden

yüksek olan spesifik antijen arama yöntemleri önem taşımaktadır. Bu amaçla en sık kullanılan yöntem ELISA yöntemidir (7).

Endoskopi, yemek borusu, mide ve oniki parmak bağırsağına rahatsızlıklarında, nedenin ortaya çıkarılması amacıyla yapılan oldukça etkin ve güvenilir bir yöntemdir. Kolonoskopi de anüsten geçilerek kalın bağırsağın bir kısmı (rektosigmoidoskopi) veya tamamı (total kolonoskopi) cihazın ucundaki kamera ile kalın bağırsağın iç yüzünün görüntüsü yüksek çözünürlüklü bir televizyon ekranına yansıtılmakta ve bu sayede iltihabi değişiklikler, ülserler, tümörler, polipler ve diğer patolojik durumların tanısı konulabilmektedir (10).

Bu çalışmada Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniği'ne başvuran, farklı ön tanımlarla endoskopi ve/veya kolonoskopi yapılan hastalardan, işlem sırasında alınan yıkama/sürüntü örneklerinde ve bu hastaların dışkılarında *E. histolytica*, *G. intestinalis* ve *Cryptosporidium* spp.'nin varlığının direkt mikroskopik inceleme ve ELISA yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Örneklerin Toplanması

Çalışmanın yapılabilmesi için Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan gerekli izin (2017-12/02) alınmıştır.

Örnekler Ocak 2018-Mayıs 2018 tarihleri arasında Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Eğitim ve Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniği'ne farklı şikayetlerle başvuran ve endoskopi ve/veya kolonoskopi yapılması öngörülen, dışlama kriterlerine uygun olan gönüllü hastalardan alınmıştır. Son bir ay içinde antiparaziter ilaç kullananlar çalışma dışı bırakılmıştır. Çalışmaya yaşları 17-77 arasında değişen 49 endoskopi hastası ve 39 kolonoskopi hastası olmak üzere toplam 88 hasta alınmıştır. Çalışmaya alınan hastalara onam formu imzalatıldıktan sonra anket uygulanmıştır ve dışkı kutuları verilmiştir. Dışkı örnekleri hastalardan aynı gün veya ertesi gün toplanmıştır.

Gastroenteroloji endoskopi ve kolonoskopi ünitesinde yıkama/sürüntü örneklerinin alınması sırasında Olympus® ve Fujinon® cihazlarla çalışılmıştır. Endoskopi işlemi sırasında aspiratör devre dışı bırakılıp 10 cc steril serum fizyolojik cihazın işlem kanalından gönderilmiştir. Hemen ardından serum fizyolojik ile duodenal sıvı aspire edilmiş, ardından sitolojik fırça ile duodenum ikinci kıtadan sürüntü alınmıştır. Kolonoskopi ile hastanın ileum değerlendirilmesi ve çekum tabanı entübasyonundan sonra kolon distaline doğru lümenin ayrıntılı incelemesine devam edilmiştir. Retrofleksiyon ile işlem sonlandırılmadan önce rektum lümenine 10 cc steril serum fizyolojik cihazın işlem kanalından

gönderilmiştir. Takiben verilen serum fizyolojik ile beraber rektal mukoza lümen sıvısı aspire edilmiştir. Aspire edilen sıvı cihazın kolektör kanalında toplanmıştır. Ayrıca sitoloji fırçası ile de rektum mukozasından sürüntü alınmıştır. Alınan her sürüntü örneğinden sonra, örnek toplama kabı sterilizasyon işleminden geçirilmiştir.

Örneklerin İncelenmesi ve Saklanması

Toplanan tüm örnekler aynı gün tıbbi parazitoloji anabilim dalı laboratuvarına getirilmiş ve öncelikle 88 dışkı örneğinin direkt nativ-Lugol incelemesi yapılmıştır. Direkt mikroskopik incelemesi yapılan, hastalardan alınan her bir dışkı örneği ve endoskopik/kolonoskopik yıkama/sürüntü materyali, 1,5 mL'lik 3 farklı eppendorfa bölünerek, ELISA yönteminin uygulanacağı güne kadar -20 °C'de saklanmıştır.

ELISA Yöntemi

Dışkı örneklerinde ve endoskopik/kolonoskopik yıkama/sürüntü materyallerinde, *E. histolytica*, *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. antijenlerini belirlemek amacıyla, DRG® ELISA kitleri kullanıldı ve kit prosedürleri uygulandı.

İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda elde edilen veriler bilgisayar ortamında SPSS 22.0 programına kaydedilmiştir. Verilerin değerlendirilmesinde 2,2 gözlü düzenlerde ve çok gözlü düzenlerde ki-kare testi ve Fisher'ın kesin ki-kare testi uygulanmıştır. Yanılma düzeyi $p < 0,05$ olarak alınmıştır.

BULGULAR

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Eğitim ve Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniği'ne Ocak 2018-Mayıs 2018 tarihleri arasında endoskopi ve/veya kolonoskopi ön tanılı olarak gelen hastalardan dışlama kriterlerine uygun olan gönüllü hastalar çalışmaya alınmıştır. Hastaların dışkı ve yıkama/sürüntü örnekleri direkt mikroskopik inceleme ve ELISA yöntemi ile incelenmiştir. Yıkama/sürüntü örneklerinin direkt mikroskopik incelemesinde herhangi bir paraziter etkene rastlanmamıştır.

Endoskopi yapılan hastalardan alınan dışkı örneklerinde ELISA yöntemiyle *G. intestinalis* görülme durumunun cinsiyete göre dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir. Endoskopi yapılan hastalardan alınan dışkı örneklerinde *G. intestinalis* görülme durumu cinsiyet yönünden istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0,048$, $p < 0,05$).

Kolonoskopi yapılan hastalardan alınan dışkı örneklerinde, ELISA yöntemiyle, *G. intestinalis* görülme durumunun cinsiyete göre dağılımı Tablo 2'de özetlenmiştir. Kolonoskopi yapılan hastalardan alınan sürüntü örneklerinde *G. intestinalis* görülme durumunun

Tablo 1. Endoskopi yapılan hastalardan alınan dışkı örneklerinde ELISA yöntemiyle *G. intestinalis* görülme durumunun cinsiyete göre dağılımı

	Pozitif		Negatif	
	n	%	n	%
Kadın	0	0	25	100
Erkek	4	16,7	20	83,3
Toplam	4	8,2	45	91,8

cinsiyete göre dağılımı istatistiksel olarak karşılaştırıldığında kadınların %14,3'ü, erkeklerin %16,7'si pozitif olarak saptanmış, aradaki fark önemsiz bulunmuştur ($p = 0,590$, $p > 0,05$).

Endoskopi ve kolonoskopi yapılan hastalardan alınan yıkama/sürüntü örneklerinde ELISA yöntemiyle *G. intestinalis* görülme durumu Tablo 3'te özetlenmiştir. Buna göre, *G. intestinalis* görülme durumu istatistiksel olarak karşılaştırıldığında endoskopi yapılan hastalarda pozitiflik yokken, kolonoskopi yapılan hastalarda %15,4 pozitiflik saptanmış olup aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p = 0,006$, $p < 0,05$).

Endoskopi ve kolonoskopi yapılan hastalardan alınan dışkı örneklerinde ELISA yöntemiyle *G. intestinalis* görülme durumu Tablo 4'te sunulmuştur. Endoskopi ve kolonoskopi yapılan hastalardan alınan dışkı örneklerinde *G. intestinalis* görülme durumu istatistiksel olarak karşılaştırıldığında endoskopi yapılan hastalarda %8,2 pozitif, kolonoskopi yapılan hastalarda ise pozitiflik saptanmamış olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p = 0,126$).

Endoskopi ve kolonoskopi yapılan hastalardan alınan dışkı örneklerinde ELISA ile *E. histolytica* görülme durumu; endoskopi hastalarında %4,1 pozitif, kolonoskopi hastalarında ise pozitif sonuca rastlanmamış olup, iki grup arasında fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p = 0,715$).

Endoskopi ve kolonoskopi yapılan hastalardan alınan sürüntü örneklerinde ELISA ile *Cryptosporidium* spp. görülme durumuna göre; endoskopi hastalarında %4,1 oranında pozitiflik görülürken, kolonoskopi hastalarında ise pozitiflik saptanmamış olup, iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p = 0,443$).

Tablo 2. Kolonoskopi yapılan hastalardan alınan dışkı örneklerinde ELISA yöntemiyle *G. intestinalis* görülme durumunun cinsiyete göre dağılımı

	Pozitif		Negatif	
	n	%	n	%
Kadın	3	14,3	18	85,7
Erkek	3	16,7	15	83,3
Toplam	6	15,4	33	84,6

Tablo 3. Endoskopi ve kolonoskopi yapılan hastalardan alınan yıkama/sürüntü örneklerinde ELISA yöntemiyle *G. intestinalis* görülme durumu

	Pozitif		Negatif	
	n	%	n	%
Endoskopi	0	0	49	100
Kolonoskopi	6	15,4	33	84,6
Toplam	6	6,8	82	93,2

Tablo 4. Endoskopi ve kolonoskopi yapılan hastalardan alınan dışkı örneklerinde ELISA yöntemiyle *G. intestinalis* görülme durumu

	Pozitif		Negatif	
	n	%	n	%
Endoskopi	4	8,2	45	91,8
Kolonoskopi	0	0	39	100
Toplam	4	4,5	84	95,5

İşlem yapılan hastalar ve verilen rapor sonuçlarının saptanan parazite göre dağılım sonuçları Tablo 5'te özetlenmiştir. Buna göre endoskopi rapor sonucu olarak, *E. histolytica* saptadığımız hastalara Antral gastrit tanısı konulurken, *G. intestinalis* saptadığımız hastalara, Eroziv antral gastrit pangastirit lipom, antral gastrit tanısı konulmuştur. *G. intestinalis* saptadığımız ve kolonoskopi yapılmış hastalar da, dimünitif polip, hemoroid, irritable bağırsak hastalığı ve Crohn hastalığı olarak raporlandırılmıştır.

Çalışmaya alınan 49 endoskopi ve 39 kolonoskopi hastası olmak üzere toplam 88 hastaya uygulanan anket sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiş olup, Tablo 6'da özetlenmiştir. Anket sonuçlarına göre, endoskopi ve kolonoskopi hastalarının cinsiyet, ikametgah yeri, içme suyu kaynağı, 1 ay önce parazit tedavisi olma

durumu, beslenme şekilleri, evcil hayvan besleme durumu, toprak yeme alışkanlığı yönünden karşılaştırılması sonucunda aradaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur ($p>0,05$). Endoskopi ve kolonoskopi yapılan hastalar arasında en fazla görülen şikayet endoskopi yapılan hastaların %47,7'si, kolonoskopi yapılanların %35,9'unda olmak üzere mide ağrısı olmuştur. Bu belirtiyi şişkinlik ve gaz yakınması, ishal, kansızlık ve mide yanması takip etmektedir. Çalışmaya alınan hastalarda görülen diğer şikayetlerin durumu Tablo 7'de özetlenmiştir.

TARTIŞMA

E. histolytica'nın neden olduğu amöbiyoz, dünyada en çok ölüme sebep olan parazit hastalıklardan biri olarak tanımlanmaktadır.

Tablo 5. ELISA ile saptanan parazitler ve işlem sonuç raporlarının dağılımı

Yapılan işlem	Rapor sonucu	Şikayet	Dışkı/sürüntü örneği	Görülen parazit
Endoskopi	Antral gastrit	Mide ağrısı	Dışkı	<i>E. histolytica</i>
Endoskopi	Antral gastrit	Mide ağrısı	Dışkı	<i>E. histolytica</i>
Endoskopi	Eroziv antral gastrit	Mide ağrısı	Dışkı	<i>G. intestinalis</i>
Endoskopi	Pangastirit	Kontrol	Dışkı	<i>G. intestinalis</i>
Endoskopi	Lipom, antral gastrit	Kabızlık	Dışkı	<i>G. intestinalis</i>
Endoskopi	Pangastirit	Reflü	Dışkı	<i>G. intestinalis</i>
Kolonoskopi	Normal	İshal	Sürüntü örneği	<i>G. intestinalis</i>
Kolonoskopi	Hafif taze kan	Mide şişkinliği	Sürüntü örneği	<i>G. intestinalis</i>
Kolonoskopi	Dimünitif polipler	Kabızlık	Sürüntü örneği	<i>G. intestinalis</i>
Kolonoskopi	Hemoroid	Şişkinlik	Sürüntü örneği	<i>G. intestinalis</i>
Kolonoskopi	Normal	Bağırsak kanseri	Sürüntü örneği	<i>G. intestinalis</i>
Kolonoskopi	İrritable bağırsak hastalığı	Mide ağrısı	Sürüntü örneği	<i>G. intestinalis</i>
Kolonoskopi	Crohn hastalığı	İshal	Sürüntü örneği	<i>Cryptosporidium</i> spp.

Tablo 6. Endoskopi ve kolonoskopi yapılan hastalara uygulanan anket sonuçlarının dağılımı

		Endoskopi		Kolonoskopi		Toplam		p
		n	%	n	%	n	%	
Cinsiyet	Kadın	25	51	21	53,8	46	52,3	0,792
	Erkek	24	49	18	46,2	42	47,7	
İkametgah	İl	34	69,4	26	67,7	60	68,2	0,739
	İlçe	11	22,4	11	28,2	22	25	
	Köy	4	8,2	2	5,1	6	6,8	
Şebeke suyu	Şebeke	48	100	38	97,4	87	98,9	0,358
	Kuyu	0	0	1	2,6	1	1,1	-
1 ay önce parazit tedavisi	Evet	0	0	1	2,6	1	1,1	0,443
	Hayır	49	100	38	97,4	87	98,9	-
Daha önce tedavi	Evet	2	4,1	1	2,6	3	3,4	0,586
	Hayır	47	95,9	38	97,4	85	96,6	-
Beslenme	Fast-food	0	0	1	2,6	1	1,1	-
	Ev yemekleri	46	93,9	38	97,4	84	95,5	0,159
	Kek-bisküvi	3	6,1	0	0	3	3,4	-
Evcil hayvan	Evet	7	14,3	4	10,3	11	12,5	0,748
	Hayır	42	85,7	35	89,7	77	87,5	-
Toprak yeme	Evet	4	8,2	1	2,6	5	5,7	-
	Hayır	45	91,8	38	97,4	83	94,3	0,377

Tablo 7. Endoskopi ve kolonoskopi yapılan hastalardaki şikayetlerin dağılımı

Şikayet	Endoskopi		Kolonoskopi		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Mide ağrısı	21	47,7	14	35,9	35	42,2
Mide yanması	4	9,1	0	0	4	4,8
Şişkinlik gaz	5	11,4	3	7,7	8	9,6
Kansızlık	0	0	5	12,8	5	6,6
İshal	0	0	5	12,8	5	6,6
Kabızlık	1	2,3	2	5,1	3	3,6
Bulantı	2	4,5	0	0	2	2,4
Reflü	2	4,5	0	0	2	2,4
Şişkinlik	0	0	2	5,1	2	2,4
Enfeksiyon	1	2,3	0	0	1	1,2
Büyüme gelişme bozukluğu	1	2,3	0	0	1	1,2
Mide sertliği	1	2,3	0	0	1	1,2
Tansiyon	1	2,3	0	0	1	1,2
Ağız kokusu	1	2,3	0	0	1	1,2
Mide kanaması	2	4,5	1	2,6	3	3,6
Kilo kaybı	1	2,3	1	2,6	2	2,4
Kontrol	1	2,3	1	2,6	2	2,4
Dışkıda kan	0	0	4	10,3	4	4,8
Bağırsak kanseri	0	0	1	2,6	1	1,2

Tropik ile subtropik bölgelerde görülme oranı %80'lere çıkabilmektedir. Amöbiyoz olgularının %85-90'ında semptomlar görülmeyebilir. Toplu yaşam alanlarında sıklıkla ve salgınlar halinde görülebilmektedir. Dünyada her yıl yaklaşık 600 milyon kişi *E. histolytica* ve mikroskobik olarak bu parazitten ayrırt edilmesi zor olan *E. dispar* ile enfekte olmaktadır (6).

Malatyalı (11) tarafından yapılan çalışmada, Sivas'ta ilköğretim çağındaki çocuklarda dışkıda antijen taraması ile 1449 dışkı örneği, direkt inceleme ve Trikrone boyama ile incelenmiş olup, 22'sinde (%1,5) *E. histolytica/dispar* kistine rastlanmıştır. Ayrıca, protozoon kisti saptanan dışkı örneklerinin (*E. histolytica/dispar*, *E. coli*, *B. hominis*, *G. intestinalis*, *I. butschlii*) 86'sında, *E. histolytica* ELISA ile araştırılmış ve örneklerin hiçbirinde *E. histolytica*'ya ait spesifik yüzey adezinlerine rastlanmamıştır (11).

Bir diğer çalışmada, İstanbul'da 2009 yılında *E. histolytica* ve *E. dispar* ayrımını yapmak için multipleks polimeraz zincir reaksiyon (PZR) yöntemi kullanılmış ve sonuçlar ELISA ve mikroskopi sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Mikroskopi ile pozitif olarak saptanan, kronik enflamatuvar bağırsak hastalığı olan 83 hastanın dışkı örneklerinden 48 tanesinin (%58) PZR yöntemi ile pozitif olarak bulunması mikroskobik tanı yönteminde *E. histolytica*'nın diğer *Entamoeba* türleriyle kolaylıkla karıştırılabileceğini göstermektedir (12).

Babić ve ark. (13), 2016 yılında Bosna-Hersek'te enflamatuvar bağırsak hastalığında amebiyaz sıklığını araştırdıkları çalışmalarında, *E. histolytica/dispar*, toplam 119 olgunun 19'unda (%16,0) görülmüştür. Gastrointestinal şikayetleri olmayan 119 kişiden 2'sinin (%1,7) dışkılarında *E. histolytica/dispar* olduğu tespit edilmiştir (13).

Bizim çalışmamızda Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Eğitim ve Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniği'ne Ocak 2018-Nisan 2018 tarihleri arasında 49 endoskopi, 39 kolonoskopi olmak üzere toplam 88 hastadan yıkama/sürüntü ve dışkı örnekleri alınmıştır. ELISA yöntemiyle, *E. histolytica*, endoskopi yapılan hastaların 2'sinin (%4,1) dışkısında bulunurken, kolonoskopi yapılan hastaların yıkama/sürüntü örneklerinde saptanmamıştır.

G. intestinalis'in neden olduğu giardiasis tüm dünyada görülmekle birlikte, gelişmekte olan ülkelerde daha sık rastlanmaktadır. *G. intestinalis* gastrointestinal şikayetler sebep olduğu gibi çoğunlukla sessiz seyredebilmektedir. Genellikle insanda ince bağırsak, duodenum, jejunumun üst kısmında ve nadiren safra yollarında ve safra kesesine yerleşerek bazı sindirim bozukluklarına neden olmaktadır (6,13). Bizim çalışmamızda, endoskopi ve kolonoskopi yapılan hastalar arasında en fazla görülen şikayet endoskopi yapılan hastaların %47,7'si, kolonoskopi yapılanların %35,9'unda olmak üzere mide ağrısı olmuştur. Bu belirtiyi şişkinlik ve gaz yakınması, ishal, kansızlık ve mide yanması takip etmiştir.

Yağcı ve ark.'nın (14) 2012 yılında yaptığı çalışmada, *G. intestinalis*'in tanısı için dışkı örneklerinde antijen aramaya dayanan ELISA, DFA ve direkt mikroskopi yöntemleri karşılaştırılmış, ELISA ve DFA yöntemlerinin rutin tanıdaki yerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi'ne akut, kronik ishal yakınmaları ile başvuran toplam 150 hastadan alınan dışkı örneklerinin incelenmesi sonucu 22'sinde (%14,7) direkt mikroskopi ile *G. intestinalis* kist/trofozoitleri belirlenmiş, bu örneklerin tümünde ELISA ve DFA ile pozitif sonuç alınmıştır. Direkt mikroskobide *G. intestinalis* belirlenemeyen 128 dışkı örneğinin 6'sında (%4,68) ELISA, 4'ünde (%3,12) DFA ile *G. intestinalis* antijenini saptamışlardır (14).

Zylberberg ve ark. (15) çalışmalarında, 2008-2015 tarihleri arasında patoloji laboratuvarına gönderilen duodenal biyopsi örneklerinde *G. intestinalis* görülme durumunu araştırmışlardır. Kayıt altına alınan %66'sı kadın, %34'ü erkek olan toplam 432.384 hastanın biyopsi örnekleri retrospektif olarak incelendiğinde, erkeklerde görülme oranının daha yüksek olduğu saptanmış ve cinsiyet arasındaki fark istatistiksel olarak karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı bulunmuştur. Ayrıca endoskopi endikasyonlarının hiçbirisinin giardiaz ile anlamlı şekilde ilişkili olmadığı tespit edilmiştir (15).

Benzer olarak bizim çalışmamızda da, endoskopi yapılan hastaların dışkılarında *G. intestinalis* görülme durumu cinsiyet yönünden karşılaştırıldığında, erkeklerde %16,7 iken kadınlarda hiç pozitif olgu saptanmamıştır. İki grup istatistiksel olarak karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

Fouad ve ark. (16), 2013 yılında Mısır'da, dispepsili hastalarda *G. intestinalis*'in varlığını araştırdıkları çalışmada, 87 kadın ve 33 erkekten oluşan 120 dispeptik hastadan endoskopi yolu ile mide ve duodenal biyopsi almışlardır. Bunun yanı sıra dışkı ve duodenal aspiratların parazitolojik incelenmesini yapmışlardır. Bu hastaların 19'unda *G. intestinalis* saptamışlardır (16).

Cryptosporidiosis, az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde ishal ile kendini gösteren sağlıklı bireylerde ise kendiliğinden iyileşen bir seyir izleyen parazitozudur. Toplu yaşanan yerlerde, hayvancılıkla uğraşanlarda ve hayvanlar ile yakın temasta olan bireylerde, nemli ve sıcak mevsimlerde sık olarak görülmektedir. Özellikle su kaynakları aracılığıyla insana bulaşmakta ve salgınlara sebep olmaktadır (17).

Çeliksöz ve Çelik (18), 2003 yılında yaptığı çalışmada 91 ishalleri, 7 malnütrisyonlu ve 3 gastroenterit ve malnütrisyonlu olmak üzere toplam 101 dışkı örneğini *Cryptosporidium* spp. sıklığını belirlemek için modifiye Kinyoun'un asit fast ve Giemsa yöntemiyle boyayarak incelemişlerdir. *Cryptosporidium* oookistleri 91 gastroenteritlinin 18'inde (%19,8), 7 malnütrisyonlu çocuğun 2'sinde (%28,6) görülürken 3 gastroenterit ve malnütrisyonlu çocuğun hiçbirinde görülmemiştir. Yaş gruplarına göre değerlendirildiğinde; 0-5 yaş grubunda %15,9, 6-10 yaş grubunda %8,3, 11-15 yaş grubunda %12,5, 16-20 yaş grubunda %50, 21-25 yaş grubunda %33,3, 26-30 yaş grubunda %33,3, 31-35 yaş grubunda %50, 36-40 yaş grubunda %33,3 ve 41 ve üzerindeki yaş grubunda ise %7,7 oranında *Cryptosporidium* spp. saptanmıştır (18). Bizim çalışmamızda, endoskopi yapılan hastalardan alınan dışkı örneklerinde 17-35 yaş arasında %7,7, 36-54 yaş arasında %5, 55-77 yaş arasında %12,5 pozitif saptanmış olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p=0,715$). Kolonoskopi hastalarından alınan sürüntü örneklerinde 17-35 yaş %0, 36-54 yaş %15,4, 55-77 yaş %21,1 pozitif saptanmış olup istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p=0,462$).

Saleh ve ark. (19) tarafından, açıklanamayan gastrointestinal semptomlu olup, endoskopi yapılan 160 çocuk ve 90 kontrol grubu olmak üzere toplam 250 çocukta, direkt mikroskopik inceleme ve ELISA koproantijen yöntemiyle dışkıda *G. intestinalis* varlığı araştırılmıştır. Ayrıca bu hastaların için duodenal biyopsileri de incelenmiştir. Hastaların direkt dışkı incelemesi sonucu, %23,8'inde *G. intestinalis*, %37,5'inde koproantijen pozitif saptanmıştır. Endoskopik duodenal biyopsilerde hastaların %5'inde çeşitli patolojik değişikliklere ek olarak *G. intestinalis* trofozoitleri saptanmıştır. Koproantijen tespiti ile teşhis, %90,9'luk bir duyarlılıkla mikroskopik dışkı incelemesinden daha üstün olarak saptanmıştır. Duodenal biyopsi incelemesi, daha az olguda enfeksiyonu doğrulamıştır (19).

Dışkı incelemeleri negatif ancak şüphe yüksek olduğunda, önerilen tek alternatif tanı stratejisi duodenal aspirat mikroskopisi dışında, bir duodenal biyopsi örneğinden tesadüfen *G. intestinalis* teşhisi konan olgular da bulunmaktadır (20,21).

Gastrik veya duodenal biyopsi alınması, patolojiyi saptamak ve doğru tanıya ulaşmak için değerli bir araç olabilir ancak bu süreç, anestezi ve prosedürel komplikasyon riski taşıyabilir (19). Bizim çalışmamız sonucunda, biyopsiye gerek kalmadan kolayca alınabilecek yıkama/sürüntü örneklerinde parazitlerin varlığının antijen saptama yöntemleriyle hızlı ve doğru şekilde konulabileceği gösterilmiştir.

Gastrointestinal sistemin parazitler enfeksiyonları, tedavi edilmeyen hastalarda ciddi morbiditeye ve hatta ölüme yol açmaktadır. Bazı durumlarda endoskopi, bu enfeksiyonların teşhisi ve tedavisi için tek olası seçenek olabilmektedir. Azab ve ark. (22), gastrointestinal sistemin parazitler enfeksiyonları sırasında patolojik değişikliklerinin tanımlanmasında endoskopinin rolünü aydınlatmayı amaçlamıştır ve sonuç olarak endoskopik inceleme, kronik parazitler hastalıklar sırasında patolojik değişikliklerin

saptanmasında ve ayırıcı tanısında önemli bir tanı seçeneği olarak kabul edilebileceği vurgulanmıştır.

SONUÇ

Çalışmamızda endoskopi ve kolonoskopi yapılan 88 hastanın dışkısında ELISA ile *Cryptosporidium* spp. varlığı araştırılmış, kolonoskopi yapılan hastaların sürüntü materyalinde 1 (%2,6) pozitiflik saptanmıştır.

Endoskopi yapılan hastalardan alınan sürüntü örneklerinde, ELISA yöntemi ile araştırdığımız üç parazitten herhangi birine rastlanmamıştır. Endoskopi yapılan hastaların dışkı örnekleri aynı yöntemle incelendiğinde ise, 2'sinde (%2,3) *E. histolytica*, 4'ünde (%4,5) *G. intestinalis* saptanmıştır. Kolonoskopi yapılan hastaların sürüntü örneklerinin ELISA ile incelenmesi sonucunda, 6'sında (%6,8) *G. intestinalis*, 1'inde (%1,1) *Cryptosporidium* spp. pozitifliği saptanmıştır. Kolonoskopi yapılan hastaların dışkı örneklerinin ELISA yöntemi ile incelenmesi sonucunda parazit saptanmamıştır.

ELISA ile, endoskopi ve kolonoskopi yapılan hastaların yıkama/sürüntü örneklerinde *G. intestinalis* görülme durumu açısından karşılaştırıldığında iki grup arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Endoskopi yapılan hastaların dışkı örneklerinde aynı yöntemle, *G. intestinalis* görülme durumu, cinsiyet açısından istatistiksel olarak karşılaştırıldığında aradaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Endoskopi ve kolonoskopi yapılan hastalarda parazit varlığının araştırılması için, yalnızca direkt dışkı incelemesi yapılması tek başına yetersiz kalabilmektedir. Bu çalışmada, kolonoskopi yapılan ve yıkama/sürüntü örnekleri incelenen 6 hasta da *G. intestinalis* ELISA yöntemi ile saptanmasına rağmen, aynı hastaların dışkı örneklerinin mikroskopik incelenmesinde parazit görülmemiştir. Bu durum bize, kolonoskopi ve endoskopi işlemi esnasında alınabilecek basit bir yıkama ve sürüntü örneğinin parazit varlığının ortaya konmasında çok etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca kolonoskopi yapılan başka bir hastanın sürüntü örneğinde ELISA yöntemiyle *Cryptosporidium* spp. tespit edilirken, hastanın kolonoskopi raporu "Crohn hastalığı şüpheli" olarak verilmiştir. Benzer klinik belirtiler verebilen bu iki hastalığın tanısını doğru şekilde koyabilmek, işlem sırasında alınabilecek yıkama/sürüntü örneğinde parazit antijeni varlığının ELISA ile araştırılmasıyla mümkün olabilecektir.

Parazit hastalıklarından şüphelenildiği durumlarda, standart dışkı inceleme yöntemlerinin yanı sıra, endoskopi ve kolonoskopi işlemi sırasında alınacak olan yıkama/sürüntü örneklerinin, mikroskopi ve antijen arama yöntemleriyle parazitolojik açıdan incelenmesinin önemli ve doğru tanı koymada yardımcı olabileceği kanısına varılmıştır.

*Etik

Etik Kurul Onayı: Çalışmanın yapılabilmesi için Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan gerekli izin (2017-12/02) alınmıştır.

Hasta Onayı: Alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

*Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: Ö.Y., Konsept: M.T.E., S.D., Dizayn: M.T.E., S.D., Ö.Y., Veri Toplama veya İşleme: M.T.E., Analiz veya Yorumlama: S.D., Literatür Arama: M.T.E., Yazan: M.T.E., S.D.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri kapsamında, T-768 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Çeliksöz A, Demirtaş S, Sümer Z, Özçelik S, Saygı G. Sivas SHÇEK çocuk yuvasındaki çocuklarda bağırsak parazitlerinin incelenmesi. Türkiye Parazit Derg 1997; 21: 45-7.
2. Kucic CJ, Martin GL, Sortor BV. Common intestinal parasites. Am Fam Physician 2004; 69: 1161-8.
3. Kaya S, Demirci M, Demirel R, Cicioğlu Arıdoğan B, Öztürk M, Şirin C. Isparta şehir merkezinde bağırsak parazitleri prevalansı. Türkiye Parazit Derg 2004; 28: 103-5.
4. Kappus KK, Juraneck DD, Roberts, JM. Results of testing for intestinal parasites by state diagnostic laboratories, United States, 1987. MMWR CDC Surveill Summ 1991; 40: 25-46.
5. Tanyuksel M, Petri, WA. Laboratory diagnosis of amebiasis. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 713-29.
6. Özcel MA, Özbel Y, Ak M. Özcelin Tıbbi parazit hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği 2007; 279-382.
7. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic medical parasitology. Washington: DC; 2001; 131-5.
8. Ramirez NE, Ward L A, Sreevatsan S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. Microbes and Infection 2004; 6: 773-85.
9. Duque-Beltrán S, Nicholls-Orejuela RS, Arévalo-Jamaica A, Guerrero-Lozano R, Montenegro S, James, M A. Detection of Giardia duodenalis antigen in human fecal eluates by enzyme-linked immunosorbent assay using polyclonal antibodies. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97: 1165-8.
10. Gastrointestinal Sistem Endoskopisi. Erişim Adresi: URL: <https://turkcer.org.tr/files/publications/86/fbd58fceed748112cd1a7911d8df70df.pdf>
11. Malatyalı E. Yüzey Adezine Spesifik Elisa İle *Entamoeba histolytica*'nın Ayırıcı Tanısı ve Kültür Koşullarının Optimizasyonu. Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek lisans tezi. 2009; 26-51.
12. Okaygün E. Multipleks PCR Yöntemiyle Dışkıda *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba Dispar* Ayırımının Yapılması. İstanbul Üniversitesi Yüksek lisans tezi. 2009; 8-22.
13. Babić E, Bevanda M, Mimica M, Karin M, Volarić M, Bogut A, et al. Prevalence of amebiasis in inflammatory bowel disease in University Clinical Hospital Mostar. Springerplus 2016; 5: 1586.
14. Yağcı Ş, Takmaz, S, Ekşi F, Balci İ, Özen D. Comparison of direct microscopy, ELISA and direct fluorescent antibody methods for detection of *Giardia intestinalis* in human fecal specimens. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2013; 33: 1308-15.
15. Zylberberg HM, Green PH, Turner KO, Genta RM, Lebowitz B. Prevalence and predictors of Giardia in the United States. Dig Dis Sci 2017; 62: 432-40.
16. Fouad SA, Esmat S, Basyoni MM, Farhan MS, Kobaisi MH. Molecular identification of *Giardia intestinalis* in patients with dyspepsia. Digestion 2014; 90: 63-71.
17. Dağ A. Şanlıurfa Yöresinde İmmüsuprese Hastalarda *Cryptosporidium* spp. Sıklığının Kinyoun Asit-Fast Boyama Ve ELISA Yöntemleri İle Araştırılması. Harran Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2010; 8-45.
18. Çeliksöz A, Çelik S. Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesi'nde gastroenteritli ve malnütrisyonlu hastalarda *Cryptosporidium* spp. araştırması. Türkiye Parazitoloji Derg 2003; 27: 2146-3077.
19. Saleh NE, Sharaf HM, Elnemr HI, Elzeiny SM, Ali KM, Nabih N. Intestinal Giardiasis in Children Undergoing Upper Endoscopy for Unexplained Gastrointestinal Symptoms: Implication for Diagnosis. Fetal Pediatr Pathol 2022.
20. Kalas MA, Alduaj A, Alkhatib AA. Incidental Diagnosis of Duodenal Giardiasis. Cureus 2021; 13: e15499.
21. Groudan K, Gupta K, Chalhoub J, Singhania R. *Giardia lamblia* Diagnosed Incidentally by Duodenal Biopsy. J Investig Med High Impact Case Rep 2021; 9: 23247096211001649.
22. Azab HMM, Bayoumy AMS, Zaalouk TK, El-Zeairy YZ, El-Dein EMM. Endoscopic procedure as a diagnostic tool for intestinal parasitic pathological changes. Parasitol Res 2022; 121: 245-54.

Investigation of *Toxoplasma gondii* Seropositivity in Pregnant Women in Kastamonu Province, Turkey

Kastamonu İlindeki Gebelerde *Toxoplasma gondii* Seropozitifliğinin Araştırılması

Enis Fuat Tüfekci¹, Melike Yaşar Duman², Büşra Çalışır², Çetin Kılınç², Ahmet Uzel³

¹Kastamonu University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kastamonu, Turkey

²Kastamonu Training and Research Hospital, Medical Microbiology Laboratory, Kastamonu, Turkey

³Kastamonu Training and Research Hospital, Clinic of Gynecology and Obstetrics, Kastamonu, Turkey

Cite this article as: Tüfekci EF, Yaşar Duman M, Çalışır B, Kılınç Ç, Uzel A. Investigation of *Toxoplasma gondii* Seropositivity in Pregnant Women in Kastamonu Province, Turkey. Türkiye Parazitol Derg 2022;46(4):288-92.

ABSTRACT

Objective: *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) is a protozoan parasite that infects most warm-blooded animal species and causes toxoplasmosis. Especially infections that occur during pregnancy can lead to serious clinical symptoms. This study retrospectively revealed the *T. gondii* seroprevalence of pregnant women in Kastamonu province, Turkey.

Methods: Anti-*T. gondii* IgM and IgG positivity of 1.294 pregnant women between the ages of 15-44 years who applied to the Obstetrics and Gynecology Outpatients of Kastamonu Training and Research Hospital from January 2018 to January 2022 were investigated retrospectively. The IgG avidity test was performed for both anti-*T. gondii* IgM and IgG positivity.

Results: Anti-*T. gondii* IgM and IgG seropositivity were determined as 1.1% (n=14) and 20.3% (n=263), respectively. Anti-*T. gondii* IgM and IgG positivity were detected together in 11 pregnant women. IgG avidity test results of only six pregnant women could be reached, two pregnant had high IgG avidity, and four pregnant had low IgG avidity. Anti-*T. gondii* IgG positivity rate increased with increasing age (p=0.039).

Conclusion: The number of seronegative pregnant women was considered high in Kastamonu. It is significant for expectant mothers to know about prevention methods in order not to acquire toxoplasmosis.

Keywords: Pregnancy, IgG, IgM, seroprevalence, *Toxoplasma gondii*

ÖZ

Amaç: *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), çoğu sıcakkanlı hayvan türünü enfekte eden ve toksoplazmoza neden olan bir protozoon parazittir. Özellikle gebelik esnasında ortaya çıkan enfeksiyonlar ciddi klinik tablolara yol açabilir. Bu çalışmada, Kastamonu ilindeki gebe kadınlarda *T. gondii* seroprevalansının retrospektif olarak ortaya konulması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Ocak 2018-Ocak 2022 yılları arası Kastamonu Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'ne başvuran 15-44 yaş arasındaki 1,294 gebenin serum örneklerinde anti-*T. gondii* IgM ve IgG pozitifliği retrospektif olarak araştırılmıştır. Anti-*T. gondii* IgM ve IgG birlikte pozitif olan olgularda IgG avidite testi çalışılmıştır.

Bulgular: Anti-*T. gondii* IgM ve IgG seropozitifliği sırasıyla %1,1 (n=14) ve %20,3 (n=263) olarak tespit edilmiştir. On bir hastada ise anti-*T. gondii* IgM ve IgG birlikte pozitif olarak saptanmıştır. Anti-*T. gondii* IgG avidite test sonuçlarına ulaşılan altı gebeden dördünde düşük avidite, iksinde ise yüksek avidite belirlenmiştir. Anti-*T. gondii* IgG için, yaş artışı ile birlikte pozitiflik oranının arttığı tespit edilmiştir (p=0,039).

Sonuç: Kastamonu'da seronegatif gebe sayısı yüksek oranda bulunmuştur. Bu nedenle ilimizdeki anne adaylarının Toksoplazmoza yakalanmamaları adına enfeksiyondan korunma yöntemleri hakkında bilgi sahibi olmaları önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Gebelik, IgG, IgM, seroprevalans, *Toxoplasma gondii*



Received/Geliş Tarihi: 23.03.2022 Accepted/Kabul Tarihi: 28.09.2022

Address for Correspondence/Yazar Adresi: Enis Fuat Tüfekci, Kastamonu University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kastamonu, Turkey

Phone/Tel: +90 505 616 44 98 E-mail/E-Posta: etufekci@kastamonu.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0001-5051-2694

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) is a protozoan parasite that infects most warm-blooded animal species and causes toxoplasmosis. Felines act as definitive hosts and other animals as intermediate hosts in the life-cycle of the parasite. Humans are accidental intermediate hosts (1,2).

Humans become infected by consuming the oocysts of the parasite (not washing hands after contact with contaminated cat litter or soil, consuming contaminated fruits and vegetables without washing) or the undercooked meat of intermediate hosts (poultry, cattle, sheep, goat, etc.) that have bradyzoite. In addition, *T. gondii* can be transmitted from person to person by contaminated blood or tissue transplantation, as well as transplacental from mother to fetus (1,2).

Toxoplasmosis is usually asymptomatic in immunocompetent individuals (3). However, it can cause serious clinical symptoms in immunocompromised individuals and congenital toxoplasmosis (4). Congenital toxoplasmosis occurs when the mother is infected during pregnancy. The incidence and severity of congenital toxoplasmosis vary based on the period of pregnancy. Especially infections occurring in the first trimester of pregnancy may result in abortion. On the other hand, newborns are usually asymptomatic in infections occurring in the later stages of pregnancy. However, pathologies such as hydrocephalus, intracranial calcifications, chorioretinitis, hepatitis, pneumonia, myocarditis, and mental retardation may occur in the future (5).

Rapid and accurate diagnosis of toxoplasmosis in pregnant can reduce the incidence of congenital toxoplasmosis. Detection of antibodies specific to *T. gondii* in the serum samples is the primary diagnostic method used to detect toxoplasmosis (6). For example, IgM positivity alone or seroconversion in IgG titers suggests acute toxoplasmosis. Since IgG can persist for years, detecting IgG positivity alone suggests a past infection. On the other hand, since IgM positivity can persist in serum for up to one year after acute infection, the IgG avidity test should be performed when IgG and IgM are positive together. High IgG avidity indicates that the agent was encountered at least 3-4 months ago, while low IgG avidity may mean acute toxoplasmosis, and the result should be confirmed in a reference laboratory (2).

Knowing the *T. gondii* seroprevalence of pregnant women in a province can provide information about the risk of acquiring toxoplasmosis in pregnant candidates in that province (7). There is no data in the literature about *T. gondii* seroprevalence of pregnant women in Kastamonu province, Turkey. This study aimed to investigate the *T. gondii* seroprevalence of pregnant women who applied to the Obstetrics and Gynecology Outpatients of Kastamonu Training and Research Hospital (TRH).

METHODS

Study Population

The population of the study consisted of pregnant women between the ages of 15 and 44 years who applied to Kastamonu TRH the Obstetrics and Gynecology Outpatients for routine pregnancy control between January 1, 2018, and January 1, 2022. *T. gondii*-specific IgG and IgM-type antibody values of these patients were analyzed retrospectively. The first serological results belonging to the same person were evaluated.

Serological Test

Anti-*T. gondii* IgM, anti-*T. gondii* IgG and IgG avidity were determined by the chemiluminescent microparticle immunoassay method. The tests were performed using Abbott Architect i2000SR instrument (Chicago, IL, USA) per the manufacturer's instructions. The following values were considered to be negative, gray zone, and positive, respectively, in the tests: for IgM, <0.5 index, ≥0.5 - <0.6 index, and ≥0.6 index; for IgG <1.6 IU/mL, 1.6 - <3.0 IU/mL, and ≥3.0 IU/mL; for IgG avidity <50%, ≥50% - <59.9%, and ≥60%.

Statistical Analysis

The pregnant women were divided into three age groups: 15-24, 25-34, and 35-44. The distribution of seropositivity by age groups was evaluated using the Pearson chi-square test in SPSS 23.0 for Windows (IBM Inc., Armonk, NY, USA). The statistical significance was admitted as $p < 0.05$.

RESULTS

A total of 1294 pregnant women aged between 15-44 years were included in this study. The mean age of the patients was 27.6 ± 5.5 . The distribution of pregnant women by age group was as follows: 407 pregnant (31.5%) in the 15-24 age group; 732 pregnant (56.5%) in the 25-34 age group; 155 (12%) pregnant in the 35-44 age group. Anti-*T. gondii* IgM and anti-*T. gondii* IgG were positive in 14 (1.1%) and 263 (20.3%) pregnant women, respectively. Anti-*T. gondii* IgM and anti-*T. gondii* IgG positivities were detected together in 11 pregnant women (Table 1). IgG avidity test results of only six pregnant women could be reached, two pregnant had high IgG avidity and four pregnant had low IgG avidity. The anti-*T. gondii* IgG positive rate increased with age groups ($p=0.039$). The highest rate of anti-*T. gondii* IgG positivity (27.7%) was in the 35-44 age group (Table 2).

DISCUSSION

Toxoplasmosis is a parasitic zoonosis that threatens public health. In particular seronegative pregnant women are at risk due to *T. gondii* being a teratogenic pathogen. Serological tests are used in

Table 1. Seroprevalence of anti-*T. gondii* IgM and IgG in 1294 pregnant

Parameter	Positive	Gray zone	Negative
IgM	14 (1.1%)	3 (0.2%)	1277 (98.7%)
IgG	263 (20.3%)	25 (1.9%)	1006 (77.7%)
IgM+IgG	11 (0.9%)	0 (0.0%)	1283 (99.1%)

Table 2. The distribution of seropositivity in pregnant based on age groups

Parameter	Age group		
	15-24 (n=407)	25-34 (n=732)	35-44 (n=155)
	n (%)	n (%)	n (%)
IgM	6 (1.5%)	6 (0.8%)	2 (1.3%)
IgG	74 (18.2%)	146 (19.9%)	43 (27.7%)
IgM+IgG	5 (1.2%)	5 (0.7%)	1 (0.6%)

the diagnosis and follow-up of toxoplasmosis (8,9). Anti-*T. gondii* IgG is permanent for life and provides acquired immunity (2). If the anti-*T. gondii* IgG seronegativity is high in pregnant women in a region or a province, future cases of congenital toxoplasmosis may be inevitable unless necessary protective measures (giving importance to hand hygiene after contact with raw meat, soil, pets, and stray cats, consuming well-cooked meats and sanitizing vegetables and fruits, etc.) are handled (10). In particular, pet ownership or stray cat feeding can pose a risk for pregnant women. For instance, Karakavuk et al. (11) stated that more than 14.0% of stray cats were infected with *T. gondii* and they would be acted as reservoirs for humans and other warm-blooded animals in İzmir province, Turkey.

Anti-*T. gondii* IgG seropositivity in pregnant women has been reported to be about 32.9% worldwide. The highest seropositivity (45.2%) was reported from the Americas and the lowest seropositivity (11.2%) was from the western pacific region (12). *T. gondii* seroprevalence studies among pregnant women in the last ten years conducted in Turkey are summarized in Table 3. Briefly, anti-*T. gondii* IgG seropositivity has been reported in the range of 14.5-47.1% in Turkey (13-36). Anti-*T. gondii* IgG seropositivity was found at 20.3% in the presented study. The findings showed that anti-*T. gondii* IgG seropositivity seropositivity rate was lower than most studies reported in Turkey. The low rate of seropositivity in Kastamonu might be attributed to socio-cultural and socio-economic distinctions such as dietary habits as well as geographical location (37). Moreover, the anti-*T. gondii* IgG seropositivity was determined to increase with age in the current study, which was consistent with the literature (15,18,23,30,33,34). This result can be attributed to the fact that individuals are more in contact with the outdoors with increasing age, thus increasing the possibility of consuming contaminated food or being exposed to infective oocysts.

Anti-*T. gondii* IgM is used in the diagnosis of acute toxoplasmosis (2). Anti-*T. gondii* IgM seropositivity in pregnant women has been reported to be about 1.9% worldwide. The highest seropositivity (4.1%) was reported from the Eastern Mediterranean region and the lowest seropositivity (1.1%) was from the Americas (12). The anti-*T. gondii* IgM seropositivity has been reported in the range of 0.0-3.7% in studies conducted in Turkey in the last ten years (13-36). The anti-*T. gondii* IgM positivity was detected at a rate of 1.1% in this study. The results showed that the anti-*T. gondii* IgM seropositivity rate was similar to most studies reported in Turkey. However, anti-*T. gondii* IgM test may give false results in favor of acute toxoplasmosis due to its low specificity. For this, the patient's serum sample should be redrawn two weeks after the first, and it should be investigated whether there is an increase in anti-*T. gondii* IgG titers. If there is indeed an acute infection, anti-*T. gondii* IgG will begin to be detected two weeks after the first test (2). Only three patients had anti-*T. gondii* IgM positivity alone in the current study. Unfortunately, there is no information about the fate of these patients does not exist in Kastamonu TRH. On the other hand, anti-*T. gondii* IgM can persist in serum for a long time (up to 1 year) after acute toxoplasmosis. Therefore anti-*T. gondii* IgM and anti-*T. gondii* IgG positivities can be detected at the same time. Then, the IgG avidity test should be done to determine the time of infection. Detection of high IgG avidity in the first trimester of pregnancy can exclude that the toxoplasmosis occurred during pregnancy. However, the

Table 3. *T. gondii* seroprevalence in pregnant women in various provinces of Turkey in the last ten years (2012-2022)

Research	IgM %	IgG %	Period	Province	Method
Gencer et al. (13)	2.7	28.8	2012-2013	Çanakkale	ELISA
Kiriş Satılmış et al. (14)	0.2	36.9	2012-2013	Yozgat	ELFA
Bakacak et al. (15)	2.3	47.1	2012-2014	Kahramanmaraş	Microelisa
Selek et al. (16)	1.9	37.0	2012-2014	İstanbul	CMIA
Akpınar et al. (17)	1.8	28.4	2013-2014	Isparta	Macroelisa
Çalgın et al. (18)	1.6	27.6	2013-2014	Ordu	ECLIA/CMIA
Kılınç et al. (19)	1.0	23.4	2013-2014	Amasya	CMIA
Çınar Tanrıverdi et al. (20)	0.6	31.0	2013-2017	Erzurum	Macroelisa
Altunal et al. (21)	0.2	26.3	2014-2015	İstanbul	Microelisa
Kasap et al. (22)	3.7	18.8	2014-2015	Muğla	NA
Bozok (23)	1.8	46.3	2014-2017	Adana	ELISA
Aydemir et al. (24)	0.0	25.9	2015-2018	Sakarya	CMIA
Esenkaya Taşbent et al. (25)	2.7	42.4	2015-2019	Konya	ELFA
Obut et al. (26)	1.1	34.9	2016-2018	Diyarbakır	EIA
Şay Coşkun and Yılmaz Doğru (27)	2.9	23.7	2016-2018	Tokat	CMIA
Kahraman and Savcı (28)	1.0	18.9	2016-2021	Çorum	ECLIA/CMIA
Madendag et al. (29)	1.0	28.9	2017-2018	Kayseri	ELISA
Alver et al. (30)	1.7	37.9	2017-2019	Bursa	ELFA
Eroğlu and Asgin (31)	0.0	14.5	2018-2018	Karabük	CMIA
Çubuk et al. (32)	1.3	26.7	2018-2019	Sivas	EIA
Demirci and Mor (33)	0.3	44.8	2018-2019	Kars	Microelisa
Ceylan and Benli (34)	2.2	28.9	2018-2020	Muş	ELFA
Gonca et al. (35)	0.7	28.7	2019-2020	Mersin	ELFA
Takmaz et al. (36)	0.5	18.1	2019-2020	İstanbul	CMIA
In this study	1.1	20.3	2018-2022	Kastamonu	CMIA

CMIA: Chemiluminescent microparticle immunoassay method, ECLIA: Electrochemiluminescence immunoassay, EIA: Enzyme immunoassay, ELFA: Enzyme linked fluorescent assay, ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay, NA: Not available

29. Madendag Y, Erarslan Şahin M, Çöl Madendağ İ, Şahin E, Açmaz G, Müderris İİ. Investigation of toxoplasma, cytomegalovirus and rubella seroprevalence in pregnant women admitted to our hospital. *Perinatal Journal* 2018; 26: 7-10.
30. Alver O, Payaslıoğlu AM, Sağlık İ. Son iki yılda (2017-2018) Awareness, knowledge and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women in the Western Black Sea region of Turkey. *Türkiye Parazitol Derg* 2021; 45: 257-61.
31. Eroğlu S, Asgin N. Awareness, knowledge and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women in the Western Black Sea region of Turkey. *J Obstet Gynaecol* 2021; 41: 714-20.
32. Çubuk F, Hasbek M, Kafa AHT, Çelik C. Evulation of serological indicators for Toxoplasma, Rubellas virus and Cytomegalovirus infections in pregnant women applied to our hospital. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2020; 50: 211-7.
33. Demirci F, Mor N. *Toxoplasma gondii* in pregnant women in Kars province: Seroprevalance and possible risk factors. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2021; 78: 175-86.
34. Ceylan AN, Benli A. Muş ilindeki gebelerde *Toxoplasma gondii* seroprevalansının belirlenmesi. *ANKEM Derg* 2022; 36: 30-3.
35. Gonca S, Serin MS, Halepliler S, Erden Ertürk S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pregnant women admitted to a state hospital in Mersin, 2019. *Türkiye Parazitol Derg* 2021; 45: 176-80.
36. Takmaz T, Kütük MS, İşlek Taha HS, Öncü HN. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant population revisited; changing trends and call for action. *Erciyes Med J* 2021; 43: 278-81.
37. Dindar Demiray EK, Alkan S, Barutcu A, Tahmaz A. Investigating the toxoplasmosis seroprevalence in pregnant women from Turkey by pool analyses method. *Pediatr Pract Res* 2022; 10: 16-21.

Molecular Survey of *Anaplasma phagocytophilum* and Related Strains in Sheep and Goats from Sivas; with a High Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*-like 1

Sivas Koyun ve Keçilerinde *Anaplasma phagocytophilum* ve Suşlarının Moleküler Yöntemlerle Araştırılması; *Anaplasma phagocytophilum*-like 1'in Yüksek Prevalansı

Ufuk Erol, Ömer Faruk Şahin, Kürşat Altay

Sivas Cumhuriyet University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, Sivas, Turkey

Cite this article as: Erol U, Şahin ÖF, Altay K. Molecular Survey of *Anaplasma phagocytophilum* and Related Strains in Sheep and Goats from Sivas; with a High Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*-like 1. Türkiye Parazitoloj Derg 2022;46(4):293-300.

ABSTRACT

Objective: This study aimed to investigate *Anaplasma phagocytophilum* and related strains (*A. phagocytophilum*-like 1 and like 2) in sheep and goats for the first time in Sivas province with molecular techniques.

Methods: The study material was composed of 247 animal (159 sheep and 88 goats) blood samples from four districts of Sivas province (Sivas City Center, Kangal, Koyulhisar, and Yıldızeli). *A. phagocytophilum* and related strains were screened with polymerase chain reaction (PCR), PCR-RFLP, and DNA sequence analysis.

Results: *A. phagocytophilum* related strains were found in 44.93% (111/247) of the small ruminants using PCR. The infection rate was 45.91% (73/159) in sheep and 43.18% (38/88) in goats. In this study, 110 samples were positive for only *A. phagocytophilum*-like 1, while *A. phagocytophilum*-like 1 and like 2 were mix-infection in one sample. *A. phagocytophilum* was not detected in sheep or goats. Two randomly selected PCR products were sequenced in both directions, and the consensus sequences were deposited on the GenBank under accession numbers: ON598644 and ON598645. Nucleotide similarity of 99.34-100% was determined between *A. phagocytophilum*-like 1 isolates obtained in this study and those of *A. phagocytophilum*-like 1 isolates present in the GenBank database.

Conclusion: This study provides the first molecular data on *A. phagocytophilum*-like 1 and like 2 in Sivas province. Considering the high positive rate of the *A. phagocytophilum*-like 1 in sheep and goats, there is a paucity of data on clinical symptoms and vector species of the pathogen. Therefore, further studies are needed to investigate the vector tick species and clinical symptoms of the pathogen in the host.

Keywords: *A. phagocytophilum*, *A. phagocytophilum*-like 1 and 2, sheep, goat, Sivas

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada, Sivas ilinde ilk kez moleküler teknikler kullanılarak koyun ve keçilerde *Anaplasma phagocytophilum* ve ilişkili suşların (*A. phagocytophilum*-like 1 ve like 2) araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışma materyali olarak Sivas ilinin dört farklı ilçesinde (Sivas şehir merkezi, Kangal, Koyulhisar ve Yıldızeli) 247 hayvana (159 koyun ve 88 keçi) ait kan örneği kullanılmıştır. Çalışmada *A. phagocytophilum* ve ilişkili suşlar polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), PCR-RFLP ve DNA dizi analizi kullanılarak araştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmada küçük ruminantların %44,93'ünün *A. phagocytophilum* ve ilişkili suşlar ile enfekte olduğu PCR ile belirlendi. Koyun örneklerindeki enfeksiyon oranı %45,91 (73/159) iken keçi örneklerinde ise %43,18 (38/88) idi. Bu çalışmada 110 örneğin sadece *A. phagocytophilum*-like 1 ile enfekte olduğu tespit edilirken, bir örnekte ise *A. phagocytophilum*-like 1 ve like 2 tespit edildi. Koyun ve keçi örneklerinde *A. phagocytophilum* tespit edilmedi. Tesadüfi olarak seçilen iki örneğin DNA dizi analizi yapıldı ve elde edilen konsensus sekanslar GenBank'a ON598644 ve ON598645 erişim numaraları ile yüklendi. Çalışmada tespit edilen *A. phagocytophilum*-like 1 izolatları GenBank'ta bulunan *A. phagocytophilum*-like 1 izolatlarıyla nükleotid benzerliği yönünden karşılaştırıldı ve %99,34-100 oranında benzerlik tespit edildi.

Sonuç: Bu çalışma, Sivas ilinde *A. phagocytophilum*-like 1 ve like 2'nin varlığı ile ilgili ilk moleküler bilgiyi sunmaktadır. Koyun ve keçi örneklerinde *A. phagocytophilum*-like 1'in yaygın olarak bulunmasına rağmen patojenin klinik semptomları ve vektörleri



Received/Geliş Tarihi: 14.06.2022 Accepted/Kabul Tarihi: 25.08.2022

Address for Correspondence/Yazar Adresi: Ufuk Erol, Sivas Cumhuriyet University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, Sivas, Turkey

Phone/Tel: +90 506 384 15 86 E-mail/E-Posta: ufukerol@cumhuriyet.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0002-6766-1335

hakkında bilgi eksikliği bulunmaktadır. Bu nedenle bu türlerin klinik semptomlarının ve vektör türlerinin belirlenmesi amacıyla daha ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *A. phagocytophilum*, *A. phagocytophilum*-like 1 ve 2, koyun, keçi, Sivas

INTRODUCTION

Species in the genus *Anaplasma* (family: Anaplasmataceae, order: Rickettsiales) are rickettsial pathogens, and the genus comprises seven *Anaplasma* species; *Anaplasma ovis* (*A. ovis*), *A. bovis*, *A. centrale*, *A. platys*, *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, and *A. capra* (1-3). These species are obligate intracellular pathogens and invade and proliferate in the host cell of tick and vertebrate hosts (1,4).

Anaplasma species are transmitted to the host via biological and mechanical vectors (1,5,6). While biological transmission occurs by different Ixodid tick species, mechanical transmission can occur via blood-feeding arthropods and blood-contaminated fomites (1,5). Cellular tropism, geographical distribution, host range, vector species, and clinical symptoms may change according to *Anaplasma* species (5,7). *Anaplasma phagocytophilum* invades neutrophil granulocytes of the hosts and the species causes infection in a wide range of vertebrates such as cattle, horses, dogs, sheep, goats, and also humans (1,5,8). Hyperthermia, leukopenia, thrombocytopenia, depression, lack of appetite, reduced milk production, and abortion are associated with *A. phagocytophilum* infection in ruminants (5,8,9).

In recent years, with the increment in the use of molecular diagnostic techniques, studies on the genetic diversity of pathogens, such as *Anaplasma* species, have increased (2,3,6,10-12). The molecular studies revealed that high genetic diversity is present in *A. phagocytophilum* (7,8). Furthermore, two different *Anaplasma* strains, which are genetically related to *A. phagocytophilum* (*A. phagocytophilum*-like 1 and like 2), were documented in different parts of the world on the basis of different gene sequences, such as 16S rRNA, *groEL*, and *gltA* (2,10,13,14). *A. phagocytophilum*-like 1 was detected in cattle, sika deer (*Cervus nippon*), and different tick species from Japan (13,15-17). Recently, in China, another *A. phagocytophilum*-like 2 was identified in *Hyalomma asiaticum* obtained from cattle and sheep (14). To date, *A. phagocytophilum*-like 1 and like 2 have been documented in sheep, goats, cattle, and various tick species from different parts of the world such as Japan, China, Tunisia, South Korea, Italy, Turkey, and Kyrgyzstan (2,10,11,13,18-23).

In Turkey, various *Anaplasma* species, such as *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. ovis*, and *A. capra*, have been well documented in cattle, sheep, goats, and tick species (3,12,24-26). But very few studies are available on *A. phagocytophilum* related strains in Turkey (21,22). In these studies, *A. phagocytophilum*-like 1 was found in sheep, goat, and cattle (21,22) whereas *A. phagocytophilum*-like 2 was detected in cattle in Turkey (21). Climate, geographical features, and vegetation of Sivas province supply an appropriate habitat for vector species such as ticks and blood-sucking flies which are mechanic and biological vectors of *Anaplasma* species to maintain their presence. But there is limited information on the presence and distribution of *Anaplasma* species in Sivas province (3,25,27). According to the literature reviews, there is no data on *A. phagocytophilum* and related strains in sheep and goats in the city. The purpose of this study was to investigate presence of *A. phagocytophilum* and related strains in sheep and goats for the first time in different district of Sivas province using conventional polymerase chain reaction (PCR), PCR-RFLP, and DNA sequencing analysis.

METHODS

Study Area and Samples

Turkey has a unique geographical location that lies between Asia and Europe. This location supplies a natural bridge for transfer of different pathogens between the continents of Europe and Asia (28). Turkey has seven geographic regions, and these regions are named Eastern Anatolia, Southeastern Anatolia, Mediterranean, Aegean, Marmara, Black Sea, and Central Anatolia, respectively (Figure 1). Sivas is the second-largest city in Turkey and is located in the Central Anatolia region. The city lies at the intersection of Central Anatolia, Eastern Anatolia, and the Black Sea regions of Turkey (Figure 1).

The study material was consisted of 159 sheep and 88 goats blood samples from four districts of Sivas province (Sivas City Center, Kangal, Koyulhisar, and Yıldızeli) (Table 1). Sheep and goats sampled in this study were apparently healthy.

Table 1. Prevalence and distribution of *A. phagocytophilum* and related strains according to sampling area

Host	Distinct	No. of tested animals	No. of positive animals (%)
Sheep	Sivas city center	33	17 (51.51%)
	Koyulhisar	35	14 (40.00%)
	Yıldızeli	44	24 (54.54%)
	Kangal	47	18 (38.29%)
Sheep total		159	73 (45.91%)
Goat	Sivas city center	12	8 (66.66%)
	Koyulhisar	25	7 (28.00%)
	Yıldızeli	32	17 (53.12%)
	Kangal	19	6 (31.57%)
Goat total		88	38 (43.18%)

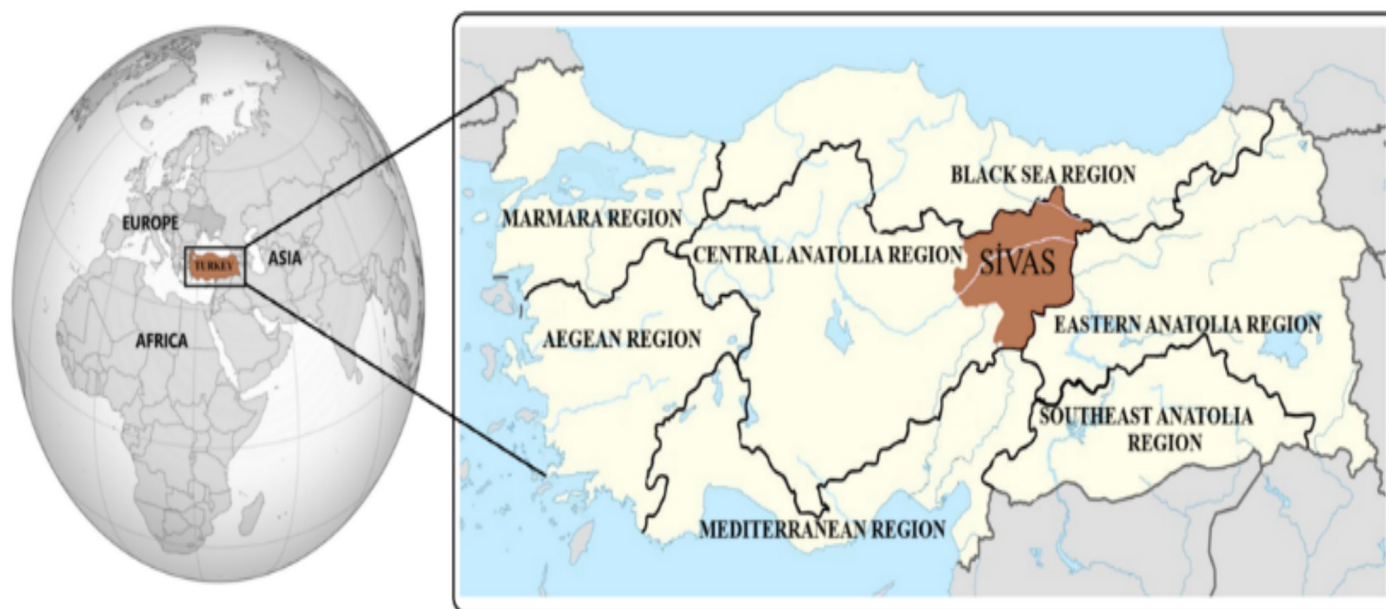


Figure 1. Location of Turkey and Sivas province

Genomic DNA Extraction and Detection of *A. phagocytophilum* and Related Strains (*A. phagocytophilum*-like 1 and 2) with PCR Analyses

Genomic DNA was extracted from the EDTA-treated blood samples using a PureLink Genomic DNA kit (Cat. no.: K1820-02, Invitrogen, Carlsbad, USA) following the manufacturer's instructions. DNA of *A. phagocytophilum* and related strains (*A. phagocytophilum*-like 1 and 2) were screened using forward SSAP2F and reverse SSAP2R primers amplifying 641-642 bp parts of the 16S rRNA gene in PCR (29). PCR was performed in a final volume of 25 µL, including DNase-RNase-free sterile water (Cat no.: 129114, Qiagen®, Germany), 10×PCR buffer (Thermo Scientific™, Lithuanian), MgCl₂ (25 mM) (Thermo Scientific™, Lithuanian), 200 µM of each dNTP (Cat.No.: R0181, Thermo Scientific™, Lithuanian), 1.25 U of Taq DNA polymerase (Cat. no.: EP0402, Thermo Scientific™, Lithuanian), 1 µL (10 pmol/µL) of each of the primers, and 2.5 µL template DNA. PCR assay was utilized by described protocol of Kawahara et al. (29). DNase-RNase-free sterile water (Qiagen®, Germany) and genomic DNA of *A. phagocytophilum* (GenBank accession no: MW672121) were used as negative and positive controls in the PCR assay. The PCR products were screened by electrophoresis in 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide at 90 V for 60 minutes. PCR products of positive reactions were stored at -20 °C for PCR-RFLP analysis.

Determination of *A. phagocytophilum* and Related Strains (like 1 and like 2) with Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Anaplasma phagocytophilum and *A. phagocytophilum*-like strains were determined with PCR-RFLP based on 16S rRNA following the described protocol of Ben Said et al. (10). Briefly, target amplicons were digested with XcmI (New England Biolabs®, UK) and BsaI (New England Biolabs®, UK) restriction enzymes. The XcmI restriction enzyme was used for discrimination of *A. phagocytophilum* and *A. phagocytophilum*-related strains. The XcmI enzyme digests the *A. phagocytophilum*, and the expected band profiles in this process are 297 and 344 bp, but the enzyme does

not cut *A. phagocytophilum* related strains. The BsaI restriction enzyme was used to discriminate *A. phagocytophilum*-like 1 and like 2. *A. phagocytophilum*-like 2 is digested with BsaI enzyme, and the expected band profiles are 219 and 422/423 bp. In the case of co-infections with *A. phagocytophilum*-like 1 and 2, band profiles of 219, 422/423, and 641/642 bp are expected in BsaI restriction (10,21). Restriction fragments were visualized after the electrophoresis process at 100V for 60 min in 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

Sequencing and Phylogenetic Analyses of *A. phagocytophilum*-like 1

To confirm PCR-RFLP result, randomly selected two PCR products were sequenced with SSAP2F and SSAP2R primers (29). Sequencing in both directions was done using an ABI 3730XL analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) and a BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA).

The sequences were edited and assembled using MEGA-X software (30). Sequences were aligned to additional reference sequences obtained from GenBank using MUSCLE algorithm in MEGA-X software (30). The consensus sequences were compared for similarity to the sequences present in the GenBank database using BLAST. All consensus sequences were deposited to the GenBank and their accession numbers were obtained. The phylogenetic tree was interfered with maximum likelihood analysis in MEGA-X (30). The best-fit model for maximum likelihood was considered as the Kimura-2 parameter model (31) using the Find Best-Fit Substitution Model in MEGA-X (30). Bootstrap values were performed with 1,000 replicates.

Ethics statement: The Sivas Cumhuriyet University Animal Experiments Local Ethics Committee (approval number: 12.07.2021-573).

Statistical Analysis

Statistical analyses among various parameters were performed using the chi-square test. $P \leq 0.05$ was accepted to be statistically significant.

RESULTS

Overall, 111 (44.93%) of the 247 animals were found to be positive for *A. phagocytophilum* and related strains with conventional PCR in different parts of Sivas province. The PCR positivity in sheep and goat samples were 45.91% (73/159) and 43.18% (38/88), respectively. Yıldızeli was the sampling area where *A. phagocytophilum* related strains were most common in sheep samples, while Sivas city center was in goat samples (Table 1). There were no statistically significant differences ($p \geq 0.05$) between sheep and goats, and between sampling areas in terms of *A. phagocytophilum* related strains.

According to PCR-RFLP analysis, 110 samples were positive for only *A. phagocytophilum*-like 1, whereas one sheep sample obtained from Sivas city center was found mix-infected with *A. phagocytophilum*-like 1 and *A. phagocytophilum*-like 2. *A. phagocytophilum* was not found in sheep and goat samples in this study (Figure 2).

To confirm RFLP results, randomly selected two positive PCR products were sequenced and aligned with *A. phagocytophilum* and related strains sequences present in the GenBank. The consensus sequences uploaded to the GenBank under accession numbers ON598644 (*A. phagocytophilum*-like 1 sheep isolate) and ON598645 (*A. phagocytophilum*-like 1 goat isolate). The sequences obtained in this work shared 100% similarities with each other. In addition, these sequences were 99.34-100% similar to *A. phagocytophilum*-like 1 sequences available in GenBank. Our sequences were 100% identical to the goat isolate from Turkey (accession number: JF807994), cattle isolate from Kyrgyzstan (accession number: MW811655), and goat isolate from China (accession number: MN922957). *A. phagocytophilum*-like 2 positive sample was not sequenced due to being co-infected with *A. phagocytophilum*-like 1.

The phylogenetic analysis of 16S rRNA clustered our samples with *A. phagocytophilum*-like 1 isolates from several countries

including Turkey in ML tree. Phylogenetic analyses also revealed close relationship between *A. phagocytophilum*-like 1 and *A. phagocytophilum*-like 2 cluster and the position of *A. phagocytophilum* cluster as a sister taxon to the *A. phagocytophilum*-like clusters. (Figure 3). Nucleotide differences between *A. phagocytophilum* and *A. phagocytophilum*-related strains (like 1 and like 2) according to partial sequences of the 16S rRNA gene were shown in Table 2.

DISCUSSION

Turkey is one of the important countries for sheep and goat breeding in the world, and approximately 45 million sheep and 11.5 million goats are present in the country. There are 836,673 sheep and 64,359 goats in Sivas and the city is known to be one of the important small ruminant breeding centers in Turkey (38). *A. phagocytophilum* is the etiological agent of tick-borne fever or pasture fever in sheep and goats and the pathogen has worldwide distribution (5,6,8). In Turkey, *A. phagocytophilum* has been detected in sheep and goats (24,26,39,40). Recently, studies have indicated that there are two strains genetically related to the *A. phagocytophilum* (like 1 and like 2), and that these strains circulate in different hosts including sheep and goats in around the world (10,11,18,22). There is a paucity of information on the presence and prevalence of *A. phagocytophilum* related strains in sheep and goats in Turkey. In this study, *A. phagocytophilum* and related strains were researched among sheep and goats in different parts of Sivas province with conventional PCR, PCR-RFLP, and DNA sequencing analysis.

The microscopic, serological, and molecular techniques have been used for the detection of *Anaplasma* species in hosts (1,5). Molecular techniques have been more preferred than other identification techniques because molecular techniques have greater specificity (10,12,25,40). In this study, *A. phagocytophilum* and related strains were investigated with PCR. *A. phagocytophilum* related strains were detected in 44.93% (111/247) of the sheep and goats. In the current study, the infection rates were slightly higher in sheep samples (45.91%) than in goat samples (43.18%). In sheep, the prevalence of *A. phagocytophilum* related strains was higher than the prevalence in Tunisia (7.7%) (18), Kyrgyzstan (6.9%) (unpublished data), Turkey (27.0%) (22), Italy (45.61%) (11), and China (35.1%) (37) and was lower than in Tunisia (100%) (11). The prevalence of these strains in goat samples was lower than in Tunisia (47.5-87.6%) (18,11) and Italy (44.6%) (11) but higher than in Turkey (26.3%) (22) and China (26.4%) (37). The prevalence of the tick-borne pathogens, like *A. phagocytophilum* related strains, may change the management systems of animals (barn or pasture), sampling season, the climate of the sampling areas, age of the animals, and mostly the presence and distribution of tick species in the sampling areas (5,20,41). Moreover, studies have indicated that even the prevalence of tick-borne pathogens in samples collected from several parts of a province may be different (6,11,18,22). In this work, it was determined that *A. phagocytophilum* related strains were most prevalent in Yıldızeli and Sivas city center in sheep and goat samples, respectively (Table 1). We speculated that this result could be related with higher presence and wider distribution of competent tick species, that might act as vectors of *A. phagocytophilum* related strains, in Yıldızeli and Sivas city centers than in other sampling areas.

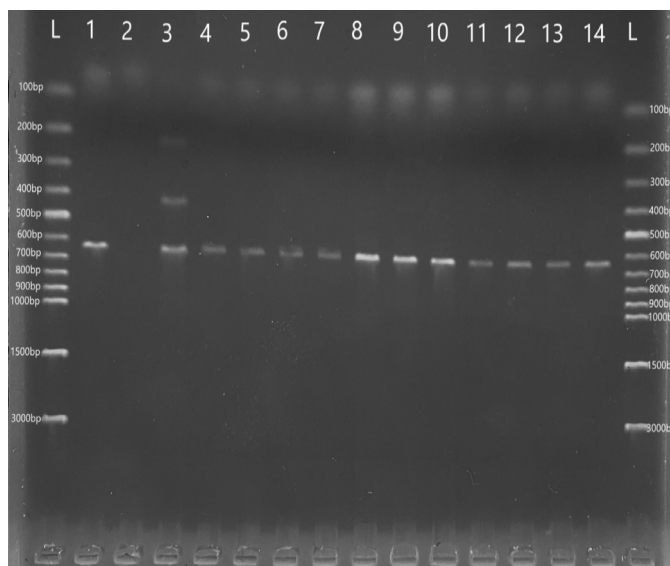


Figure 2. RFLP band profiles of 16S rRNA PCR positive amplicons digested with restriction enzymes. L. Ladder. 1. *A. phagocytophilum*-like 1 positive control, 2. Negative control, 3. Mixed-infection with *A. phagocytophilum*-like 1 and like 2, 4-14. *A. phagocytophilum*-like 1 positive samples PCR: Polymerase chain reaction

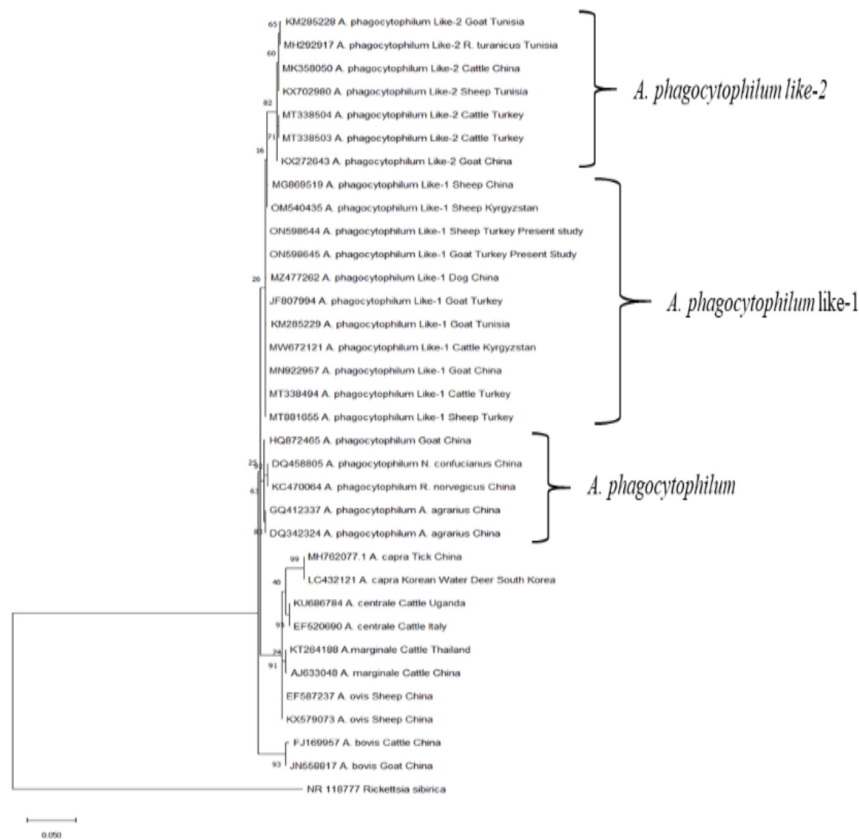


Figure 3. Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences of *A. phagocytophilum*, *A. phagocytophilum* related strains, and other *Anaplasma* species using the maximum likelihood method. Numbers at the nodes represent the bootstrap values with 1,000 replicates. The evolutionary history was inferred by using the maximum likelihood method and Kimura 2-parameter model (31). Scale bar represents 0.05 substitutions per nucleotide position. *Rickettsia sibirica* (accession number: NR118777) was used as an outgroup in the tree. Evolutionary analyses were conducted in MEGA-X (30)

Based on PCR-RFLP results, *A. phagocytophilum*-like 1 was found in 110 samples. Mixed infections with *A. phagocytophilum*-like 1 and like 2 were detected in one sheep sample. *A. phagocytophilum* was not found in sheep and goat samples in this study. *A. phagocytophilum*-like 1 and like 2 were evaluated as non-pathogenic species in farm animals because there are no clinical symptoms in infected animals (10,11,18,21). The sheep and goats infected with these strains did not show clinical symptoms associated with anaplasmosis, and this was compatible with previous studies. But it is known that *Anaplasma* species can cause subclinical infections (5,8), and these two strains have been newly discovered and there are lack of information about them (2,10,13,14,17). Therefore, it is thought that experimental studies are needed to investigate the clinical infection of two strains in animals and their economic impact on small ruminant production industries. In addition, it is necessary to investigate the vectors species and the zoonotic potential of these novel strains.

DNA sequence analysis has been used in studies for different objectives, such as confirmation of PCR results, determination of phylogenetic positions and genetic diversity of pathogens, and also the assignation of novel genotypes or species (2,3,10,13,14,22). DNA sequence analysis was used in this study verifying PCR-RFLP results. The consensus sequences, obtained in this study after DNA sequence analysis, shared 99.34-100% nucleotide similarity with the available *A. phagocytophilum*-like 1 sequences in GenBank. Furthermore, our sequences were showed

100% nucleotide similarity with *A. phagocytophilum*-like 1 isolates from Turkey (JF807994), Kyrgyzstan (MW811655), and China (MN922957). The phylogenetic tree based on partial sequences of 16S rRNA gene also indicated that our sample clustered in *A. phagocytophilum*-like 1 group (Figure 3). In addition, the nucleotide differences, which are present in the 16S rRNA gene between *A. phagocytophilum* and related strains, were also determined in this study (Table 2). According to the nucleotide difference table, *A. phagocytophilum* is genetically more similar to *A. phagocytophilum*-like 1 than *A. phagocytophilum*-like 2.

CONCLUSION

This study provides the first molecular data on the distribution and prevalence of *A. phagocytophilum*-like 1 and like 2 in sheep and goats in Sivas province. *A. phagocytophilum*-like 2 was reported for the first time in sheep for in Turkey with the current study. Furthermore, molecular studies have revealed that genetically related strains with *A. phagocytophilum* have a high prevalence in farm animals. But there is still a lack of information on the clinic manifestation, potential vectors, and zoonotic potential of *A. phagocytophilum* related strains.

Acknowledgements: The authors would like to thank all veterinarians and technicians for their kind help during sample collection.

* Ethics

Ethics Committee Approval: The Sivas Cumhuriyet University Animal Experiments Local Ethics Committee (approval number: 12.07.2021-573).

Informed Consent: In the study, with the permission of the animal owners, samples were collected and used in the study.

Peer-review: Internally peer-reviewed.

* Authorship Contributions

Concept: U.E., K.A., Design: U.E., K.A., Data Collection or Processing: U.E., Ö.F.Ş., K.A., Analysis or Interpretation: U.E., Ö.F.Ş., K.A., Literature Search: U.E., Ö.F.Ş., K.A., Writing: U.E., Ö.F.Ş., K.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

- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 2145-65.
- Altay K, Erol U, Sahin OF, Aytmirzakizi A. First molecular detection of *Anaplasma* species in cattle from Kyrgyzstan; molecular identification of human pathogenic novel genotype *Anaplasma capra* and *Anaplasma phagocytophilum* related strain. *Ticks Tick Borne Dis* 2022; 13: 101861.
- Altay K, Erol U, Sahin OF. The first molecular detection of *Anaplasma capra* in domestic ruminants in the central part of Turkey, with genetic diversity and genotyping of *Anaplasma capra*. *Trop Anim Health Prod* 2022; 54: 129.
- Kocan KM, de la Fuente J, Cabezas-Cruz A. The genus *Anaplasma*: new challenges after reclassification. *Rev Sci Technol* 2015; 34: 577-86.
- Stuen S, Granquist EG, Silaghi C. *Anaplasma phagocytophilum*—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol* 2013; 3: 31.
- Ben Said M, Belkahia H, Messadi L. *Anaplasma* spp. in North Africa: a review on molecular epidemiology, associated risk factors and genetic characteristics. *Ticks Tick Borne Dis* 2018; 9: 543-55.
- Battilani M, De Arcangeli S, Balboni A, Dondi F. Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. *Infect Genet Evol* 2017; 49: 195-211.
- Woldehiwet Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol* 2010; 167: 108-22.
- Aktas M, Özübek S. Bovine anaplasmosis in Turkey: First laboratory confirmed clinical cases caused by *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Microbiol* 2015; 178: 246-51.
- Ben Said M, Belkahia H, El Mabrouk N, Saidani M, Ben Hassen M, Alberti A, et al. Molecular typing and diagnosis of *Anaplasma* spp. closely related to *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants from Tunisia. *Ticks Tick Borne Dis* 2017; 8: 412-22.
- Zobba R, Ben Said M, Belkahia H, Pittau M, Cacciottio C, Parpagliaa MLP, et al. Molecular epidemiology of *Anaplasma* spp. related to *A. phagocytophilum* in Mediterranean small ruminants. *Acta Trop* 2020; 202: 105286.
- Aktas M, Altay K, Dumanli N. Molecular detection and identification of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in cattle from Turkey. *Ticks Tick Borne Dis* 2011; 2: 62-5.
- Ybañez AP, Matsumoto K, Kishimoto T, Inokuma H. Molecular analyses of a potentially novel *Anaplasma* species closely related to *Anaplasma phagocytophilum* detected in sika deer (*Cervus nippon yessoensis*) in Japan. *Vet Microbiol* 2012; 157: 232-6.
- Kang YJ, Diao XN, Zhao GY, Chen MH, Xiong Y, Shi M, et al. Extensive diversity of Rickettsiales bacteria in two species of ticks from China and the evolution of the Rickettsiales. *BMC Evol Biol* 2014; 14: 167.
- Ohashi N, Inayoshi M, Kitamura K, Kawamori F, Kawaguchi D, Nishimura Y, et al. *Anaplasma phagocytophilum*-infected ticks, Japan. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1780-3.
- Jilintai SN, Hayakawa D, Suzuki M, Hata H, Kondo S, Matsumoto K, et al. Molecular survey for *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* infection in cattle in a pastureland where sika deer appear in Hokkaido, Japan. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62: 73-5.
- Yoshimoto K, Matsuyama Y, Matsuda H, Sakamoto L, Matsumoto K, Yokoyama N, et al. Detection of *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* DNA from *Haemaphysalis megaspinosus* in Hokkaido, Japan. *Vet Parasitol* 2010; 168: 170-2.
- Ben Said M, Belkahia H, Alberti A, Zobba R, Bousrih M, Yahiaoui M, et al. Molecular survey of *Anaplasma* species in small ruminants reveals the presence of novel strains closely related to *A. phagocytophilum* in Tunisia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2015; 15: 580-90.
- Seo MG, Ouh IO, Kwon OD, Kwak D. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum*-like *Anaplasma* spp. and pathogenic *A. phagocytophilum* in cattle from South Korea. *Mol Phyl Evol* 2018; 126: 23-30.
- Belkahia H, Said MB, Ghribi R, Selmi R, Asker AB, Yahiaoui M, et al. Molecular detection, genotyping and phylogeny of *Anaplasma* spp. in *Rhipicephalus* ticks from Tunisia. *Acta Trop* 2019; 191: 38-49.
- Aktas M, Çolak S. Molecular detection and phylogeny of *Anaplasma* spp. in cattle reveals the presence of novel strains closely related to *A. phagocytophilum* in Turkey. *Ticks Tick Borne Dis* 2021; 12: 101604.
- Aktaş M, Özübek S, Uluçşme MC. Molecular detection and phylogeny of *Anaplasma phagocytophilum* and related variants in small ruminants from Turkey. *Animals (Basel)* 2021; 11: 814.
- Yan Y, Wang K, Cui Y, Zhou Y, Zhao S, Zhang Y, et al. Molecular detection and phylogenetic analyses of *Anaplasma* spp. in *Haemaphysalis longicornis* from goats in four provinces of China. *Sci Rep* 2021; 11: 14155.
- Altay K, Dumanli N, Aktas M, Ozubek S. Survey of *Anaplasma* infections in small ruminants from east part of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2014; 20: 1-4.
- Altay K, Atas AD, Ograk YZ, Ozkan E. Survey of *Theileria*, *Babesia* and *Anaplasma* infections of cattle and ticks from Sivas region of Turkey. *Erciyes Univ Vet Fak Derg* 2020; 17: 32-8.
- Ceylan O, Byamukama B, Ceylan C, Galon EM, Liu M, Masatani T. Tick-borne hemoparasites of sheep: a molecular research in Turkey. *Pathogens* 2021; 10: 162.
- Erol U, Şahin ÖF, Altay K. First Molecular Detection and Prevalence of *Anaplasma Ovis* in Sheep and Goat in Sivas Province. *Ispen 9 th international conference on agriculture, animal sciences and rural development 2022*.p.942-52.
- Inci A, Yildirim A, Duzlu O, Doganay M, Aksoy S. Tick-Borne Diseases in Turkey: A review based on one health perspective. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10: e0005021.
- Kawahara M, Rikihisa Y, Lin Q, Isogai E, Tahara K, Itagaki A, et al. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in wild deer and ticks on two major islands in Japan. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 1102-9.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 2018; 35: 1547-9.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; 16: 111-20.
- Guo WP, Huang B, Zhao Q, Xu G, Liu B, Wang YH, et al. Human-pathogenic

- Anaplasma* spp., and *Rickettsia* spp. in animals in Xi'an, China. PLoS Negl Trop Dis 2018; 12: e0006916.
33. Zhan L, Cao WC, De Vlas S, Xie SY, Zhang PH, Wu XM, et al. A newly discovered *Anaplasma phagocytophilum* variant in rodents from southeastern China. Vector Borne Zoonotic Dis 2008; 8: 369-80.
 34. Zhan L, Cao WC, Jiang F, Zhang XA, Liu YX, Wu XM, et al. *Anaplasma phagocytophilum* from rodents and sheep, China. Emerg Infect Dis 2010; 16: 764.
 35. Cao WC, Zhan L, He J, Foley JE, De Vlas SJ, Wu XM, et al. Natural *Anaplasma phagocytophilum* infection of ticks and rodents from a forest area of Jilin Province, China. The Am J Trop Med Hyg 2006; 75: 664-8.
 36. Zhao XG, Li H, Sun Y, Zhang YY, Jiang JF, Liu W, Cao WC. Dual infection with *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in a *Rattus norvegicus*, China. Ticks Tick Borne Dis 2013; 4: 399-402.
 37. Yang J, Liu Z, Niu Q, Liu J, Han R, Guan G, et al. *Anaplasma phagocytophilum* in sheep and goats in central and southeastern China. Parasit Vectors 2016; 9.
 38. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) (2021). Erişim adresi: <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=101&locale=tr>. Erişim tarihi: 01.06.2022.
 39. Gokce H, Genc O, Akca A, Vatansever Z, Unver A, Erdogan H. Molecular and serological evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection of farm animals in the Black Sea Region of Turkey. Acta Vet Hung 2008; 56: 281-92.
 40. Benedicto B, Ceylan O, Moumouni PFA, Lee SH, Tumwebaze MA, Li J, et al. Molecular detection and assessment of risk factors for tick-borne diseases in sheep and goats from Turkey. Acta Parasitol 2020; 65: 723-32.
 41. Stuenkel S. Haemoparasites in small ruminants in European countries: Challenges and clinical relevance. Small Ruminant Research 2016; 142: 22-7.

Evaluation of Aerobic Conjunctival Flora in Patients with Demodex Blepharitis

Demodex Blefaritli Hastalarda Aerobik Konjonktival Floranın Değerlendirilmesi

● Ayten Gündüz¹, ● Ersan Ersin Demirel², ● Murat Fırat³

¹Malatya Turgut Özal University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Malatya, Turkey

²Malatya Training and Research Hospital, Clinic of Ophthalmology, Malatya, Turkey

³Malatya Turgut Özal University Faculty of Medicine, Department of Ophthalmology, Malatya, Turkey

Cite this article as: Gündüz A, Demirel EE, Fırat M. Evaluation of Aerobic Conjunctival Flora in Patients with Demodex Blepharitis. Türkiye Parazitol Derg 2022;46(4):301-6.

ABSTRACT

Objective: Demodex species are frequently found in blepharitis cases. This study aimed to compare the conjunctival flora of eyes with Demodex-positive blepharitis and Demodex-negative blepharitis with healthy individuals.

Methods: Eyelash epilation was performed to detect Demodex from 44 eyes of 44 patients with chronic blepharitis and 44 eyes of 44 healthy controls and examined under a microscope. A conjunctival swab was taken from the same eye and inoculated on eosin methylene blue agar, Sabouraud dextrose agar, chocolate agar, and 5% sheep blood agar. Aerobic conjunctival flora was evaluated among Demodex-positive blepharitis, Demodex-negative blepharitis and healthy eyes.

Results: Demodex spp. was detected in 3 (6.8%) of 44 healthy controls and 24 (54.5%) of 44 patients with blepharitis. The most frequently isolated bacteria in healthy controls were coagulase-negative Staphylococci (CNS) spp. (n=32, 72.7%), Streptococcus spp. (n=16, 36.4%), Corynebacterium spp. (n=13, 29.5%). The most frequently isolated bacteria in Demodex-positive blepharitis were CNS spp. (n=14, 58.3%), Staphylococcus aureus (n=11, 45.8%), Corynebacterium spp. (n=7, 29.2%). In Demodex-negative blepharitis, CNS (n=10, 50.0%), S. aureus (n=10, 50.0%), Corynebacterium spp. (n=5, 25.0%) were most commonly isolated. S. aureus growth was significantly increased in the Demodex negative and positive blepharitis groups compared with the healthy group (p=0.001 and p=0.002, respectively). Although CNS spp. growth decreased in both groups with Demodex-negative and positive blepharitis compared with the healthy group; the decrease was significant only in those with Demodex-negative blepharitis (p=0.045). In terms of other bacterial growth, there was no significant difference between healthy eyes and Demodex positive and negative eyes with blepharitis.

Conclusion: We found that Demodex blepharitis has no significant effect on conjunctival flora. Blepharitis itself may be the main factor in changes in the conjunctival flora.

Keywords: Demodex, blepharitis, conjunctiva, flora

ÖZ

Amaç: Demodex türleri blefarit olgularında sıklıkla bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı, Demodex pozitif ve Demodex negatif blefaritli gözlerin konjonktival florasını sağlıklı bireylerle karşılaştırmaktır.

Yöntemler: Kronik blefarit tanısı almış 44 hastanın 44 gözünden ve 44 sağlıklı kontrolün 44 gözünden Demodex spp. tespiti için kirpik epilasyonu yapıldı. Kirpikler mikroskopta incelendi. Ayrıca aynı gözlerden konjonktivadan sürüntü alındı ve eozin metilen blue agar, sabouraud dekstroze agar, çikolata agar and %5 kanlı agara ekim yapıldı. Demodex pozitif blefarit, Demodex negatif blefarit ve sağlıklı gözler arasında aerobik konjonktival flora değerlendirildi.

Bulgular: Kırk dört sağlıklı kontrolün 3'ünde (%6,8) ve 44 blefaritli hastanın 24'ünde (%54,5) Demodex spp. saptandı. Sağlıklı gözlerde en sık izole edilen bakteriler, koagülaz negatif stafilokok (CNS) (n=32, %72,7), Streptococcus spp. (n=16, %36,4) ve Corynebacterium spp. (n=13, %29,5) türleriydi. Demodex pozitif blefaritte en sık izole edilen bakteriler CNS (n=14, %58,3), Staphylococcus aureus (S. aureus) (n=11, %45,8), Corynebacterium spp. (n=7, %29,2) idi. Demodex negatif blefaritte ise en sık CNS spp. (n=10, %50,0) ve S. aureus (n=10, %50,0), Corynebacterium spp. (n=5, %25,0) izole edildi. Staphylococcus aureus üremesi Demodex negatif ve pozitif blefarit gruplarında sağlıklı gruba göre anlamlı olarak artmıştı (sırasıyla p=0,001 ve p=0,002). Demodex negatif blefaritli grupta ve Demodex pozitif blefaritli grupta koagülaz negatif Staphylococcus üremesi sağlıklı gruba göre azalırken, bu azalma sadece Demodex negatif blefaritli grupta anlamlıydı (p=0,045). Diğer bakteri üremeleri açısından, sağlıklı gözler ile Demodex pozitif ve negatif blefaritli gözler arasında anlamlı bir fark yoktu.



Received/Geliş Tarihi: 26.12.2021 Accepted/Kabul Tarihi: 19.05.2022

Address for Correspondence/Yazar Adresi: Ayten Gündüz, Malatya Turgut Özal University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Malatya, Turkey

Phone/Tel: +90 536 820 05 04 E-mail/E-Posta: ayteengunduz@hotmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0003-2031-9978

Sonuç: *Demodex* blefaritinin konjonktival flora üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığını tespit ettik. Blefaritin kendisi, konjonktival floradaki değişimi belirlemede ana faktör olabilir.

Anahtar Kelimeler: *Demodex*, blefarit, konjonktiva, flora

INTRODUCTION

Blepharitis is a condition characterized by inflammation of the eyelid margin, which is very common in ophthalmology practice. The effects of bacteria on the pathogenesis of blepharitis have been demonstrated frequently (1,2). Determining the types of bacteria is important for an effective treatment. *Demodex* spp. infestation is also common in blepharitis (3). However, *Demodex* blepharitis has its own characteristics (4). It is stated that *Demodex* spp. acts as a vector for some microorganisms in blepharitis and may cause changes in the ocular flora (3,5). Especially the symbiotic relationship with *Bacillus oleronius* and its effects on blepharitis has been reported (5).

The possible effects of *Demodex* spp. on other microorganisms are essential for determining the treatment strategy, given the importance of bacteria in blepharitis treatment. We conducted this study to compare the conjunctival flora of *Demodex* blepharitis, blepharitis without *Demodex* spp. and healthy controls to determine whether there is any difference.

METHODS

This study was conducted with 44 patients with chronic blepharitis who admitted to ophthalmology outpatient clinic and 44 age- and sex-matched healthy controls. There were 14 (31.8%) women and 30 (68.2%) men in both groups with and without blepharitis. The mean age of the group with and without blepharitis was 49.5 ± 17.4 (20-80) and 49.1 ± 16.9 (21-78), respectively ($p=0.916$). Microbiological sample analysis of the patients was performed in the microbiology and parasitology laboratory. Biomicroscopic examination was performed for the diagnosis of blepharitis in the patient and control group participating in the study. Blepharitis was accepted as the presence of erythema, telangiectasia, thickening, dandruff and choleret on the eyelid margin or tarsal conjunctiva. Severity of blepharitis was roughly equal in both eyes in all patients. Those who used topical or systemic antibiotics in the last month, those who had eye surgery, and those with other infectious or inflammatory diseases on the eyelid or eye surface were excluded from the study. The control group was selected from individuals who applied to the ophthalmology clinic only for refractive reasons and were otherwise healthy. The principles of the Declaration of Helsinki were adhered to in all steps of the study. Written and verbal consent was obtained from all patients before the study. Ethical approval was obtained from the Malatya Turgut Özal University Clinical Research Ethics Committee (decision no: 2020/206).

A minimum sample size of 20 individuals in each group was calculated for 0.80 power, 0.05 type-1 error and 0.84 effect size to identify a 40% difference in bacterial growth between controls and *Demodex* blepharitis.

Firstly, flora sample was taken from right eye of the patients and controls, and then eyelash epilation was performed for *Demodex* spp. detection from upper eyelid of the same eye.

Sampling and Examination for *Demodex*

The eyelash samples were examined by a specialist medical microbiologist (A.G). Two or three eyelashes (especially those

with scale) taken from all patients with sterile forceps were quickly delivered to the laboratory in sterile sponges. Eyelashes brought to the laboratory were placed on the slide and then 2-3 drops of immersion were dropped on them and covered with a lamella. The area was scanned with x4 magnification of the microscope, and then the area was scanned with the diaphragm slightly closed at x10 and x40 magnification and the findings were noted. If one or more parasites are detected in this examination, *Demodex* spp. evaluated as positive. This review was done within an hour.

Sampling and Evaluation for Flora

The lower eyelid of the patients was pulled down slightly and flora sample was taken from the lower fornix conjunctiva with sterile swab. While taking the swab sample, care was taken to avoid touching the eyelids and eyelashes. Topical anesthetic medication was not applied to the patient for this procedure. The samples were planted in the thioglycollate broth in a short time, avoiding contamination. Then, in the microbiology laboratory, eosin methylene blue agar, sabouraud dextrose agar, chocolate agar and 5% sheep blood agar were inoculated. Media were incubated at 37 °C for 24 hours. Non-growth plates were incubated for an additional 24 hours. The incubation period of the samples planted on Sabouraud dextrose agar was extended to three weeks. Growing microorganisms were identified by standard microbiological methods.

Statistical Analysis

Statistical analysis was done with SPSS 25.0 program (Chicago, IL, USA). Results are presented as mean $\pm$ standard deviation (minimum-maximum) in measurable data. Nominal data are presented as frequency and percent. Normal distribution was evaluated with the Kolmogorov-Smirnov test. Normally distributed data were evaluated using the unpaired t-test, and non-normally distributed data were evaluated using the Mann-Whitney U test. Nominal data were evaluated using Pearson's chi-square test or Fisher's Exact test. A p-value of less than 0.05 was considered significant.

RESULTS

Demodex was observed in 3 (6.8%) samples in the group without blepharitis and in 24 (54.5%) samples in the group with blepharitis ($p<0.001$). Bacterial growth occurred in 36 (81.8%) and 38 (86.3%) samples in the group with and without blepharitis, respectively ($p=0.560$). The mean growth was 1.77 ± 1.31 (0-5) and 2.00 ± 1.29 (0-6) from each sample in the group with and without blepharitis, respectively ($p=0.411$). *Staphylococcus aureus* growth was significantly less in the group without blepharitis than with blepharitis ($p<0.001$). In other bacteria, growth numbers were similar between groups with and without blepharitis ($p>0.05$) (Table 1).

There were 61 (69.3%) samples with no *Demodex* spp. and 27 (30.7%) samples with *Demodex* spp. One to three *Demodex* parasites were detected in all patients except one patient with four *Demodex* parasites. There were 18 (29.5%) females and 43 (70.5%) males in the non-*Demodex* group, while there were 10 (37.0%) females and

17 (63.0%) males in the *Demodex* group ($p=0.484$). The mean age of the non-*Demodex* and *Demodex* groups was 48.3 ± 17.7 (21-80) and 51.5 ± 15.9 (20-71), respectively ($p=0.419$). The mean growth was 1.86 ± 1.31 (0-6) and 1.93 ± 1.29 (0-5) from each sample in the non-*Demodex* and *Demodex* groups, respectively ($p=0.787$). In the non-*Demodex* group, there were 51 (83.6%) growths in the conjunctiva samples, while in the *Demodex* group, there were growth in 23 (85.2%) samples ($p=0.560$). There was no significant difference in the number of growth of any bacteria in conjunctival flora between the *Demodex* and non-*Demodex* groups ($p>0.05$) (Table 2).

The mean age was 46.7 ± 19.4 (21-80) and 51.7 ± 15.6 (20-71) in non-*Demodex* blepharitis and *Demodex* blepharitis groups, respectively ($p=0.341$). There were 5 (25.0%) women and 15 (75.0%) men in the group with non-*Demodex* blepharitis, while there were 9 (37.5%) women and 15 (62.5%) men in the group with *Demodex* blepharitis ($p=0.375$). There was growth in 16 (80.0%) and 20 (83.3%) samples in non-*Demodex* and *Demodex* blepharitis groups ($p=1.000$). The mean growth number from each sample was 1.60 ± 1.23 (0-4) and 1.91 ± 1.38 (0-5) in non-*Demodex* and *Demodex* blepharitis groups, respectively ($p=0.437$). Yeast growth occurred in two patients with *Demodex* blepharitis

Table 1. Distribution of microorganisms in conjunctival flora according to blepharitis status

	B- n=44	B+ n=44	P
<i>Demodex</i> , n (%)	3 (6.8)	24 (54.5)	<0.001*
CNS, n (%)	32 (72.7)	24 (54.5)	0.076*
<i>S. aureus</i> , n (%)	5 (11.4)	21 (47.7)	<0.001*
<i>Corynebacterium</i> spp., n (%)	13 (29.5)	12 (27.3)	0.813*
<i>Streptococcus</i> spp., n (%)	16 (36.4)	9 (20.5)	0.098*
<i>Bacillus</i> spp., n (%)	7 (15.9)	4 (9.1)	0.334*
<i>Neisseria</i> spp., n (%)	5 (11.4)	3 (6.8)	0.713 [†]
<i>Micrococcus</i> spp., n (%)	5 (11.4)	2 (4.5)	0.434 [†]
<i>Haemophilus</i> spp., n (%)	3 (6.8)	1 (2.3)	0.616 [†]

S. aureus: *Staphylococcus aureus*, CNS: Coagulase negative *Staphylococci*, B-: Blepharitis negative, B+: Blepharitis positive, *Pearson chi-square test, [†]Fisher's Exact test

Table 2. Distribution of organisms in conjunctival flora according to *Demodex* status

	D- n=61	D+ n=27	P
CNS, n (%)	41 (67.2)	15 (55.6)	0.294*
<i>S. aureus</i> , n (%)	15 (24.6)	11 (40.7)	0.126*
<i>Corynebacterium</i> spp., n (%)	16 (26.2)	9 (33.3)	0.496*
<i>Streptococcus</i> spp., n (%)	17 (27.9)	8 (29.6)	0.866*
<i>Bacillus</i> spp., n (%)	9 (14.8)	2 (7.4)	0.492 [†]
<i>Neisseria</i> spp., n (%)	4 (6.6)	4 (14.8)	0.243 [†]
<i>Micrococcus</i> spp., n (%)	6 (9.8)	1 (3.7)	0.431 [†]
<i>Haemophilus</i> spp., n (%)	4 (6.6)	0 (0.0)	0.308 [†]

S. aureus: *Staphylococcus aureus*, CNS: Coagulase negative *Staphylococci*, D-: *Demodex* negative, D+: *Demodex* positive, *Pearson chi-square test, [†]Fisher's Exact test

and two without blepharitis. There was no yeast growth from other samples.

The four most frequently bacteria isolated in the conjunctiva of healthy eyes were coagulase-negative *Staphylococci* (CNS) (n=32, 72.7%), *Streptococcus* spp. (n=16, 36.4%), *Corynebacterium* spp. (n=13, 29.5%), *Bacillus* spp. (n=7, 15.9%). The four most frequently isolated bacteria in the conjunctiva of eyes with non-*Demodex* blepharitis are CNS (n=10, 50.0%), *S. aureus* (n=10, 50.0%), *Corynebacterium* spp. (n=5, 25.0%), *Streptococcus* spp. (n=3, 15.0%). The four most frequently isolated bacteria in the conjunctiva of eyes with *Demodex* blepharitis are CNS (n=14, 58.3%), *S. aureus* (n=11, 45.8%), *Corynebacterium* spp. (n=7, 29.2%), *Streptococcus* spp. (n=6, 25.0%), respectively (Figure 1).

S. aureus growth was significantly increased in *Demodex* and non-*Demodex* blepharitis groups compared to healthy group ($p=0.001$ and $p=0.002$, respectively), but there was no significant difference between *Demodex* and non-*Demodex* blepharitis groups ($p=0.783$). Although CNS growth decreased in both groups with *Demodex* and non-*Demodex* blepharitis compared to the healthy group, the decrease was significant only in the group with non-*Demodex* blepharitis ($p=0.045$). There was no significant difference between the groups with *Demodex* and non-*Demodex* blepharitis groups in CNS in conjunctival flora ($p=0.580$). In terms of other bacteria, there was no significant difference between healthy eyes and the groups with blepharitis with and without *Demodex* spp. ($p>0.05$) (Table 3).

DISCUSSION

Since the etiopathogenesis of blepharitis is not fully clarified, the relationship between blepharitis and microorganisms continues to be investigated. Various forms of bacteria, fungi and parasites have been isolated in blepharitis (3,6,7). The frequency and types of isolated organisms vary even in the same type of blepharitis (1,2,8). Although the increase in *S. aureus* in our study is consistent with the literature, the CNS decrease differs in general from the literature (1,2,8). The more frequent reporting of bacteria found in the skin flora in blepharitis indicates that organisms such as *Staphylococci* and *Demodex* spp. may invade the area (2). On the other hand, it is reported that environmental bacteria are frequently isolated in flora studies performed with blepharitis (3,8). Our results show that *S. aureus* and *Demodex* spp. are the most frequent organisms in blepharitis. This finding is consistent with the result often found in blepharitis (2,8,9). This situation indicates that no matter what mechanism is dominant, the microenvironment in blepharitis is most advantageous for *Demodex* spp. and *S. aureus*.

Demirkazık and Koltas (10) detected *Demodex* in 143 (42.6%) of 335 patients with a preliminary diagnosis of blepharitis, conjunctivitis, and visual impairment. In addition, it was reported in this study that the incidence of *Demodex* increased significantly with increasing age. Tanrıverdi et al. (11) detected *Demodex* in 69 (45.1%) of 153 chronic blepharitis cases, but they did not find an age-related *Demodex* increase. In our study, *Demodex* was found in 54.5% of blepharitis patients and 6.8% of healthy controls. Although the mean age of cases with *Demodex* blepharitis was higher than that of cases with non-*Demodex* blepharitis, the difference was not significant.

The fact that *Demodex* spp. may cause inflammatory effects in blepharitis with *Demodex* (12,13) and carry bacteria with it (5,14)

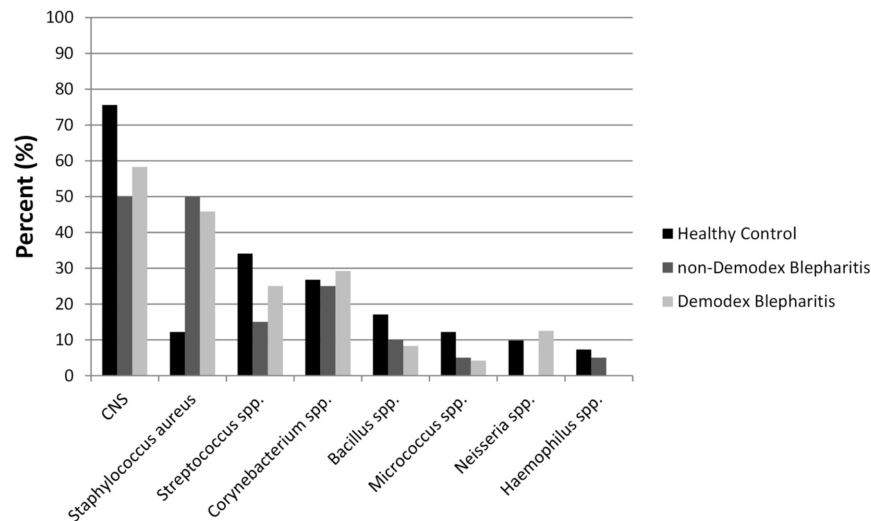


Figure 1. Growth percentages of bacteria from conjunctival samples of *Demodex* positive blepharitis cases and *Demodex* negative blepharitis cases and healthy eyes

CNS: Coagulase negative Staphylococci

Table 3. Comparison of aerobic conjunctival flora in healthy eyes, in blepharitis without *Demodex* infestation, and in blepharitis with *Demodex* infestation

	D-B-		D-B+		D+B+		
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	
CNS, n (%)	10 (24.4)	31 (75.6)	10 (50.0)	10 (50.0)	10 (41.7)	14 (58.3)	P ₁ :0.045* P ₂ :0.145* P ₃ :0.580*
<i>S. aureus</i> , n (%)	36 (87.8)	5 (12.2)	10 (50.0)	10 (50.0)	13 (54.2)	11 (45.8)	P ₁ :0.001* P ₂ :0.002* P ₃ :0.783*
<i>Coryne.</i> , n (%)	30 (73.2)	11 (26.8)	15 (75.0)	5 (25.0)	17 (70.8)	7 (29.2)	P ₁ :0.879* P ₂ :0.839* P ₃ :0.757*
<i>Strep.</i> , n (%)	27 (65.9)	14 (34.1)	17 (85.0)	3 (15.0)	18 (75.0)	6 (25.0)	P ₁ :0.117* P ₂ :0.441* P ₃ :0.477 [‡]
<i>Bacillus</i> , n (%)	34 (82.9)	7 (17.1)	18 (90.0)	2 (10.0)	22 (91.7)	2 (8.3)	P ₁ :0.704 [‡] P ₂ :0.466 [‡] P ₃ :1.000 [‡]
<i>Neisseria</i> , n (%)	37 (90.2)	4 (9.8)	20 (100)	0 (0.0)	21 (57.5)	3 (12.5)	P ₁ :0.293 [‡] P ₂ :0.703 [‡] P ₃ :0.239 [‡]
<i>Micrococ.</i> , n (%)	36 (87.8)	5 (12.2)	19 (95.0)	1 (5.0)	23 (95.8)	1 (4.2)	P ₁ :0.653 [‡] P ₂ :0.400 [‡] P ₃ :1.000 [‡]
<i>Haemo.</i> , n (%)	38 (92.7)	3 (7.3)	19 (95.0)	1 (5.0)	24 (100)	0 (0.0)	P ₁ :1.000 [‡] P ₂ :0.290 [‡] P ₃ :0.455 [‡]

S. aureus: *Staphylococcus aureus*, CNS: Coagulase negative Staphylococci, *Strep.*: *Streptococcus* spp., *Coryne.*: *Corynebacterium* spp., *Micrococ.*: *Micrococcus* spp., *Haemo.*: *Haemophilus* spp., D-B-: *Demodex* negative and blepharitis negative, D-B+: *Demodex* negative and blepharitis positive, D+B+: *Demodex* positive and blepharitis positive, (-): No growth, (+): Growth, P₁: Significance value in comparison between D-B- and D-B + groups, P₂: Significance value in comparison between D-B- and D+B + groups, P₃: Significance value in comparison between D-B+ and D+B + groups, *Pearson chi-square test, [‡]Fisher's Exact test

brings to mind its effects on other microbiological species. Zhu et al. (8) reported that the number of *Propionibacterium acnes* colonies on the lid margin and eyelashes increased significantly in patients with blepharitis and those with *Demodex* in the control group compared to those without *Demodex*. Yan et al. (3), in their study

comparing the flora of patients with *Demodex* blepharitis and healthy controls through bacterial 16S RNA, identified potential bacterial genera in *Demodex* blepharitis as *Bacilli*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Lactobacillus* and *Streptophyta* Lee et al. (15) could not find a correlation between *Demodex* and ocular microbiota,

but emphasized that the number of cases with *Demodex* was low. In our study, the growth rate of *S. aureus* was significantly increased among the *Demodex* group with blepharitis compared to the healthy group. Similarly, *S. aureus* was increased in the group with non-*Demodex* blepharitis compared to the healthy group, but the CNS were decreased. These results may indicate that the presence of *Demodex* spp. in eyes with blepharitis has no effect on bacterial flora and that the bacterial distribution is more related to blepharitis than the presence of *Demodex* spp.

In our study, *S. aureus* was found at a rate of 12% in the conjunctiva of healthy eyes, while it was detected in approximately 50% of eyes with blepharitis regardless of the status of *Demodex*. Previously, *S. aureus* was isolated as a floral element of healthy conjunctivae (16,17), while this bacterium was reported to appear at higher rates in eyes with blepharitis (8,9,15). The presence of this bacterium was not affected by *Demodex* status in our study and was isolated at a significantly increased rate in eyes with blepharitis.

The CNS is often isolated in the normal conjunctival flora (17,18). Many studies report increased CNS isolation at the conjunctiva and lid margin in blepharitis with or without *Demodex* compared to healthy controls (18). In our study, CNS isolation was found significantly higher in the conjunctiva of healthy individuals compared to those with blepharitis without *Demodex*. However, the number of CNS isolations in the conjunctiva of eyes with blepharitis with and without *Demodex* was similar. This result, which differs from other studies (9,19), indicates that the CNS, which is a normal flora component, decrease in case of blepharitis in our study, and it may indicate that the CNS as a normal flora component may be negatively affected in blepharitis. However, the finding of more pathogenic CNS in other studies may have caused this difference.

Although *Corynebacterium* spp. can be found in soil, water and plants in nature, non-pathogenic species can be found in skin and mucosa (15). Most of those found in normal conjunctiva and valve flora are lipophilic species (20). It has been isolated on the conjunctiva and eyelid margin in eyes with blepharitis (1,8,15). Bezza Benkaounha et al. (1) reported that *Corynebacterium* spp. increased significantly in eye conjunctiva with blepharitis compared to healthy controls, but stated that this increase may not necessarily be related to pathogenesis. In our study, it was the third most common bacterial in normal flora and was the least affected by blepharitis regardless of *Demodex* status. Lee et al. (15) suggested that in addition to the association of blepharitis with bacteria in the skin flora, an increased proportion of bacteria such as *Corynebacterium* species, which can be found in pollen, dust and soil particles in cases with blepharitis, may be associated with pollen, dust and soil contamination.

Although *Streptococcus* spp. are frequently isolated from the skin flora, no significant increase was found in our study. Although Zhu et al. (8) isolated it more frequently in eyes with blepharitis, they did not consider it as a pathogenic organism in blepharitis because the bacterial load of *Streptococcus* spp. did not increase significantly. *Streptococcus* spp. appear to be more associated with corneal infections and dacryocystitis than blepharitis (21).

Bacillus spp. was a relatively less common type of bacteria in our study. It has been previously reported that *Bacillus oleronius* may be in a symbiotic relationship with the *Demodex* parasite and can cause infection by being transported by the parasite and multiplying under suitable conditions (5). In other studies, it has

been reported that *Bacillus* spp. associated with *Demodex* may have an effect on the development of blepharitis and facial rosacea (22). Kıvanç et al. (23) reported that *Bacillus* spp. isolated from the conjunctiva showed antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus* species. In our study, the frequency of *Bacillus* spp. isolation from samples with *Demodex* blepharitis was similar to that of non-*Demodex* blepharitis and healthy controls. In addition, the presence of *Bacillus* spp. was not affected by the presence of *Demodex*, and no change was observed in the isolation frequency of other organisms in the presence of *Bacillus* species.

Detection and treatment of *Demodex* spp. has an important place in the treatment of blepharitis. In our study, frequent bacterial growth in *Demodex* blepharitis requires antibiotic use in addition to *Demodex* treatment. However, since the presence of *Demodex* spp. does not make a difference in bacterial distribution with non-*Demodex* blepharitis, it may not be necessary to take additional measures in antibiotic treatment for blepharitis when planning antibiotic treatment.

Study Limitations

The limitation of our study is that the ocular findings of *Demodex* blepharitis were not evaluated in relation to the presence of *Demodex* spp. and flora.

CONCLUSION

We think that *Demodex* blepharitis has no significant effect on conjunctival flora and that blepharitis itself is the main factor in determining microbial diversity.

*Ethics

Ethics Committee Approval: Ethical approval was obtained from the Malatya Turgut Özal University Clinical Research Ethics committee (decision no: 2020/206).

Informed Consent: Written informed consent was taken from all the participants.

Peer-review: Internally peer-reviewed.

*Authorship Contributions

Surgical and Medical Practices: A.G., E.E.D., Concept: A.G., E.E.D., M.F., Design: A.G., E.E.D., M.F., Data Collection or Processing: E.E.D., M.F., Analysis or Interpretation: A.G., E.E.D., M.F., Literature Search: A.G., E.E.D., M.F., Writing: A.G., M.F.

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

1. Bezza Benkaounha I, Le Brun C, Pisella PJ, Chandenier J, Lanotte P. [Bacterial flora in blepharitis]. J Fr Ophtalmol 2015; 38: 723-8.
2. Kulaçoğlu DN, Özbek A, Uslu H, Şahin F, Güllülü G, Koçer İ, et al. Comparative lid flora in anterior blepharitis. Turk J Med Sci 2001; 31: 359-63.
3. Yan Y, Yao Q, Lu Y, Shao C, Sun H, Li Y, et al. Association Between *Demodex* Infestation and Ocular Surface Microbiota in Patients With *Demodex* Blepharitis. Front Med (Lausanne) 2020; 7: 592759.
4. Kabataş N, Doğan A, Kabataş EU, Acar M, Biçer T, Gürdal C. The Effect of *Demodex* Infestation on Blepharitis and the Ocular Symptoms. Eye Contact Lens 2017; 43: 64-7.
5. Szkaradkiewicz A, Chudzicka-Strugała I, Karpiński TM, Goślińska-Pawłowska O, Tułeczka T, Chudzicki W, et al. *Bacillus oleronius* and

- Demodex mite infestation in patients with chronic blepharitis. Clin Microbiol Infect 2012; 18: 1020-5.
6. Mathew M, Kamaladevi L, Skariah C. Microbial profile of lid margin flora in anterior blepharitis as compared with normal: A comparative, descriptive study. Kerala Journal of Ophthalmology 2020; 32: 51-5.
 7. Fierro-Arias L, Araiza J, Cortés D, Hernández MA, Ponce RM, Bonifaz A. Blefaritis asociada con hongos oportunistas. Dermatología Revista Mexicana 2014; 58: 134-41.
 8. Zhu M, Cheng C, Yi H, Lin L, Wu K. Quantitative Analysis of the Bacteria in Blepharitis With Demodex Infestation. Front Microbiol 2018; 9: 1719.
 9. Dougherty JM, McCulley JP. Comparative bacteriology of chronic blepharitis. Br J Ophthalmol 1984; 68: 524-8.
 10. Demirkazık M, Koltas İS. Blepharitis Caused by *Demodex*. Türkiye Parazitol Derg 2020; 44: 21-4.
 11. Tanrıverdi C, Demirci G, Balcı Ö, Odabaşı M, Özsütçü M. Investigation of Demodex Parasite Existence in Treatment-Resistant Chronic Blepharitis Cases. Türkiye Parazitol Derg 2018; 42: 130-3.
 12. Kim JT, Lee SH, Chun YS, Kim JC. Tear cytokines and chemokines in patients with Demodex blepharitis. Cytokine 2011; 53: 94-9.
 13. Rabensteiner DF, Aminfar H, Boldin I, Nitsche-Resch M, Berisha B, Schwantzer G, et al. Demodex Mite Infestation and its Associations with Tear Film and Ocular Surface Parameters in Patients with Ocular Discomfort. Am J Ophthalmol 2019; 204: 7-12.
 14. Wolf R, Ophir J, Avigad J, Lengy J, Krakowski A. The hair follicle mites (*Demodex* spp.). Could they be vectors of pathogenic microorganisms? Acta Derm Venereol 1988; 68: 535-7.
 15. Lee SH, Oh DH, Jung JY, Kim JC, Jeon CO. Comparative ocular microbial communities in humans with and without blepharitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 2012; 53: 5585-93.
 16. Ratnumnoi R, Keorochana N, Sontisombat C. Normal flora of conjunctiva and lid margin, as well as its antibiotic sensitivity, in patients undergoing cataract surgery at Phramongkutklo Hospital. Clin Ophthalmol 2017; 11: 237-41.
 17. Gunduz G, Gunduz A, Polat N, Cumurcu BE, Yakupogulları Y. The Effect of Chronic Alcoholism on the Conjunctival Flora. Curr Eye Res 2016; 41: 734-9.
 18. Dougherty JM, McCulley JP. Bacterial lipases and chronic blepharitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 1986; 27: 486-91.
 19. Zhang SD, He JN, Niu TT, Chan CY, Ren CY, Liu SS, et al. Bacteriological profile of ocular surface flora in meibomian gland dysfunction. Ocul Surf 2017; 15: 242-7.
 20. von Graevenitz A, Schumacher U, Bernauer W. The corynebacterial flora of the normal human conjunctiva is lipophilic. Curr Microbiol 2001; 42: 372-4.
 21. Bharathi MJ, Ramakrishnan R, Shivakumar C, Meenakshi R, Lionraj D. Etiology and antibacterial susceptibility pattern of community-acquired bacterial ocular infections in a tertiary eye care hospital in south India. Indian J Ophthalmol 2010; 58: 497-507.
 22. Li J, O'Reilly N, Sheha H, Katz R, Raju VK, Kavanagh K, et al. Correlation between ocular Demodex infestation and serum immunoreactivity to Bacillus proteins in patients with Facial rosacea. Ophthalmology 2010; 117: 870-7.e1.
 23. Kıvanç SA, Takım M, Kıvanç M, Güllülü G. Bacillus Spp. isolated from the conjunctiva and their potential antimicrobial activity against other eye pathogens. Afr Health Sci 2014; 14: 364-71.

Allele Specific Polymerase Chain Reaction (AS-PCR) Assay to Detect Knockdown and Acetylcholinesterase Mutations in *Anopheles superpictus*

Anopheles superpictus'ta Knockdown ve Asetilkolinesteraz Mutasyonlarının Belirlenmesinde Allel Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (AS-PCR) Kullanılması

© Sare İlknur Yavaşoğlu, © Fatih Mehmet Şimşek

Aydın Adnan Menderes University Faculty of Science, Department of Biology, Aydın, Turkey

Cite this article as: Yavaşoğlu Sİ, Şimşek FM. Allele Specific Polymerase Chain Reaction (AS-PCR) Assay to Detect Knockdown and Acetylcholinesterase Mutations in *Anopheles superpictus*. Türkiye Parazitoloj Derg 2022;46(4):307-11.

ABSTRACT

Objective: The study aims to determine the presence of L1014F, L1014S, L1014C alleles, which are responsible for knockdown resistance and *Ace-1* G119S alleles, which are responsible for acetylcholinesterase insensitivity in *Anopheles superpictus*, the secondary vector of malaria in Turkey.

Methods: In this study, 60 *Anopheles superpictus* adult females were collected from Aydın, Denizli, and Muğla provinces. Then, allele-specific primers for *kdr* L1014F, L1014S, and L1014C alleles, and the *Ace-1* G119S allele were designed. The presence of these alleles was screened in three *Anopheles superpictus* populations by allele-specific polymerase chain reaction.

Results: Although L1014S allele frequency was too low in Aydın, Muğla, and Denizli populations, neither *kdr* L1014F and L1014C nor *Ace-1* G119S mutations were found in any population.

Conclusion: In this study, *kdr* L1014S mutation was detected for the first time in the Aegean *Anopheles superpictus* populations.

Keywords: *Anopheles superpictus*, knockdown, acetylcholinesterase, allele-specific primer

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, Türkiye'de sıtmanın ikincil vektörü olan *Anopheles superpictus*'ta knockdown direncinden sorumlu olan L1014F, L1014S, L1014C allellerinin ve asetilkolinesteraz duyarısızlığından sorumlu olan *Ace-1* G119S allellerinin varlığını tespit etmektir.

Yöntemler: Aydın, Denizli ve Muğla illerinden 20'şer adet *Anopheles superpictus* ergin dişileri toplanmıştır. Daha sonra knockdown direncinden sorumlu olan L1014F, L1014S ve L1014C allellerine ve *Ace-1* G119S alleleline özgü primerler tasarlanarak allele özgü polimeraz zincir reaksiyonu ile bu üç *Anopheles superpictus* popülasyonunda bu allellerin varlığı taranmıştır.

Bulgular: Aydın, Muğla ve Denizli popülasyonlarında çok düşük oranda L1014S mutasyonuna rastlanmakla birlikte, popülasyonların hiçbirinde ne *kdr* L1014F ve L1014C; ne de *Ace-1* G119S mutasyonuna rastlanmıştır.

Sonuç: Bu çalışmanın sonucu olarak, ilk kez *Anopheles superpictus* Ege bölgesi popülasyonlarında *kdr* L1014S mutasyonu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Anopheles superpictus*, knockdown, asetilkolinesteraz, allele özgü primer

INTRODUCTION

Mosquitoes impact on over half of the worlds' population through the transmission of harmful diseases such as malaria, dengue, encephalitis and filariasis (1). Of these, *Anopheles* mosquitoes are

responsible for the transmission of malaria all over the world. A total of 241 million malaria cases were reported globally and 627,000 people died due to malaria in 2020 (2).

Turkey had a devastating malaria history between the beginning of the First World War (1914-1918) and



Received/Geliş Tarihi: 04.01.2022 Accepted/Kabul Tarihi: 26.09.2022

Address for Correspondence/Yazar Adresi: Sare İlknur Yavaşoğlu, Aydın Adnan Menderes University Faculty of Science, Department of Biology, Aydın, Turkey

Phone/Tel: +90 506 464 44 78 E-mail/E-Posta: sarechangir@adu.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0002-9055-1556

WHO's Global Malaria Eradication Programme established in 1957 in Turkey (3). Success was maintained until about 1978s and then case numbers increased in the following years (4). Although large-scale malaria control operations were reintroduced after 1978, case numbers increased dramatically as a result of intensive DDT use and insecticide resistance in mosquito populations (5). In the following years, malaria transmission increased rapidly in the mid-1990s (6). A significant decrease in malaria cases have been succeeded in Turkey after Tashkent declaration in 2005. Finally, significant progress has been performed toward national malaria elimination by the effort of the Turkish Ministry of Health (7).

The primary vector of malaria in Turkey is *Anopheles sacharovi* while *Anopheles superpictus*, *Anopheles maculipennis* and *Anopheles subalpinus* are known as secondary malaria vectors (5). However, due to exophilic and zoophilic tendencies, the epidemiological role of *An. superpictus* in malaria transmission varies (8).

Pyrethroids (PYs) are synthetic insecticides with high activity. They act on the voltage sensitive sodium channel (VSSC) (9). When PYs are attached to VSSC, they disrupt the opening and closing kinetics of VSSC. The poisoned insect loses control of its nervous system and shows trembling behaviour which is known as the knockdown effect (10). PYs have been widely used as an effective adult and larval mosquito control (11). However, extensive PYs use has led strong selection pressure and resulted in resistance problems in different mosquito populations all around the world. Knockdown resistance (*kdr*) mutations, a target site mutation, occurs in the *vssc* gene and cause reduced susceptibility to PYs (12). So far, various *kdr* mutations have been reported from different *Anopheles* species as well as other mosquitoes (13). Molecular assays are useful tools in order to monitor the allele frequencies of target site mutations. Of these, polymerase chain reaction (PCR) based approaches are low-cost and practical ways to detect resistance alleles in mosquito populations (14).

Another target site mutation is known as *Ace-1* (G119S) mutation developed against organophosphates and carbamates. G119S mutation causes the conversion of the amino acid glycine, which encodes the active site of the enzyme, to serine and causes acetylcholinesterase insensitivity (12). To date, the G119S mutation has been reported from different *Anopheles* species including *Anopheles albimanus* and *Anopheles gambiae* (15).

This study aims to design reliable allele-specific primers (ASP) to use in allele-specific PCR (AS-PCR) to detect *kdr* L1014F, L1014S, L1014C and *Ace-1* G119S alleles in *An. superpictus* populations. Designed ASP were applied in AS-PCR to analyse *kdr* and *Ace-1* mutation frequencies in *An. superpictus* populations collected from Aydın, Muğla and Denizli provinces of Turkey. This is the first study to determine *kdr* and *Ace-1* mutation frequencies in Turkish *An. superpictus* populations.

METHODS

Allele Specific Primer Design

The ASP for detection of the wild type (Leucine-1014L) or mutated (Phenylalanine-1014F; Cysteine-1014C; Serine 1014S) *kdr* allele in position 1014 of the *vssc* gene was designed through Primer3plus software (16). A 243 base pair (bp) long partial *vssc* gene sequence of *An. superpictus*, uploaded to GenBank by Djadid et al. (17), was obtained from GeneBank (Accession number: AH014535.2). Species specific forward

(SupkdrF-5'- GGATTGAATCAATGTGGGATTGT-3') and reverse (SupkdrR-5'-AAGGATGAAGAACCGAAATTGGAC) primers were designed based on the partial sequence of *vssc* gene of *An. superpictus* obtained from GeneBank. Similarly, a 24 bp long each allele specific primers for leucine (SupkdrL₁-5'-GCTACAGTAGTGATAGGAAATTTA-3', phenylalanine (SupkdrF-5'- GCTACAGTAGTGATAGGAAATTTT-3', cysteine (SupkdrC-5'- GCTACAGTAGTGATAGGAAATTGT-3' and serine (SupkdrSer-5'- GCTACAGTAGTGATAGGAAATTCA-3' alleles were designed through Primer3Plus software.

Primers Ex3AgF:5'- GATCGTGGACACCGTGTTCG-3' and Ex3AgR:5'-AGGATGGCCCGCTGGAACAG-3' were used to amplify approximately 500 bp partial sequence of *Ace-1* gene (18). Similarly, AS (SupAceS-5'- GCTACAGTAGTGATAGGAAATTTA-3' and (SupAceR-5'- GCTACAGTAGTGATAGGAAATTCA-3' primers were designed to amplify approximately 400 bp glycine and serine alleles at positions 119 of the *Ace-1* gene.

Sample Collection and Study Area

Adult specimen collection was performed in 3 different locations from Aydın, Muğla and Denizli provinces of the Aegean region of Turkey. Sampling was performed between May-September 2018. Adult females were captured from the resting sites through aspirator. Collected samples were transferred in cages to vector insect laboratory of Aydın Adnan Menderes University. Morphological identifications have been performed through an identification key guided by Becker et al. (11). Adult mosquitoes were stored in a -20 °C until genomic DNA have been isolated. A total of 60 genomic DNA was extraction was performed from whole body of individual female mosquitoes using Invitrogen genomic DNA extraction kit (ThermoFisher Scientific, USA). The PCR assay was applied to genotype a total of 60 *An. superpictus* specimens collected from 3 sites from Aydın, Muğla and Denizli.

Detection of Alleles Using AS-PCR

Each AS-PCR for detection of *kdr* alleles was performed in a final 25 µL volume. The reaction consisted of: 1× PCR Buffer, 1.5 U DNA polymerase, 2.5 mM dNTP, 10 µM each of primers and 1.5 µL of DNA (~20-50 ng). Reaction conditions were consisted of first denaturation at 95 °C, 5 min; 40 cycles of denaturation at 95 °C, 30 s; annealing at 59 °C, 1 min; extension at 72 °C, 1 min and the finally 72 °C, 5 min. PCR products were run on 2% agarose gel for 75 min at 70 V in 1× tris borate ethylenediamine tetra acetic acid buffer and visualised under UV light. Approximately ~250 bp long fragment for control band and ~190 bp fragment for each allele was visualized if the sample had that allele (Figure 1).

Ace-1 alleles were detected by AS-PCR which was carried out in a final volume of 25 µL containing 1.5 µL 2.5 mM dNTP, 2 µL buffer, 0.2 µL 10 mM from each primer, 0.25 µL (5 U/mL) Taq DNA polymerase and 1 µL DNA. Thermal cycle programme was consisted of a first denaturation at 95 °C, 10 min; 30 cycles of denaturation at 94 °C, 30 s; annealing 56 °C, 30 s; extension 72 °C, 30 s and finally 72 °C, 10 min. PCR products were run on 1% agarose gel and visualized under ultraviolet light (Figure 2).

In order to validate the efficacy and reliability of AS-PCR, obtained PCR products were sequenced through a 3730xl capillary system automatic sequencer. Resistant (Serine-1014S) and sensitive alleles (Leucine-1014L) were deposited in GenBank (accession numbers: OP503892-OP503893) (Figure 3).

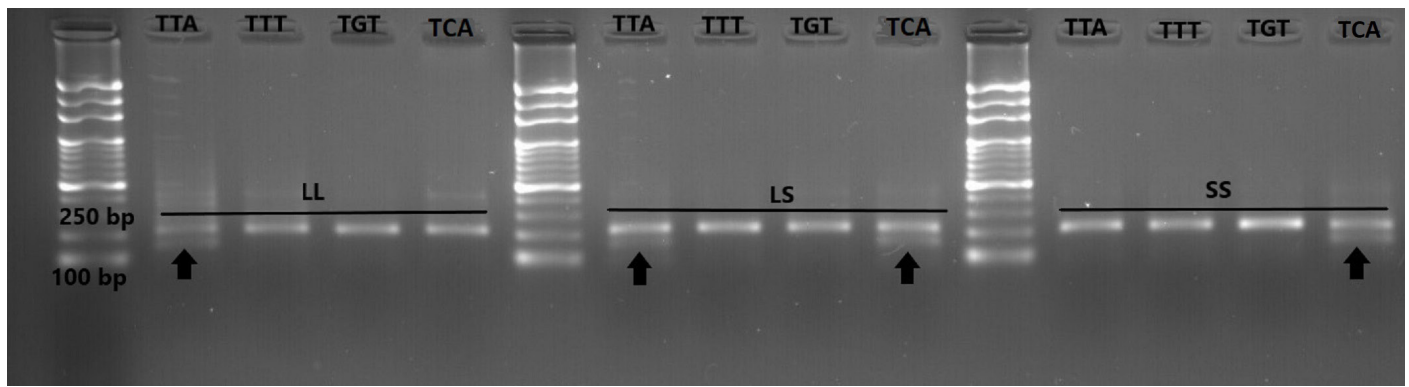


Figure 1. Agarose gel image of *vssc* gene region amplified with allele-specific primers (LL is encoded by the aminoacid homozygote Leucine (TTA/TTA); LS is encoded by Leucine and Serine (TTA/TCA); SS is encoded by homozygote Serine (TCA/TCA))

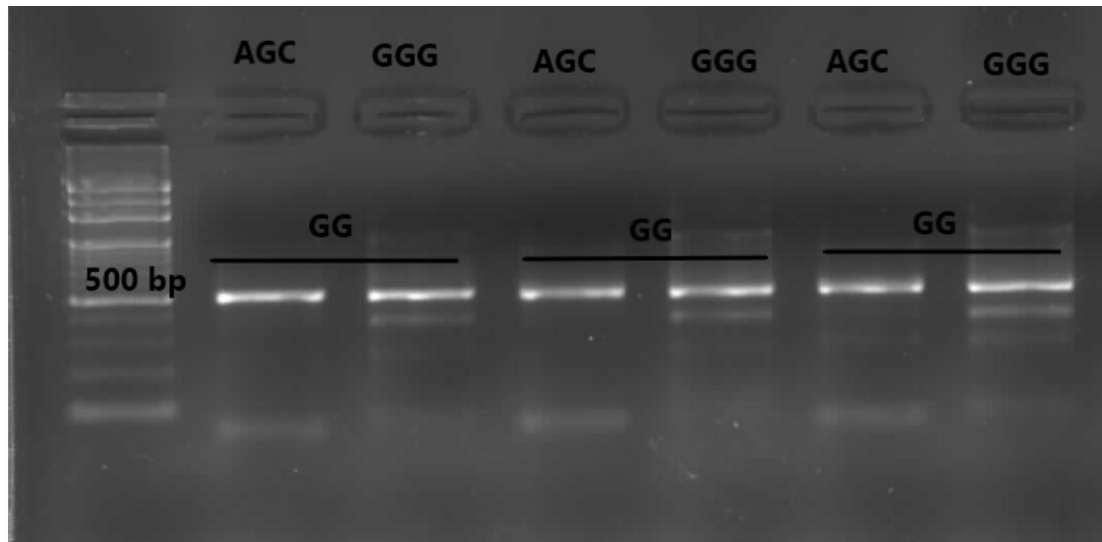


Figure 2. Agarose gel image of *Ace-1* gene region amplified with allele-specific primers (Glycine is encoded by GGG; Serin is encoded by AGC)

Statistical Analysis

Genotyping and *kdr* allele frequencies and Hardy-Weinberg expectations of each *An. superpictus* populations have been tested via exact probability test via POPGENE (19).

RESULTS

Although all L1014F, L1014C and L1014S alleles were screened in *An. superpictus* populations, only L1014S allele was found in the study area. L allele frequency was 0.8750 in the Aydın and Muğla population while S allele frequency was 0.1250 in these populations. In total, 80% and 85% of the individuals had homozygous L1014L in Aydın and Muğla populations while 15%

of the populations had heterozygous L1014L/L1014S in the populations, respectively. L allele frequency was 0.9750 in the Denizli population while S allele frequency was 0.0250. Only 5% of the population had heterozygous L1014L/L1014S while 95% of them had homozygous L1014L. All of the populations were in the Hardy Weinberg Equilibrium ($p > 0.05$) calculated based on Fisher's Exact test. The *kdr* genotype, leucine and serine allele frequencies and exact test results of each *An. superpictus* population are given in Table 1.

No *Ace-1* (serine) mutation was found either in any of the *An. superpictus* populations. All specimen had wild type *Ace-1* (Glycine) allele encoded by GGG (Figure 2).

Table 1. Genotypes, allele frequencies and Fisher's Exact test results of *vssc* gene region of *Anopheles superpictus* populations (L/L: homozygous susceptible (Leucine); S/S: homozygous resistant (Serine); LS: heterozygous resistant (Leucine/Serine))

Locality	No	Genotype			Allele frequency		p	SE	F _{is}
		LL	LS	SS	L	S			
Aydın	20	16	3	1	0.8750	0.1250	0.2472	0.0022	0.3372
Denizli	20	19	1	-	0.9750	0.0250	-	-	-0.000
Muğla	20	17	3	-	0.8750	0.1250	1.00	0.000	-0.1176



Figure 3. A partial sequence alignment of voltage-sensitive sodium channel (*vssc*) gene region in *Anopheles superpictus*. SupkdrF and SupkdrR indicates forward and reverse primers, respectively. SupkdrL and SupkdrSer indicates leucine and serine alleles

DISCUSSION

A key finding of this research is the identification of the L1014S allele in *An. superpictus* populations collected from Aydın, Muğla and Denizli. This result is a proof of the presence of this allele in *An. superpictus* populations from western Turkey. Since sample size of collected specimen is not wide enough, further studies with larger specimen numbers are needed to understand the exact frequency of resistance alleles in *An. superpictus* populations. The presence of the L1014S alleles was first described in *Anopheles sacharovi* (20). It was also reported in *An. sacharovi* populations collected from the Mediterranean and Aegean populations in Turkey (21). This is the first record of presence of the *kdr* alleles in *An. superpictus*. However, several *kdr* alleles (L1014F, L1014C, L1014W) have been detected in different mosquito populations all over the World. For instance, L1014S alleles have been reported in *Anopheles gambiae* populations in several countries including Burkina Faso (22) and Cameroon (23). The presence of this allele was reported in *Anopheles arabiensis* populations collected from Uganda (24) and Ethiopia (25). All L1014F, L10104F, L1014C and L1014W mutations have been reported in Chinese *Anopheles sinensis* populations (26).

Another important finding of the study is the lack of *Ace-1* mutation (G119S) in *An. superpictus* populations collected from the study area. The serine allele was not found in any of the samples while ASP created a band profile on agarose gel with only the GGG-encoded glycine allele. Similarly, G119S alleles have not been detected in Turkish *An. sacharovi* (20) and Iranian *An. stephensi* populations (27). However, several researchers reported the presence of G119S alleles in different *An. gambiae* populations in Mali (28), Nigeria (29) and *An. arabiensis* populations in Senegal (30).

Although this study provides useful evidence for the presence of L1014S allele in *An. superpictus* populations in the Aegean region

of Turkey, it does not allow to evaluate the frequency of the alleles and meaningful population genetic analysis due to limited sample size. Further investigation with larger specimen numbers is required to determine the geographical distribution of this allele in this geographic area. The other limitation of the study is the lack of bioassay tests to test insecticide susceptibility status of the species. Further studies should aim to detect mortality rates against different kind of insecticide with recommended insecticide dose through the susceptibility tests of World Health Organisation. It should be taken into consider that molecular analysis should be supported with bioassays to understand resistance levels and underlying mechanisms.

CONCLUSION

This study proposed a useful and practical allele specific primer to genotype L1014F, L1014C, L1014S *kdr* mutation in *An. superpictus*, a secondary malaria vector species in Turkey. The use of AS-PCR to monitor *kdr* mutation in *An. superpictus* populations might facilitate the detection of the mutation when it is in initial stage before the resistance alleles spread wider. Additionally, results also proved that *Ace-1* G119S mutation associated with acetylcholinesterase insensitivity is not detected in western Turkish *An. superpictus* populations. Regular detection of allele frequencies in vector mosquito species is of great importance to manage insecticide resistance policies at the local levels. This study is a preliminary study that proposes AS primer sequences rather than giving clear information about the *kdr* allele frequencies in Aegean region populations. Clear information about the *kdr* allele frequencies of the populations and the resistance status might be gathered by increasing the specimen numbers in future studies.

*Ethics

Ethics Committee Approval: This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.

Informed Consent: This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

* Authorship Contributions

Concept: S.İ.Y., F.M.Ş., Design: S.İ.Y., F.M.Ş., Data Collection or Processing: S.İ.Y., Analysis or Interpretation: S.İ.Y., Literature Search: S.İ.Y., Writing: S.İ.Y., F.M.Ş.

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

Financial Disclosure: This research was funded by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK, project no: 112T479).

REFERENCES

- Gubler DJ. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 442-50.
- World Health Organisation. World Malaria Report 2020. Geneva; 2020.
- World Health Organisation. Eliminating malaria. The long road to malaria elimination in Turkey. Geneva; 2013.
- Piyal B, Akdur R, Ocaktan E, Yozgatligil C. An analysis of the prevalence of malaria in Turkey over the last 85 years. *Pathog Glob Health* 2013; 107: 30-4.
- Özbilgin A, Topluoğlu S, Islek E, Mollahaliloglu E, Erkoç Y. Malaria in Turkey: Successful control and strategies for achieving elimination. *Acta Trop* 2011; 120: 15-23.
- Topluoğlu S, Karasartova D, Karaer ZK, Taylan Ozkan A. Şanlıurfa yöresindeki Anofel larvalarının morfolojik tanımlanması ve üreme alanlarının fiziksel ve ekolojik özelliklerinin araştırılması. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2020; 77: 207-16.
- World Health Organisation. World Malaria Report 2019. Geneva; 2019.
- Alten B, Çağlar SS, Ozer N. Malaria and its vectors in Turkey. *European Mosquito Bulletin* 2000; 7: 27-33.
- Brengues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Dunchon S, Guillet P, et al. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage gated sodium channel gene. *Med Vet Entomol* 2003; 17: 87-94.
- Liu N, Xu Q, Zhu F, Zhang L. Pyrethroid resistance in mosquitoes. *Insect Science* 2006; 13: 159-66.
- Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, Dahl C, Lane J, et al. Mosquitoes and Their Control. Kluwer Academic, Plenum publishers, USA, 2003.
- Hemingway J, Hawkes NJ, Mc Carroll L, Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 2004; 34: 653-65.
- Tancredi A, Papandrea D, Marconcini M, Carballar-Lejarazu R, Casas-Martinez M, Lo E, et al. Tracing temporal and geographic distribution of resistance to pyrethroids in the arboviral vector *Aedes albopictus*. *PLoS Negl Trop Dis* 2020; 14: e0008350.
- Pichler V, Mancini E, Micocci M, Calzetta M, Arnoldi D, Rizzoli A, et al. Novel Allele Specific Polymerase Chain Reaction (AS-PCR) Assay to Detect the V1016G Knockdown Resistance Mutation Confirms Its Widespread Presence in *Aedes albopictus* Populations from Italy. *Insects* 2021; 12: 79.
- Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Bertomieu A, Marquine M, Raymond M. The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol* 2004; 13: 1-17.
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: W71-4.
- Djadid ND, Jazayeri H, Gholizadeh S, Rad S, Zakeri S. First record of a new member of *Anopheles hyrcanus* Group from Iran: molecular identification, diagnosis, phylogeny, status of kdr resistance and Plasmodium infection. *J Med Entomol* 2009; 46: 1084-93.
- Dabiré RK, Namountougou M, Diabaté A, Soma DD, Bado J, Toé HK, et al. Distribution and frequency of kdr mutations within *Anopheles gambiae* populations and first report of the Ace-1 G119S mutation in *Anopheles arabiensis* from Burkina Faso (West Africa). *PLoS One* 2014; 9: e101484.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T. 1999. Popgene Version 1.32: Microsoft Window-Based Freeware for Population Genetics Analysis. University of Alberta, Edmonton.
- Lüleyap Ü, Alptekin D, Kasap H, Kasap M. Detection of knockdown resistance mutations in *Anopheles sacharovi* (Diptera: Culicidae) and genetic distance with *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) using cDNA sequencing of the voltage-gated sodium channel gene. *J Med Entomol* 2002; 39: 870-4.
- Yavaşoğlu SI, Ülger C, Şimşek FM. The first implementation of allele-specific primers for detecting the knockdown and acetylcholinesterase target site mutations in malaria vector, *Anopheles sacharovi*. *Pestic Biochem Physiol* 2021; 171: 104746.
- Namountougou M, Diabaté A, Etang J. First report of the L1014S kdr mutation in wild populations of *Anopheles gambiae* M and S molecular forms in Burkina Faso (West Africa). *Acta Trop* 2012; 125: 123-7.
- Etang J, Fondjo E, Chandre F, Morlais I, Brengue C, Nwane P et al. First report of knockdown mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74: 795-7.
- Verhaeghen K, Van Bortel W, Roelants P, Backeljau T, Coosemans M. Detection of the East and West African kdr mutation in *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* from Uganda using a new assay based on FRET/melt curve analysis. *Malar J* 2006; 5: 16.
- Yewhalaw D, Bortel WV, Denis L, Coosemans M, Duchateau L, Speybroeck N. First evidence of high knockdown resistance frequency in *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) from Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 83: 122-5.
- Tan WL, Wang MD, Liu YD, Dong XY, Feng ZM, Wu XX, et al. First detection of multiple knockdown resistance (kdr)-like mutations in voltage-gated sodium channel using three new genotyping methods in *Anopheles sinensis* from Guangxi Province, China. *J Med Entomol* 2012; 49: 1012-20.
- Soltani A, Vatandoost H, Oshaghi MA, Ravasan NM, Enayati AA, Asgarian, F. Resistance Mechanisms of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) to Temephos. *J Arthropod Borne Dis* 2014; 9: 71-83.
- Keita M, Kané F, Thiero O, Traoré B, Zeukeng F, Sodio AB, et al. Acetylcholinesterase (ace-1[®]) target site mutation G119S and resistance to carbamates in *Anopheles gambiae* (sensu lato) populations from Mali. *Parasit Vectors* 2020; 13: 283.
- Fagbohun IK, Idowu ET, Otubanjo OA, Awolola TS. First report of AChE1 (G119S) mutation and multiple resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* s.s. in Nigeria. *Scientific Reports* 2020; 10: 7482.
- Sy O, Sarr PC, Assogba BS, Ndiaye M, Dia AK, Ndiaye A, et al. Detection of kdr and ace-1 mutations in wild populations of *Anopheles arabiensis* and *An. melas* in a residual malaria transmission area of Senegal, Pesticide Biochemistry and Physiology 2021; 173: 104783.

Molecular Characterization and Expression Analysis of the Sterol-carrier Protein-2 Fragment in *Anopheles sacharovi* Generations

Anopheles sacharovi Nesillerinde Sterol Taşıyıcı Protein-2 Fragmanının Moleküler Karakterizasyonu ve Ekspresyon Analizleri

● Sümeyye Aygün, ● Önder Düzü, ● Alparslan Yıldırım

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

Cite this article as: Aygün S, Düzü Ö, Yıldırım A. Molecular Characterization and Expression Analysis of the Sterol-carrier Protein-2 Fragment in *Anopheles sacharovi* Generations. Türkiye Parazitoloj Derg 2022;46(4):312-21.

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada, *Anopheles sacharovi*'de sterol taşıyıcı protein-2 (SCP-2) geninin ilk kez moleküler karakterizasyonunun yapılması ve bu proteini kodlayan genin *An. sacharovi* gelişim dönemleri ve dişi nesillerin tükürük bezi, orta bağırsak ve yağ dokusu gibi farklı dokularında ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Sultan Sazlığı yöresinden toplanan ergin dişi *An. sacharovi* ve insektaryumda elde edilen gelişim dönemleri çalışma materyalini oluşturmuştur. Morfolojik ve moleküler tür identifikasyonu yapılan *An. sacharovi* nesilleri ve ergin dişi dokularından total RNA ekstraksiyonunu takiben cDNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. cDNA kalıplarında SCP-2 geninin 216 bp fragmenti optimize edilmiş primerlerle amplifiye edilmiş ve ampikonlar sekanslanmıştır. Sekanslar in-silico analizlerle işlenerek genetik karakterizasyonları sağlanmıştır.

Bulgular: Sekans analizine alınan toplam 14 izolata ait SCP-2 nükleotid sekanslarının 12'sinin %100 benzer olduğu, birbirine homolog olan diğer iki izolata ait SCP-2 sekanslarının ise 183. bazda tek nükleotid değişimi gösterdiği belirlenmiştir. SCP-2 gen bölgesinin 216 bp fragmentinin 72 amino asit zincirini kodladığı tespit edilmiştir. Filogenetik analiz sonucu SCP-2 gen sekanslarının sivrisinek türü ve soyu bazında monofiletik olarak kümelendiği, *An. sacharovi* izolatlarının *Anopheles* kümesi içerisinde *An. stephensi* ve *An. funestus*'la birlikte alt küme oluşturduğu görülmüştür. qPCR ekspresyon analizleri sonucunda SCP-2'nin en yüksek ergin erkeklerde ifade olduğu ve bunu sırasıyla ergin dişi, L4, L3, L2, L1 ve pupa dönemlerinin izlediği belirlenmiştir. Ergin dişi dokularında ise SCP-2'nin en yüksek, fatbody'de ifade olduğu bunu sırasıyla midgut ve tükürük bezinin izlediği belirlenmiştir.

Sonuç: Bu çalışmada, vektör potansiyeli yüksek olan *An. sacharovi* için aşı adayı veya hedef ilaç bölgelerinden önemli birisi olan SCP-2 ilk kez karakterize edilmiş ve sivrisineğin gelişim evreleri ve dokularındaki ekspresyonel farklılıklar ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Anopheles sacharovi*, sterol taşıyıcı protein-2, moleküler karakterizasyon, ekspresyon analizleri

ABSTRACT

Objective: It was aimed to characterize the sterol carrier protein-2 (SCP-2) gene in *Anopheles sacharovi* using molecular methods for the first time, and to reveal the expression levels of *An. sacharovi* in the developmental stages and female generation in different tissues such as salivary gland, midgut and adipose tissue.

Methods: The adult female *An. sacharovi* collected from the Sultan Sazlığı region and the development stages in the insectarium constituted the study material. cDNA isolation was performed following total RNA extraction from *An. sacharovi* strains. The 216 bp fragment of the SCP-2 gene was amplified with optimized primers in cDNA templates and was sequenced. Genetic characterization of the sequences was provided in silico analysis.

Results: Twelve of the SCP-2 nucleotide sequences of 14 isolates included in the sequence analysis were 100% identical and the SCP-2 sequences of the other two isolates that were homologous to each other showed a single nucleotide change at base 183. The 216 bp fragment of the SCP-2 gene region was found encoding the 72 amino acid chain. SCP-2 gene sequences clustered the isolates monophyletically on the basis of mosquito species and strains, and that *Anopheles sacharovi* isolates formed a subcluster together with *Anopheles stephensi* and *Anopheles funestus* within the *Anopheles* cluster in phylogenetic analysis. Because of q-polymerase chain reaction-mediated expression analysis, SCP-2 gene was expressed highest in adult males, followed by an adult female, ss L4, L3, L2, L1, and pupal stages, respectively. In adult female tissues, the SCP-2 gene was expressed the highest in the fat body, followed by the midgut and salivary glands, respectively.

Geliş Tarihi/Received: 25.08.2022 Kabul Tarihi/Accepted: 28.09.2022

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Önder Düzü, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye
Tel/Phone: +90 352 207 66 66 E-Posta/E-mail: onderduzlu@erciyes.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0002-6951-0901



Conclusion: SCP2, which is an important vaccine candidate or target drug site for *Anopheles sacharovi* with high vector potential, was firstly characterized in this study and the developmental stages and expression differences in the tissues of the mosquito were revealed.

Keywords: *Anopheles sacharovi*, sterol carrier protein-2, molecular characterization, expression analysis

GİRİŞ

Anopheles soyunda yer alan *Maculipennis* kompleks sibling ve kriptik türleri içerdiği anlaşılan sivrisinekler içerisinde ilk örnek olması ve medikal önemleri ile taksonomik klasifikasyon ve filogenetik ilişkiler üzerine çalışmalarda ilgi odağı olmuştur. *Maculipennis* kompleksin günümüze kadar palearktık bölgede 10'un üzerinde türü identifiye edilmiş olmakla birlikte (1) henüz ilgili coğrafik alanda genetik çeşitlilik üzerine veriler oldukça sınırlıdır. Ülkemizde günümüze kadar morfolojik analizlerle *Anopheles* soyunda 10 türün varlığı bildirilmiş olup bunlardan dördünün *Maculipennis* komplekste yer alan *An. sacharovi*, *An. maculipennis* s.s., *An. melanoon* ve *An. messeae* olduğu görülmektedir (2-5). *Anopheles sacharovi*, *An. atroparvus* ve *An. labranchiae* ile birlikte palearktık bölgede geçmişten günümüze en etkin sıtma vektörleri olarak nitelenmektedir (6-9). Türkiye (3,7), Suriye (10,11) ve Orta Doğu'nun farklı bölgelerinde (12,13) *P. vivax* malaryasının en etkin vektörü *An. sacharovi* olarak kaydedilmiştir. Ayrıca Güney Avrupa Bölgeleri'nde ana potansiyel vektör olarak da görülmektedir (8,14). *Anopheles* türlerinin vektörlüğünü yaptığı sıtmanın önlenmesindeki en kritik nokta geleneksel olarak kullanılan insektisitlerle beraber sivrisinek popülasyonlarının baskılanmasıdır (15). Ancak bu mücadelede karşılaşılan en büyük sıkıntı insektisitlere karşı gelişen direnç mekanizmasıdır (16). Bu noktada sivrisineklere karşı kolesterol alımı veya taşınması gibi yeni biyoteknolojik yaklaşımlara ihtiyaç bulunmaktadır (17). İnsektler, tüm ökaryotlar gibi yapısal ve metabolik amaçlar için sterollere ihtiyaç duyarlar. Ancak insektler, tüm artropodlar gibi kolesterol sentez aşamasında anahtar enzimlerden yoksun oldukları için sterol üretmezler ve bu ihtiyaçlarını dışardan karşılamak zorundadırlar (18).

İnsektler kolesterole bağımlıdırlar, çünkü kolesterol olmadan gelişimlerini tamamlayamaz ve çoğalamazlar. Dolayısıyla dışarıdan kolesterol almak insektler için fizyolojik olarak bir zorunluluktur. Kolesterol oldukça hidrofobiktir. Taşıyıcı proteinler, kolesterolün hidrofobik kısmını sitoplazmanın veya hemolenfin sulu ortamından koruyarak kolesterolün verilmesine aracılık eder (19). Böceklerde kolesterolü hücre içi olarak orta bağırsak epitelinin lümenal tarafından bazal tarafına veya lipid damlacıklarından yağ gövdesindeki sitoplazmik membrana taşımak için bir sterol taşıyıcı proteine (SCP) ihtiyaç vardır. *Aedes* türleri üzerinde yapılan çalışmalarda (20-22), hücre içi bir sterol taşıyıcı protein olan SCP-2'nin hücrel kolesterol transferinden sorumlu olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada, biyoteknolojik mücadele kapsamında çeşitli zararlı ve/veya hastalık nakleden böcekler için aşı adayı veya hedef ilaç bölgelerinden birisi olarak nitelenen SCP-2 geninin *Anopheles sacharovi*'de moleküler karakterizasyonunun ilk kez gerçekleştirilmesi ve bu antijenin sineğin yaşam dönemlerindeki ekspresyon analizlerinin karşılaştırmalı bir şekilde ortaya konulması amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Anopheles Soyundaki Ergin Sivrisinek Örneklerinin Sahadan Toplanması

Anopheles soyundaki ergin sivrisinek örnekleri Mayıs-Ağustos 2021 tarihleri arasında Sultanazade ekosisteminden toplanmıştır. Belirlenen örnekleme alanlarında kan emmiş, yarı gravid veya gravid ergin *An. sacharovi* dişi örnekleri hayvan ahırları/barınakları, ev içleri, kiler, depo gibi uygun kapalı alanlarda gündüz saatlerinde bataryalı aspiratörler (2809D, BioQuip, ABD) ve hepa filtreli basit ağız aspiratörleri ve el fenerleri yardımıyla toplanmıştır (23). Örnekler küçük sivrisinek kafeslerine aktarılmış ve içerisinde buz akülü bulunan arazi tipi taşınabilir buzluklara aktararak laboratuvara taşınmıştır. Örneklerin taşınma sırasında ölüm oranını azaltmak için buzluklar içerisine ayrıca nemli bez parçaları konulmuş, nemli ve serin bir ortamda taşınmaları sağlanmıştır.

Anopheles sacharovi'nin Morfolojik ve Moleküler İdentifikasyonu, İnsektaryumda Gelişim Dönemlerinin Elde Edilmesi

Morfolojik teşhis

İnsektaryuma getirilerek uygun kaplar içerisinde yumurtlamaları sağlanan tüm dişiler ayrılmış ve stereo-mikroskop altında ergin ve yumurta morfolojisine göre teşhis anahtarı ile (24,25) tür teşhisleri gerçekleştirilmiştir. *Anopheles sacharovi* dişi örneklerinin diğer grup örneklerine göre kanat lekelerinin daha az belirgin olması, scutumun soluk kahverenginde olması, scutumda soluk doğrusal bir şeritin bulunmaması ve kanat ucu saçaklarının tek düze siyah olması gibi morfolojik karakterleri ile *An. maculipennis* grubunun diğer türlerinden (*An. maculipennis* s.s., *An. melanoon*, *An. messeae*) mikroskop ile ayrılması ve teşhis edilmesi mümkündür. Yumurtaların desenlenme biçimleri ve yumurta yüzgeçlerinin bulunma yerleri ve biçimleri ülkemizdeki *An. maculipennis* grubu türlerin ayrımında doğru sonuçlar vermektedir. *An. sacharovi*'nin yumurta deseni özellikleri diğer *An. maculipennis* grubu türlerinkinden farklıdır ve belirgin bant profilleri veya desenleri yoktur. Yumurtlayan ergin dişi örnekler PBS içerisinde en az üç kez yıkanarak kod numarasıyla birlikte -80 °C'lik derin dondurucuya total RNA izolasyonunda kullanılmak üzere alınmıştır. Derin dondurucuya alınmadan önce her örneğin bacakları ayrılarak içerisinde %96'lık etanol bulunan ayrı steril mikrosantrifüj tüplerine moleküler teşhis için DNA izolasyonu amacıyla alınmıştır. Morfolojik teşhis sonucu *An. sacharovi* olarak teşhis edilen örnekler ait yumurtalar ise gelişim dönemlerinin eldesi için insektaryumda yetiştirme prosesine alınmıştır.

Moleküler teşhis

Ergin dişi ve yumurta morfolojisine göre *An. sacharovi* olarak teşhisi sağlanan örnekler, tür teşhislerinin doğrulaması için moleküler analizlere alınmıştır. Etanol bulunan mikrosantrifüj tüplerine alınan bacaklardan genomik DNA izolasyonu, GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) ile gerçekleştirilmiştir. Örnekler ait gDNA izolatları, *An. sacharovi*

ITS-2 (26,27) gen bölgesinin 180 bp'lik fragmentini spesifik olarak amplifiye eden primerlerle polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) analiz edilmiştir. PCR analizleri sonrası, hedef büyüklükteki ITS-2 gen bölgesi ampikonları ayrıca PCR primerleri ile sekans analizine tabii tutulmuş ve tür teşhisleri elde edilen nükleotid dizilerinin GenBank veritabanındaki referans izolatlarla birlikte hizalama analizleri yapılarak konfirme edilmiştir.

İnsektaryumda Gelişim Dönemlerinin Elde Edilmesi

An. sacharovi olarak teşhis edilen toplam 50 dişi sivrisinek örneğine ait yumurtalar larva 1 dönemi çıkana kadar bulundukları kaplar içerisinde takip edilmiştir. Birinci dönem larvaların çıkışını takiben tüm larvalar geniş ağızlı pipetler yardımıyla dikkatli bir şekilde gelişim kaplarına aktarılmıştır. Larval besleme sürecinden önce 240 (3 tekrar oluşturmak üzere) adet L1 SCP-2 geninin karakterizasyonu ve ekspresyon analizlerinde kullanılmak üzere ayrılarak üç kez PBS'den geçirilmiş ve sonrasında -80 °C'lik derin dondurucuya konulmuştur. *An. sacharovi*'nin insektaryumda yetiştirilmesi ve gelişim dönemlerinin sağlanmasında ilgili referans protokoller takip edilmiştir (28,29). Gelişim dönemleri için insektaryum ortamının gerekli optimum sıcaklık, nispi nem ve fotoperiyot koşulları; 26-30 °C, %70±10 nispi nem ve 12saat:12saat aydınlık:karanlık fotoperiyot şeklinde ayarlanmıştır. Larval gelişim süreci takip edilerek yaklaşık 10-14 günde (30) (Yumurta-L1: 2-3 gün; L1-L2: 2-3 gün; L2-L3: 2-3 gün; L3-L4: 3-4 gün; L4-Pupa: 3-4 gün; Pupa-Ergin: 2-3 gün) pupaya dönüşen örneklerden L1, L2, L3, L4 ve pupa dönemleri için ilgili zaman aralıklarında SCP-2 geninin karakterizasyonu ve ekspresyon analizleri amacıyla sırasıyla 240, 180, 120, 60 ve 15 (3 tekrar oluşturmak üzere) (31) örnek ayrılarak üç kez PBS'den geçirilmiş ve sonrasında -80 °C'lik derin dondurucuya konulmuştur. Larval besleme kaplarında gelişen pupalar küçük ve geniş ağızlı pipetler aracılığıyla toplanarak erginleşme kaplarına alınmış ve bu kaplar büyük yetiştirme kafesine aktarılmıştır. Yaklaşık 2-3 gün içerisinde pupadan çıkan ergin sinekler, büyük kafes içerisinde pamuklara emdirilmiş %10'luk şeker çözeltisi ve ayrıca çeşitli bitki öz suları ile yaklaşık 2 gün beslenmeleri yapılmıştır. Takiben ergin erkek ve dişilerden bireysel olarak ayrılan üçer örnek üç kez PBS'den geçirilmiş ve sonrasında SCP-2 geninin karakterizasyon ve ekspresyon analizleri amacıyla -80 °C'lik derin dondurucuya konulmuştur.

SCP-2 Geninin Karakterizasyonu ve Ekspresyon Analizleri

Total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

SCP-2 geninin moleküler karakterizasyonu amacıyla 50 adet dişi *An. sacharovi* örneğinden 7'si kullanılmıştır. Ayrıca her gelişim dönemi için oluşturulmuş üç replikasyondan birisi moleküler karakterizasyon çalışmasına dahil edilmiş ve böylece toplam 14 izolata ait total RNA'lar sekans analizleri için kullanılmıştır. Ekspresyon analizleri için insektaryumda yetiştirilen tüm gelişim dönemlerine ait örnekler kullanılmıştır. Sahadan toplanan ergin dişilerden bireysel total RNA izolasyonu GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific) ile gerçekleştirilmiş, insektaryum hattından ise ilgili gelişim dönemlerine ait belirtilen sayıda örneği içeren havuzlar oluşturulmuş ve total RNA izolasyonuna alınmıştır. Total RNA izolatlarından cDNA elde etmek için iScript cDNA Sentez Kiti (Bio-Rad) protokolü uygulanmıştır. Ekstrakte edilen RNA'ların miktarı, NanoDrop spektrometresi kullanılarak analiz edilmiş ve reaksiyon başına

100 ng RNA ilave edilmiştir. cDNA sentezi, ticari kit protokolüne göre termal döngü 25 °C'de 5 dk, 46 °C'de 20 dk, 95 °C'de 1 dk ve 4 °C'de soğutma olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Termal döngü protokolünün tamamlanmasından sonra örneklere ait elde edilen cDNA'lar kullanılabilecek kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. SCP-2 geninin *An. sacharovi* dişi nesillerinin tükrük bezi, orta bağırsak ve yağ dokusu gibi organlarında ekspresyon düzeylerinin araştırılması amacıyla insektaryum hattından elde edilen toplam 30 ergin dişiye ait ilgili dokular steril olarak diseke edilmiş ve her doku 10'arlı olarak tüplere yerleştirilmiş ve üç replikasyonun oluşumu sağlanmıştır.

SCP-2 geninin amplifikasyonu ve sekanslanması

Elde edilen cDNA kalıplarında SCP-2 gen bölgesinin amplifiye edilmesi için diğer bazı *Anopheles* ve *Culex* türlerine ait ilgili gen sekansları üzerinde optimum özellikte primer dizaynı gerçekleştirilmiş ve sonrasında SCP-2 geninin 216 bp kısmını çoğaltan SCP76F (5'-GTGCAGCAGATSTACAAGTTC-3') ve SCP-291R (5'-CTCAACCTGTCCCTCCACRT CSAG-3') primerleri sentezletilmiştir. PCR reaksiyonları 25 µL final konsantrasyonda hazır kullanımlık Dream Taq Hot Start Green PCR Master Mix (2X) (12,5 µL) (Thermo Fisher Scientific), 0,4 µM her bir primer (1,3 µL) ve 10-20 ng kalıp cDNA (2 µL) olacak şekilde hazırlanmıştır. Örnekler C1000 Touch thermalcycler cihazına (BioRad) yerleştirilerek, termal profil 95 °C'de 2 dk; 35 siklus 95 °C'de 30 sn, 57 °C'de 30 sn ve 72 °C'de 1 dk; 72 °C'de 10 dk olarak ayarlanmış ve amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin her birinden 5 µL alınıp 130 V'de 30 dk, jel elektroforeze tabii tutulmuştur. Sonuçlar GeneSnap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir. PCR analizleri sonrası, SCP-2 gen bölgesi ampikonları uygun konsantrasyonda hazırlanarak PCR primerleri ile birlikte MacroGen Europe firmasında çift yönlü olarak sekanslatılmıştır.

Nükleotid ve amino asit sekanslarının karakterizasyonu

Çift yönlü DNA dizisi belirlenen izolatlar ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious 2022.1.1 yazılımı (<https://www.geneious.com>) ile forward ve reverse dizilimler DeNovo Assemble kullanılarak contig analizi yapılmış ve ilgili gen için final konsensus dizilimler ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra GenBank'ta mevcut diğer sivrisinek ve yakın taksonlara ait SCP-2 sekanslarıyla Geneious yazılımı üzerinden çoklu hizalamaları yapılarak interspesifik ve intraspesifik nükleotid ve aminoasit farklılıkları ortaya çıkarılmıştır. Filogenetik ağaç oluşturulmasında maximum likelihood (ML) analizi uygulanmıştır. Sekans evrimi için en uygun değişim modeli jModelTest v.0.1.1'de (32) belirlenmiştir. En düşük AIC (Akaike Information, Criterion, correction) skoru gösteren GTR+I modeli filogenetik ağaç oluşturulmasında kullanılmıştır. ML analizi Geneious yazılımı üzerinden PhyML plugini kullanılarak yapılmıştır. ML analizleriyle oluşturulan ağacın güvenilirliği 1,000 tekrarlı Bootstrap testi ile gerçekleştirilmiştir. İzolatlar ait amino asit dizilimleri; protein yapısı yönünden analiz edilmiştir. SCP-2 proteinin transmembran bölgelerindeki amino asit dizilimlerinin sinyal peptid analizleri ve dizilimlerdeki tahmini antijenik peptidlerin varlığı Geneious yazılımı üzerinden EMBOSS Protein Analysis 1.0 plugin yazılımı kullanılarak yapılmıştır. *An. sacharovi* SCP-2 proteininin transmembran sarmallarının yapısı

aynı yazılım üzerinden Transmembrane Prediction Tool 0.9 ile araştırılmıştır. İzoelektrik nokta ve proteinin tahmini moleküler ağırlığı ExPASy programı ile hesaplanmıştır.

SCP-2 Geninin Ekspresyon Analizleri

İstatistiksel Analiz

SCP-2 geninin *An. sacharovi*'nin farklı gelişim evreleri ve dokularındaki ekspresyon analizleri kantitatif reverse transkripsiyon-gerçek zamanlı-PCR ile gerçekleştirilmiştir. SCP-2 geninin, *An. sacharovi* laboratuvar hatlarından elde edilen larva (1,2,3,4 instar larvalar), pupa ve ergin dönemleriyle ergin dişilerin tükürük bezi, orta bağırsak ve abdomen karkasları gibi dokularında transkripsiyonel düzeylerinin belirlenmesi için analizler gerçekleştirilmiştir. SCP-2 proteinini kodlayan hedef gen bölgesinin bütün olarak amplifikasyonu amacıyla sentezlenen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak karakterize edilen gen bölgesi sekanslarından sybergreen tabanlı qPCR için genetik yazılımlarla optimum spesifik primer dizaynı yapılmıştır. Dizayn edilen SCP-2 gen bölgesi için AsacSCP-2sybrF (5'-TTCCGCATCCAGCAGAAC-3') ve AsacSCP-2sybrR (5'-CGAACATGATCTCATCGTCCAT-3') primerleri qPCR analizleri için standardize edilmiştir. Gerçek zamanlı PCR analizleri CFX Connect™ Real-Time PCR Sisteminde (BioRad) sybergreen tabanlı olarak gerçekleştirilip her örnek üç tekrar çalışılmıştır. Floresans okumaları her siklustan sonra 62 °C'de alınarak, PCR ürünlerinin identikliğinin konfirmasyonu için melting curve analizleri gerçekleştirilmiştir. mRNA düzeyleri, Aktin (AdrtACTF2- 5'-TCTGACCGACTACCTGAT-3' ve AdrtACTR2 5'-CATCTCCTGCTCGAAGTC-3') ve Ribozomal S17 (S17F-5'-GGGTCTGTACGTACCAAGACG-3' ve S17R2 5'-CATAGTTATCGCGACGCTCACG-3') referans genleri eş zamanlı kullanılarak komperatif $\Delta\Delta C_t$ metodu ile normalize edilmiştir (33,34). Normalize edilmiş mRNA düzeyleri, jenerasyon bazında farklı gelişim evreleri ile ergin dişilerden izole edilen dokular arasında Student's t-test ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

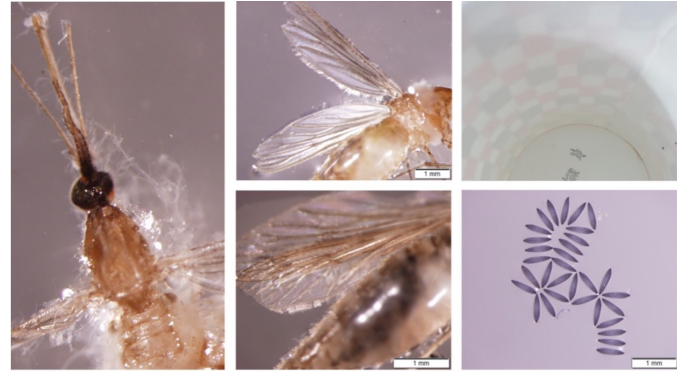
BULGULAR

Anopheles sacharovi Saha Örnekleri ve Morfolojik İdentifikasyon

Sahadan toplanan 283 adet dişi *Anopheles* örneklerinden 50 sivrisinek yumurtlatma prosesine alınmıştır. Yumurtlayan *Anopheles* dişi nesiller stero-mikroskop altında incelenmiş ve *An. maculipennis* grubunun diğer türlerinden (*An. maculipennis* s.s., *An. melanoon*, *An. messeae*) kanat lekelerinin daha az belirgin olması, scutumun soluk kahverenginde olması, scutumunda soluk doğrusal bir şeritin bulunmaması ve kanat ucu saçaklarının tek düze siyah olması gibi morfolojik karakterleri ile *An. sacharovi* olarak teşhis edilmiştir (Şekil 1). Ayrıca her bir dişi için elde edilen yumurtalar morfolojik olarak incelenmiş ve yumurtaların desenlenme biçimleri ve yumurta yüzgeçlerinin bulunma yerleri ve biçimleri ile *An. sacharovi* teşhisi doğrulanmıştır. Yumurtaların bu özellikleri, elde edilen tüm yumurtaların *An. sacharovi* dişilerine ait olduğunu göstermiştir (Şekil 1).

Anopheles sacharovi Nesillerinde ITS-2 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu, Sekans ve Filogenetik Analiz Sonuçları

Morfolojik identifikasyonla *An. sacharovi* olarak teşhis edilen ve yumurtaları insektaryumda gelişmeye alınan toplam 50 adet dişi örneğin ayrılan bacaklarından elde edilen genomik DNA izolatlarının *An. sacharovi* spesifik ITS-2 PCR analizleri sonucu



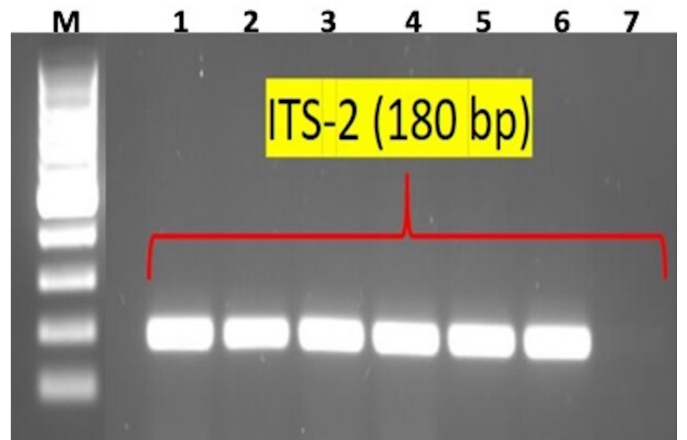
Şekil 1. *Anopheles sacharovi* ergin dişi ve yumurtaları (orijinal)

agaroz jel üzerinde hedef büyüklükte (180 bp) ampikonlar belirlenmiştir (Şekil 2). Sekans analizi için tüm izolatlar ait ampikonların PCR primerleri ile çift yönlü olarak sekanslanması sonucu izolatlar ait forward ve reverse kromotogramlar Geneious 2020.1.1 yazılımında *de novo* assemble ile işlenerek kalite skoru yüksek konsensus dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen tüm nükleotid sekansların birbirine %100 benzer olduğu görülmüştür. Yapılan blast analizi sonucunda izolatlar ait ITS-2 nükleotid sekansının GenBank veritabanında kayıtlı diğer *An. sacharovi* sekanslarıyla yüksek düzeyde benzer olduğu belirlenmiş ve böylece çalışmaya dahil edilen toplam 50 dişi *An. sacharovi* neslinin tür konfirmasyonları gerçekleştirilmiştir.

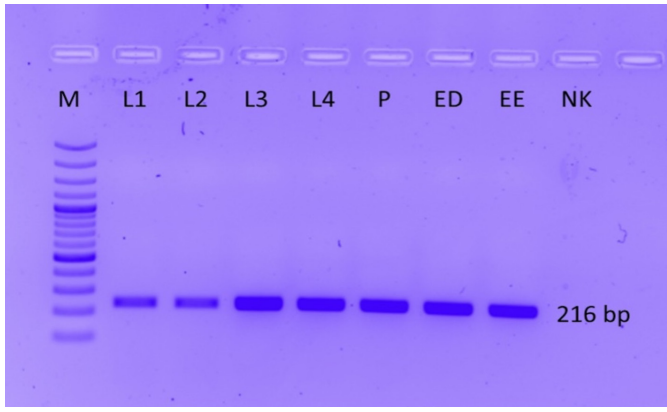
An. sacharovi Nesillerinde SCP-2 Geninin Moleküler Karakterizasyonu

SCP-2 geninin amplifikasyon sonuçları

Çalışma kapsamında morfolojik ve moleküler identifikasyonları sağlanan sahadan izole edilmiş ve yumurtaları yetiştirmeye alınmış toplam 7 ergin dişi ile insektaryumda gelişim dönemleri için oluşturulmuş replikasyonlardan seçilen toplam 7 izolata (L1-L4, Pupa, ergin dişi, ergin erkek) ait cDNA'ların SCP-2 gen bölgesi yönünden PCR sonuçları Şekil 3'te verilmiştir. PCR amplifikasyonu sonucunda agaroz jel üzerinde tüm izolatlar için hedef büyüklükte (216 bp) ampikonlar belirlenmiştir.



Şekil 2. *An. sacharovi* örneklerinin ITS-2 gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif ampikonların jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100 bp); 1-6: Ergin dişi *An. sacharovi* izolatları; 7: No DNA PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu



Şekil 3. *An. sacharovi* nesillerine ait izolatların SCP-2 gen bölgesi yönünden PCR sonuçları
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

An. sacharovi Nesillerinde SCP-2 Geninin Nükleotid ve Amino Asit Sekans Karakterizasyonu Sonuçları

Nükleik asit sekans karakterizasyonu ve filogenetik analizi

Karakterizasyonu yapılan 14 izolata ait nükleotid sekanslarının hizalama analizlerinde 12'sinin %100 benzer olduğu, aynı nükleotid dizilimine sahip kalan 2 izolatın ise 183. bazda "T" yerine "C" değişimi gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen bu verilerle karakterize edilen *An. sacharovi* SCP-2 sekansları sırasıyla TR_Ansac1_SCP-2 (GenBank aksesyon: OL957181) ve TR_Ansac2_SCP-2 (GenBank aksesyon: OL957182) izolat adlarıyla GenBank veritabanına kayıt edilmiştir. TR_Ansac1_SCP-2 ve TR_Ansac2_SCP-2 sekansları arasında %0,5 genetik farklılık saptanmıştır. Çalışmada karakterize edilen *An. sacharovi* SCP-2 gen bölgesi sekansları ile GenBank veritabanında kayıtlı *Anopheles*, *Aedes* ve *Culex* soylarındaki diğer bazı türlere ait SCP-2 gen bölgesi sekansları kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçta izolatların tür ve soy bazlı olarak kümelenme gösterdiği ve monofiletik yapı sergilediği görülmüştür (Şekil 4). Çalışmamızda karakterize edilen *An. sacharovi* izolatlarının *Anopheles* kümesi içerisinde *An. stephensi* ve *An. funestus*'la birlikte alt küme oluşturduğu ve bu türlerin SCP-2 gen bölgesi sekanslarının birbirine daha yakın olduğu tespit edilmiştir. *Anopheles* soyu içerisinde incelenen türlere ait SCP-2 sekanslarının ortalama genetik farklılığı %10,45 belirlenmiştir.

SCP-2 geninin kodladığı proteinin in-silico analiz sonuçları

Anopheles sacharovi SCP-2 geninin in-silico analizleri sonucu SCP-2 gen sekansları içerisinde belirlenen tek nükleotid değişiminin amino asit diziliminde farklılığa yol açmadığı görülmüştür. *Anopheles sacharovi* SCP-2 genin 216 bp gen diziliminin kodladığı 72 aa zincirinin ifade ettiği proteinin 7,915 kDa büyüklüğünde olduğu, transmembran bölge içermeyip tamamen sitoplazmik karakterde olduğu belirlenmiştir (Şekil 5). SCP-2 geninin aminoasit zinciri içerisinde 13 ve 18 aa uzunluğunda ve antijenik skorları da sırasıyla 1,089 ve 1,143 olan 2 antijenik bölge bulunduğu görülmüştür. İlgili proteinin izoelektronik noktasının 4,26 olduğu ve pH 7'de aktivasyon değerinin de -4,08 olduğu tespit edilmiştir.

Anopheles sacharovi'de SCP-2 Geninin Ekspresyon Analiz Sonuçları

SCP-2 geninin qPCR amplifikasyon sonuçları

An. sacharovi SCP-2 geninin ekspresyon analizleri için dizayn edilen qPCR primerli ile normalizasyon genleri Aktin ve ribozomal S17 için primerlerin hem gelişim dönemleri hem de dokulardan izole edilen total RNA izolatlarında etkin olarak çalıştığı ve spesifik melt pik gösterdikleri görülmüştür (Şekil 6).

Gelişim dönemlerinde SCP-2 geninin ekspresyon analizi

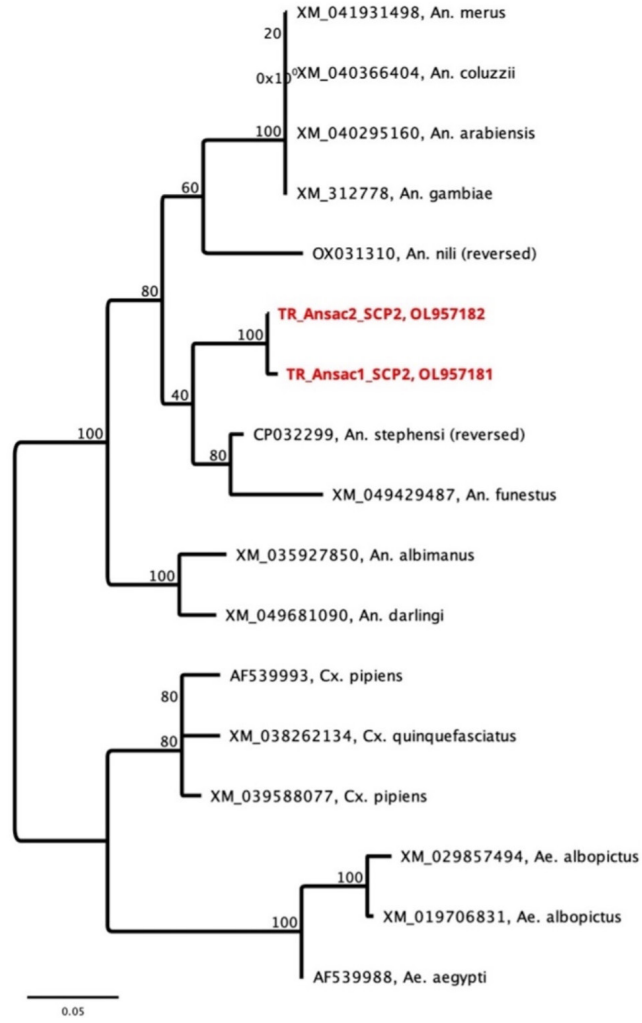
SCP-2 geninin *An. sacharovi* gelişim dönemlerindeki ekspresyon düzeyleri Şekil 7'de gösterilmiştir. qPCR'de ekspresyon analizleri sonucunda SCP-2'nin en yüksek ergin erkeklerde ifade olduğu bunu sırasıyla ergin dişi, L4, L3, L2, L1 ve pupa dönemlerinin izlediği belirlenmiştir. Tüm gelişim dönemleri arasındaki SCP-2 ekspresyon kat değişimi arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli ($p < 0,05$) bulunmuştur.

Ergin dişi dokularında SCP-2 geninin ekspresyon analizi

SCP-2 geninin *An. sacharovi* ergin dişi tükrük bezi, orta bağırsak (midgut) ve yağ (fat body) dokularındaki ekspresyon düzeyleri Şekil 8'de gösterilmiştir. qPCR'de ekspresyon analizleri sonucunda SCP-2'nin en yüksek fatbody'de ifade olduğu bunu sırasıyla midgut ve tükrük bezinin izlediği belirlenmiştir. Ergin dişi dokuları arasındaki SCP-2 ekspresyon kat değişimi istatistiksel olarak önemli ($p < 0,05$) bulunmuştur.

TARTIŞMA

SCP-2, her birinin sterol-bağlayıcı alan taşıdığı SCP-2, SCP-x, SCP-like-2, SCP-like-3, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase tip IV, ve stomatin'i içeren SCP-2 gen ailesinin bir üyesidir (35). SCP-2 geninin insan kromozom bandı 1p32.3'de yerleştiği ve 18 exon ve 123 amino asitten oluştuğu belirlenmiştir (36). SCP-x ve SCP-2'yi bir genin kodladığı ve SCP-x'in diğer bir transkripsiyon bölgesinden geldiği bilinmektedir. Her bir mRNA ortak bir C-terminus yapısı gösteren bir prekürsör 15 kDa pro-SCP-2 proteinini ve tüm-uzunlukta 58 kDa SCP-x proteinine transkribe olur. 58-kDa SCP-x kısmi post-translasyonel modifikasyon geçirir ve takiben tam fonksiyonel 13 kDa SCP-2 ve 46-kDa proteine ayrılır (37). Açıkça, 15-kDa pro-SCP-2'nin aktivitesi yoktur ve tamamen post-translasyonel olarak işlenmesiyle bir 2-kDa peptid ve bir matür 13-kDa SCP-2 oluşur (15). Günümüze kadar omurgalı SCP-2 genlerinin birçok özelliği ortaya çıkarılmış olup, SCP-2'nin inanlar, kurbağalar, zebra balıkları, köpekler, tavuk ve fareler arasında evrimesi olarak yüksek düzeyde korunmuş olduğu belirtilmektedir (36). Omurgalılarda SCP-2'nin sterol metabolizması ve steroid biyosentezinin önemli bir bileşeni olduğu gösterilmiştir (37,38). Ayrıca omurgalılarda SCP-2'nin kolesterol, doymuş asitler ve doymuş acyl CoA'a bağlandığı da tespit edilmiştir (37,39). Ayrıca SCP-2'nin mitokondride kolesterolün steroidlere döndürülmesini mitokondri içine girişi artırarak hızlandırdığı belirlenmiştir (40,41). Buna ilaveten SCP-2'nin mikrozom ve plazma membranı arasında sterol döngüsünü artırdığı (42), ve kolesterol veya steroid biyosentezine dahil olan dokularda yüksek düzeyde SCP-2 ekspresyonu olduğu ortaya çıkarılmıştır (37,43).



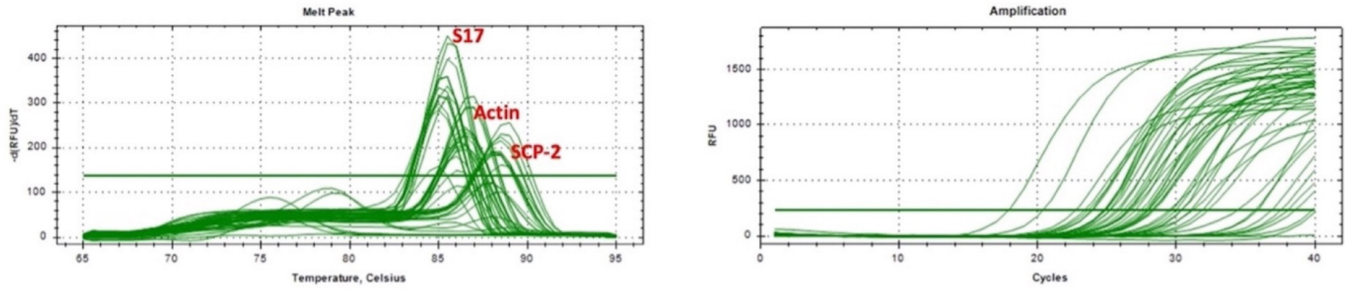
Şekil 4. Çalışmada karakterize edilen *An. sacharovi* izolatları (kırmızı kalın karakter) ile *Anopheles*, *Culex* ve *Aedes* soylarındaki diğer bazı türlerin SCP-2 gen sekanslarına göre filogenetik ilişkisi. Nodeların önündeki rakamlar 1000 bootstrap desteğini göstermektedir. Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini ifade etmektedir



Şekil 5. *Anopheles sacharovi* SCP-2 amino asit sekansı ve in-silico özellikleri

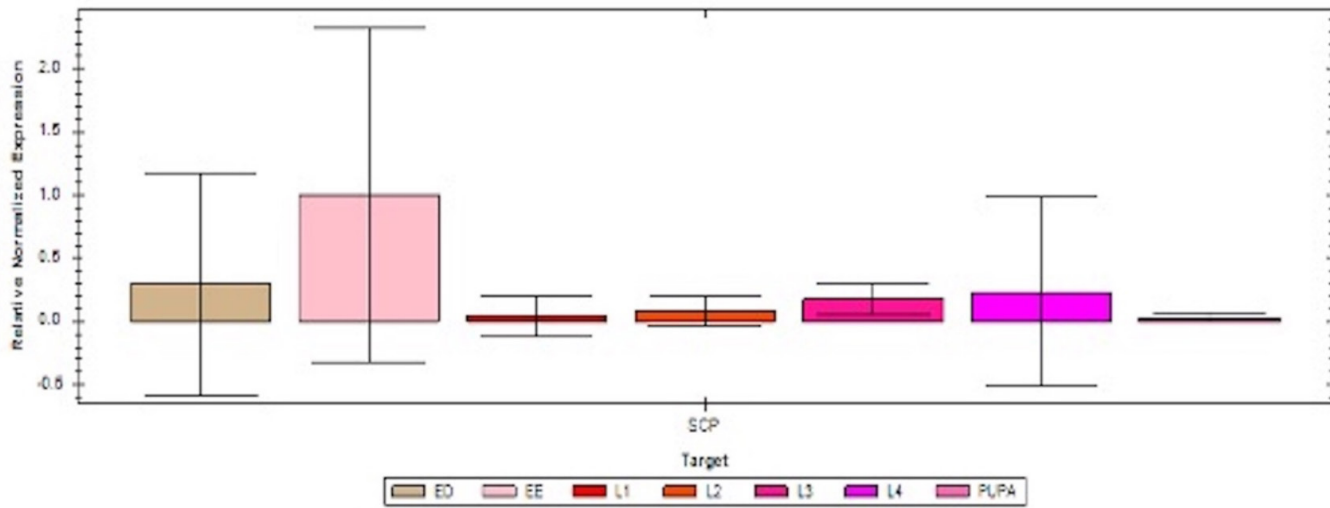
İnsanlar kolesterol biyosentez yolağında önemli olan enzimlerden yoksundur ve bu sebeple kolesterolün hücre ve dokularda sentezi için uygun canlılar değildir (44). Bu faktör, insektlerin vücut yapıları ve büyüme hormonları gibi önemli biyobileşenler için zorunlu olan kolesterolün dış kaynaklardan sağlanmasını zorunlu kılmaktadır (45). Günümüze kadar *Anopheles*, *Aedes* ve *Culex* soylarındaki çeşitli sivrisinek türleri

üzerinde SCP-2 genin metabolik yolları ve çeşitli SCP-2 inhibitörü maddelerin sivrisinek gelişim parametreleri üzerine etkisi temelinde sivrisinek kontrolü için yenilikçi yaklaşımlarla araştırmaların yapıldığı görülmektedir (46). Ancak SCP-2 geninin farklı sivrisinek türlerinde moleküler yapısı ve gelişim dönemleri ile çeşitli vücut dokularındaki ifade düzeyleri üzerine araştırma açığı bulunduğu dikkati çekmiştir. Günümüze kadar Gen

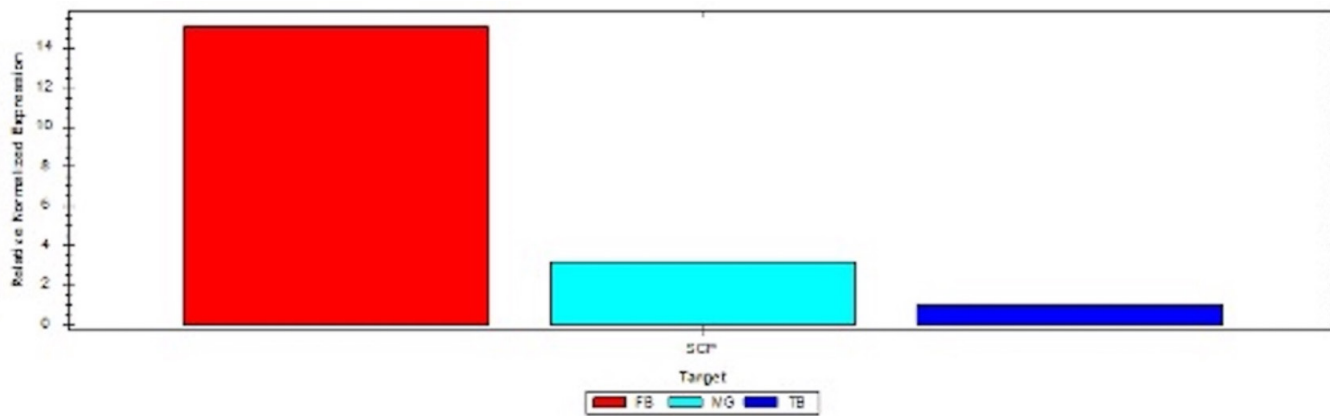


Şekil 6. SCP-2 geninin qPCR ekspresyon analizinde belirlenen amplifikasyon grafikleri ve SCP-2 ve normalizasyon genlerinin melt pik grafikleri

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu



Şekil 7. SCP-2'nin *An. sacharovi* gelişim dönemlerindeki ifade düzeyleri (ED: Ergin dişi; EE: Ergin erkek)



Şekil 8. SCP-2'nin *An. sacharovi* gelişim dönemlerindeki ifade düzeyleri (FB: Fat body, MG: Midgut, TB: Tükürük bezi)

veritabanı incelendiğinde SCP-2 geninin çeşitli *Anopheles* türleri ile *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* ve *Ae. albopictus* türlerinin genom ve/veya transkriptom çalışmalarında anotasyonlandığı görülmektedir. Diğer yandan GenBank veritabanında direkt SCP-2 geni üzerine odaklanan *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* ve *An. quadrimaculatus* türleri için gen sekansları bulunmakta olup bunlardan yalnızca *Ae. aegypti* üzerine bir çalışmanın yayınlandığı görülmektedir (19). Mevcut bu veriler dikkate alındığında çeşitli sivrisinek türlerinde SCP-2 geninin açık okuma çerçevesinin yaklaşık 335 bp uzunlukta olduğu ve 110 aa

uzunluğunda bir proteini kodladığı görülmektedir. Çalışmamızda *Maculipennis* grubun en önemli üyelerinden biri olan ve *P. vivax* için en etkin vektörlerden birisi olan *An. sacharovi* için SCP-2 geni ilk kez karakterize edilmiştir. Yukarıda bahsi geçen mevcut sivrisinek SCP-2 gen sekansları üzerinde yürüttüğümüz primer dizaynı çalışmalarında SCP-2 gen bölgesi ORF sekansını bütün olarak çoğaltan veya kapsayan bir fragmentin cDNA kalıbı içerisinde çoğaltılması mümkün olmamıştır. Ancak ilgili dizilimler içerisinde gerçekleştirilen analizlerde diğer *Anopheles* türleri ve diğer soylardan türlere ait gen sekansları arasında

gerçekleştirilen analizlerle korunmuş bölgeler tespit edilmiş ve bu yönüyle de SCP-2 geninin değişken bölgeleri de içeren 216 bp fragmenti etkin olarak çoğaltılmıştır. SCP-2 gen bölgesi ORF sekansı çeşitli sivrisinek türlerinde 110 aa uzunluğunda ve 12.3 kDa büyüklüğünde bir proteini ifade etmekte olup çalışmamızda çoğaltığımız gen fragmenti bunun içerisinde 76 aa uzunluğunda ve yaklaşık 8 kDa büyüklüğünde bir proteini ifade ettiği in silico analizlerle gösterilmiştir. Sivrisineklerde SCP-2 ORF amino asit sekanslarının antijenite analizlerinde 5 antijenik bölge içerdiği, karakterize ettiğimiz *An. sacharovi* parsiyel amino asit sekansında diğer türlerin sekans bölgeleriyle de örtüşen 2 antijenik bölgenin bulunduğu görülmüştür. Ayrıca *An. sacharovi* SCP-2 amino asit sekansının ifade ettiği proteinin diğer sivrisinek türlerinde olduğu gibi transmembran bölge içermediği ve stoplazmik karakterde olduğu dikkati çekmiştir. Krebs ve Lan (19), karakterize ettikleri *Ae. aegypti* SCP-2 amino asit sekansının filogenetik analizinde, SCP-2'nin rat SCP-2'sine %30, memeli SCP-2'sinin sterol-transfer domainine %46 benzerlik gösterdiğini, ayrıca insan genomunda SCP-2-like geni (XM_115847.1) ile %50, *An. gambiae* (EAA08376) ile %79 ve üç *Drosophila* geni CG11151 (AE003493) ile de %25-38 benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar (19), SCP-2 gen sekansının *Ae. aegypti* nesilleri içerisinde yüksek düzeyde korunmuş olduğunu göstermişlerdir. Benzer olarak çalışmamızda sahadan izole edilmiş olan ergin dişi nesiller ve bunlardan elde edilen jenerasyonlardan alınan örnekleri içeren toplam 14 izolata ait SCP-2 nükleotid sekanslarının yüksek düzeyde korunmuş olduğu, yalnızca 2 izolatta 183. bazda tek nükleotid değişimi olduğu ancak bu değişiminde amino asit sekansında farklılığa yol açmadığı ve tüm zolotların homolog amino asit dizilimi gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada karakterize edilmiş olan *An. sacharovi* SCP-2 nükleotid sekansları ile GenBank veritabanında mevcut sınırlı sayıda diğer sivrisinek türlerine ait SCP-2 sekanslarının filogenetik analizinde SCP-2 sekanslarının tür ve soy bazlı olarak izolatları monofiletik kümelerle yerleştirdiği görülmüştür. Bu sonuç SCP-2 geninin sivrisinek türleri içerisinde korunmuş yapı sergilediğine dair destekleyici kanıt sağlamıştır. Bunun yanında SCP-2'nin *Anopheles* türleri arasında %10,45 oranında genetik farklılık gösterdiği, bu farklılığın *Culex* türleri ile yaklaşık %23,0 *Aedes* türleri ile ise yaklaşık %29'a yükseldiği dikkati çekmiştir. Ayrıca SCP-2 gen bölgesi filogenetik analiz sonuçları *An. sacharovi*'nin *Anopheles* türleri içerisinde *An. stephensi*'ye genetik olarak daha yakın olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada ekspresyon analizlerinde SCP-2'nin *An. sacharovi*'nin tüm gelişim dönemleri ve ergin dişilerin tükrük bezi, orta bağırsak ve yağ dokusunda farklı düzeylerde ifade olduğu gösterilmiştir. Omurgalıların aksine insekt hücreleri kolesterolü, lipoproteinlerin reseptör aracılı endositozu yoluyla orta bağırsak ve yağ doku arasında transfer edemez (47). Hidrofobik yapısı sebebiyle kolesterol, hazır olarak hücre membranının dış yüzeyi içine doğru dağılır ve SCP-2 gibi proteinler ilgili molekülleri membrandan ayırıştırır ve depolanacakları bölgeye ve metabolik yollarına teslim eder (48). *Ae. aegypti* SCP-2 proteini üzerine yapılan bir araştırmada (21), SCP-2'nin orta bağırsak epitelinde sitozol içinde lokalize olduğu ve overekspresyon sonucunda kolesterol seviyesinin yükseldiği gösterilmiştir. Buna ilaveten, *Ae. aegypti* SCP-2 ekspresyonunun larval beslenme döneminde orta bağırsakta yüksek seviyede olduğu gösterilmiş (19), ve SCP-2'nin kolesterolün dönüştürülmesi için orta bağırsakta pyhtosterollerin işlenmesine dahil

olduğu belirtilmiştir (35). Nitekim araştırmamızda ergin dişi dokularında gerçekleştirdiğimiz ekspresyon analizlerinde *Ae. aegypti*'de araştırmacıların (19) elde ettikleri bulgulara paralel olarak orta bağırsakta SCP-2 ekspresyonu yüksek belirlenmiş ve tükrük bezine oranla yaklaşık üç kat daha yüksek düzeyde ifade olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan çalışmamızda ergin dişi dokularından en yüksek ifade düzeyi yağ dokusunda (fat body) belirlenmiş, SCP-2'nin tükrük bezi ve orta bağırsaktaki ifade düzeyinden sırasıyla yaklaşık 15 ve 5 kat daha yüksek ifade olduğu görülmüştür. Bu sonuç ergin dişilerde SCP-2'nin yağ dokusunda kolesterol metabolizmasının regülasyonunda önemli bir fonksiyona sahip olabileceğine dair kanıtlar sağlamıştır. Diğer yandan Krebs ve Lan (19), Northern ve dot blotting analizleri ile gerçekleştirdikleri ekspresyon analizlerinde 4. dönem *Ae. aegypti* larvalarında orta bağırsağa göre fat body de içeren vücut duvarında SCP-2'nin ifade düzeyini oldukça düşük belirlemişlerdir. Bu sonuç da göz önüne alındığında sivrisineklerin gelişim dönemleri boyunca kolesterol metabolizmasının regülasyonunda bağırsak epitelinin dışındaki organ ve dokularda da SCP-2'nin önemli bir fonksiyona sahip olabileceği hipotez edilebilir. Çalışmamızda ayrıca *An. sacharovi*'nin tüm gelişim dönemlerinde SCP-2'nin ekspresyon düzeyleri analiz edilmiş olup en yüksek ifade düzeyi ergin erkeklerde olduğu bunu sırasıyla ergin dişi, L4, L3, L2, L1 ve pupa dönemlerinin izlediği belirlenmiştir. Krebs ve Lan (19), *Ae. aegypti* üzerinde gerçekleştirdikleri SCP-2 ekspresyon analizlerinde metodoloji ve yöntem farklı olmakla birlikte çalışmamızda elde edilen sonuca paralel olarak 4. dönem larvadan pupaya geçiten sonra SCP-2 ifade düzeyinin oldukça düştüğünü belirtmişlerdir. Araştırmacılar (19), pupadan çıkan ilk gün dişi ve erkeklerde SCP-2'nin eşit düzeyde eksprese olduğunu ancak 7. günde yalnızca dişilerde saptanabilir düzeyde transkripsiyon gözlemlediklerini belirtmişler, protein düzeyinin ise her iki cinsiyet için de saptanabilir olduğunu kaydetmişlerdir. Çalışmamızda SCP-2 ekspresyonu gen düzeyinde spesifik qPCR analizleri ile gerçekleştirilmiş olup insektaryumda yetiştirilen ve %10 şekerli su ile beslemeleri sağlanan ergin erkeklerde dişilere oranla yaklaşık 3,5 kat daha yüksek ifade düzeyi saptanmıştır. Bu sonuç ergin erkek bireylerin kolesterol metabolizmasında SCP-2 aracılı regülasyonun çok daha yüksek olabileceğine dair kanıtlar ortaya çıkarmış olmakla birlikte bu hipotezin ilgili transkripsiyon ve protein sentez yolları üzerine detaylı çalışmalarla aydınlatılması gerektiği düşünülmüştür.

SONUÇ

Bu çalışma ile vektör potansiyeli yüksek olan *An. sacharovi* için kolesterolün hidrofilik ortama taşınmasında ve metabolize olmasında en önemli proteinlerden birisi olan ve bu yönüyle de özellikle yeni biyoteknolojik ilaç yaklaşımları için önemli bir hedef olarak nitelenen SCP-2'yi eksprese eden gen bölgesi ilk kez karakterize edilmiş ve ilgili sivrisineğin gelişim evreleri ve dokularındaki ekspresyonel farklılıklar ortaya konulmuştur. Çalışma ile SCP-2'nin farklı sivrisinek türlerinde genetik yapısı ve çeşitliliği üzerine mevcut bilgi birikimine katkı sağlanmış ve özellikle *Anopheles* soyu içerisinde korunmuş yapısı ile SCP-2'nin bu soy içerisindeki türlere karşı geliştirilecek yenilikçi mücadele yaklaşımlarında hedef bir protein olarak kullanılabileceğine dair destekleyici kanıtlar sağlanmıştır.

***Etik**

Etik Kurul Onayı: Sivrisinek materyali kullanıldığı için etik kurul onayı alınmamıştır.

Hasta Onayı: Sivrisinek materyali kullanıldığı için hasta onayı alınmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

*** Yazarlık Katkıları**

Konsept: S.A., Ö.D., A.Y., Dizayn: S.A., Ö.D., A.Y., Veri Toplama veya İşleme: S.A., Ö.D., A.Y., Analiz veya Yorumlama: S.A., Ö.D., A.Y., Literatür Arama: S.A., Yazan: S.A., Ö.D., A.Y.

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Finansal Destek: Çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2021-11456 no'lu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Sedaghat MM, Linton YM, Nicolescu G, Smith L, Koliopoulos G, Zounos AK, et al. Morphological and molecular characterization of *Anopheles (Anopheles) sacharovi* Favre, a primary vector of malaria in the Middle East. Syst Entomol 2003; 28: 241-56.
- Akner MM, Çağlar SS. Birecik, Beyşehir ve Çankırı bölgelerinde *Anopheles maculipennis* grup türlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanarak araştırılması. Türkiye Parazit Derg 2010; 34: 50-4.
- Alten B, Çağlar S, Özer N. Malaria and its vectors in Turkey. European Mosquito Bulletin 2000; 27-33.
- Günay F. Türkiye sivrisinek faunası üzerine DNA barkodlama yöntemiyle moleküler analizler. Hacettepe Univ. 2015.
- Simsek FM, Ülger C, Akner MM, Tuncay SS, Kiremit F, Bardakci F. Molecular identification and distribution of *Anopheles maculipennis* complex in the Mediterranean region of Turkey. Biochemical Systematics and Ecology 2011; 39: 258-65.
- Jaenson TG, Lokki J, Saura A. *Anopheles* (Diptera: Culicidae) and malaria in northern Europe, with special reference to Sweden. J Med Entomol 1986; 23: 68-75.
- Kasap H. Comparison of experimental infectivity and development of *Plasmodium vivax* in *Anopheles sacharovi* and *An. superpictus* in Turkey. Am J Trop Med Hyg 1990; 42: 111-7.
- Romi R. *Anopheles labranchiae*, an important malaria vector in Italy, and other potential malaria vectors in Southern Europe. European Mosquito Bulletin 1999; 4: 8-10.
- Romi R, Sabatinelli G, Majori G. Could malaria reappear in Italy? Emerg Infect Dis 2001; 7: 915-9.
- Abdel-Malek A. The Anopheline Mosquitoes of Northern Syria. Bulletin de la Societe Entomologique d'Egypte 1958; 42: 519-35.
- Berberian D. The Species of Anopheline Mosquitoes found in Syria and Lebanon. Their Habits, Distribution and Eradication. J Palest Arab Med Assoc 1946; 1: 120-46.
- Christophers S. A Summary of Recent Observations upon the *Anopheles* of the Middle East. Indian J Med Res 1920; 7.
- Zahar A. Review of the ecology of malaria vectors in the WHO Eastern Mediterranean Region. Bull WHO 1974; 50: 427.
- Ramsdale C, Snow K. Distribution of the genus *Anopheles* in Europe. European Mosquito Bulletin 2000; 1-26.
- Focks DA, Brenner RJ, Hayes J, Daniels E. Transmission thresholds for dengue in terms of *Aedes aegypti* pupae per person with discussion of their utility in source reduction efforts. Am J Trop Med Hyg 2000; 62: 11-8.
- Rawlins SC. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. Rev Panam Salud Publica 1998; 4: 243-51.
- Kim MS, Wessely V, Lan Q. Identification of mosquito sterol carrier protein-2 inhibitors. J Lipid Res 2005; 46: 650-7.
- Jing X, Behmer ST. Insect sterol nutrition: physiological mechanisms, ecology, and applications. Annu Rev Entomol 2020; 65: 251-71.
- Krebs K, Lan Q. Isolation and expression of a sterol carrier protein-2 gene from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Mol Biol 2003; 12: 51-60.
- Blitzer E, Vyazunova I, Lan Q. Functional analysis of AeSCP-2 using gene expression knockdown in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Mol Biol 2005; 14: 301-7.
- Lan Q, Massey RJ. Subcellular localization of the mosquito sterol carrier protein-2 and sterol carrier protein-x. J Lipid Res 2004; 45: 1468-74.
- Dyer DH, Vyazunova I, Lorch JM, Forest KT, Lan Q. Characterization of the yellow fever mosquito sterol carrier protein-2 like 3 gene and ligand-bound protein structure. Mol Cell Biochem 2009; 326: 67-77.
- WHO. World Health Organization Publications. Int J Epidemiol 1975; 4: 231.
- Schaffner E, Angel G, Geoffroy B, Hervy J, Rhaïem A, Brunhes J. The Mosquitoes of Europe. CD-ROM 2011.
- Sevgili E, Simsek FM. Distribution pattern and molecular identification of *Anopheles maculipennis* complex in eight river basins of Anatolia, Turkey. North West J Zool 2012; 8: 223-31.
- Kronefeld M, Werner D, Kampen H. PCR identification and distribution of *Anopheles daciae* (Diptera, Culicidae) in Germany. Parasitol Res 2014; 113: 2079-86.
- Proft J, Maier WA, Kampen H. Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. Parasitol Res 1999; 85: 837-43.
- Kasap H, Alptekin D, Kasap M, Güzel AI, Lüleyap U. Artificial bloodfeeding of *Anopheles sacharovi* on a membrane apparatus. J Am Mosq Control Assoc 2003; 19: 367-70.
- Kasap M, Kasap H. Laboratory colonization of *Anopheles sacharovi*, the principal vector of human malaria in Turkey. Mosq News 1983; 43: 498-9.
- CDC, 2022. Available from: <https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/life-cycles/anopheles.html> Accessed: 22.07.2022.
- Dzaki N, Ramli KN, Azlan A, Ishak IH, Azzam G. Evaluation of reference genes at different developmental stages for quantitative real-time PCR in *Aedes aegypti*. Sci Rep 2017; 7: 43618.
- Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. Mol Biol Evol 2008; 25: 1253-6.
- Liew JW, Fong MY, Lau YL. Quantitative real-time PCR analysis of *Anopheles dirus* TEP1 and NOS during *Plasmodium berghei* infection, using three reference genes. PeerJ 2017; 5: e3577.
- Nirmala X, Marinotti O, James AA. The accumulation of specific mRNAs following multiple blood meals in *Anopheles gambiae*. Insect Mol Biol 2005; 14: 95-103.
- Radek JT, Dyer DH, Lan Q. Effects of mutations in *Aedes aegypti* sterol carrier protein-2 on the biological function of the protein. Biochemistry 2010; 49: 7532-41.
- Xu C, Li H, Tang CK. Sterol carrier protein 2 in lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease: Pathophysiology, molecular biology, and potential clinical implications. Metabolism 2022; 131: 155180.
- Gallegos AM, Atshaves BP, Storey SM, Starodub O, Petrescu AD, Huang H, et al. Gene structure, intracellular localization, and functional roles of sterol carrier protein-2. Prog Lipid Res 2001; 40: 498-563.
- Pfeifer SM, Sakuragi N, Ryan A, Johnson AL, Deeley RG, Billheimer JT, et al. Chicken sterol carrier protein 2/sterol carrier protein x: cDNA cloning reveals evolutionary conservation of structure and regulated expression. Arch Biochem Biophys 1993; 304: 287-93.

39. Stolowich NJ, Petrescu AD, Huang H, Martin GG, Scott AI, Schroeder F. Sterol carrier protein-2: structure reveals function. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 193-212.
40. van Noort M, Rommerts FF, van Amerongen A, Wirtz KW. Intracellular redistribution of SCP2 in Leydig cells after hormonal stimulation may contribute to increased pregnenolone production. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 154: 60-5.
41. Xu TS, Bowman EP, Glass DB, Lambeth JD. Stimulation of adrenal mitochondrial cholesterol side-chain cleavage by GTP, steroidogenesis activator polypeptide (SAP), and sterol carrier protein2. GTP and SAP act synergistically. *J Biol Chem* 1991; 266: 6801-7.
42. Baum CL, Reschly EJ, Gayen AK, Groh ME, Schadick K. Sterol carrier protein-2 overexpression enhances sterol cycling and inhibits cholesterol ester synthesis and high density lipoprotein cholesterol secretion. *J Biol Chem* 1997; 272: 6490-8.
43. Baum CL, Kansal S, Davidson NO. Regulation of sterol carrier protein-2 gene expression in rat liver and small intestine. *J Lipid Res* 1993; 34: 729-39.
44. Grieneisen ML. Recent advances in our knowledge of ecdysteroid biosynthesis in insects and crustaceans. *Insect Biochem Mol Biol* 1994; 24: 115-32.
45. Bellés X, Martín D, Piulachs MD. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annu Rev Entomol* 2005; 50: 181-99.
46. Perera H, Wijerathna T. Sterol carrier protein inhibition-based control of mosquito vectors: Current knowledge and future perspectives. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2019; 2019: 7240356.
47. Yun HK, Jouni ZE, Wells MA. Characterization of cholesterol transport from midgut to fat body in *Manduca sexta* larvae. *Insect Biochem Mol Biol* 2002; 32: 1151-8.
48. Stremmel W, Pohl J, Ring A, Herrmann T. A new concept of cellular uptake and intracellular trafficking of long-chain fatty acids. *Lipids* 2001; 36: 981-9.

Petek Güvesi Larvalarına Karşı Bazı Bitkisel Uçucu Yağların ve Entomopatojenik Mantarın Laboratuvar Koşullarında Denenmesi

Experimentation of Essential Oils and Entomopathogenic Fungi Against Wax Moth Larvae in Laboratory Conditions

● Ahmet Onur Girişgin¹, ● Nurgül Çimenlikaya², ● Levent Aydın¹, ● Suna Aslı Zengin³

¹Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye

²Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa, Türkiye

³Arion İlaç ve Sanayi Tic. A.Ş., İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Girişgin AO, Çimenlikaya N, Aydın L, Zengin SA. Experimentation of Essential Oils and Entomopathogenic Fungi Against Wax Moth Larvae in Laboratory Conditions. Türkiye Parazitoloj Derg 2022;46(4):322-6.

ÖZ

Amaç: Petek güvelerinin larvaları, bal arısı kovanlarında ve özellikle depolanmış peteklerde büyük zararlar meydana getirmektedir. Depolarda petek güvesi mücadelesinde; arıya, ürüne ve çevreye zarar vermeyen biyolojik mücadele yöntemleri önem kazanmıştır. Bu çalışma; %5 oranında karanfil, kekik ve defne bitkilerinin uçucu yağlarının ve *Metarhizium anisopliae* entomopatojenik mantarından elde edilen ticari preparatın, petek güvesi larvalarına karşı laboratuvar koşullarındaki etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Yöntemler: Uçucu yağların içerik analizleri, gaz kromatografi/kütle spektrometrisi cihazı ile yapılarak bileşenleri belirlenmiştir. Daha önceden toplanan ve kültür edilmiş küçük petek güvesi (*Achroia grisella*) larvaları, dönemlerine göre küçük/orta/büyük olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. On beşer larvadan oluşan her grup için üçer uçucu yağ ile birer mantar denemesi yapılmış, ikişer de kontrol grubu oluşturulmuştur. Denemeler cam kavanozlarda yapılmış ve larvalar 25 °C sıcaklık/%75 nispi nem koşullarında bir etüvde muhafaza edilmişlerdir. Her kavanoz dokuz hafta boyunca her gün kontrol edilerek ölü/canlı larvalar kaydedilmiş ve ölü olanlar kavanozdan alınmıştır.

Bulgular: Çalışma sonunda her grup için ölü larva ve kalanlardan kelepke çıkma oranları belirlenmiştir. Yüzde ortalamalarına göre; uçucu yağ gruplarıyla kontrol grubu arasında bir fark görülmezken, mantar gruplarının kontrol gruplarına göre etkili oldukları gözlenmiştir.

Sonuç: Elde edilen verilere göre, *M. anisopliae* mantarı preparatının, depo koşullarında petek güvesi larvalarına karşı alternatif bir kontrol yöntemi olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Entomopatojenik mantar, kontrol, petek güvesi, uçucu yağ

ABSTRACT

Objective: Larvae of wax moths cause great harm to honeybee hives and especially stored honeycombs. In the battle for wax moth in storage rooms; biological methods of struggle that does not harm the bee, product and the environment have become important. This study was conducted to determine the effect of essential oils of cloves, thyme and bay plants at 5% and commercial preparation derived from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions against wax moth larvae.

Methods: Content analyses of essential oils have determined components by doing them with the gas chromatography/mass spectrometry device. Previously collected and cultured lesser wax moth (*Achroia grisella*) larvae are divided into three groups, small/medium/large, based on their period. For each group of fifteen larvae, three volatile oils, one fungal experiment were performed, and two control groups were formed. The trials were conducted in glass jars and the larvae were retained in an incubator with a temperature of 25 °C/75% relative humidity conditions. Each jar was checked daily for nine weeks with dead/live larvae recorded and dead ones taken from the jar.

Results: At the end of the study, moth emerging rates were determined for each group of dead larvae and remainders. Based on their percentage average; while no difference was seen between the essential oil groups and the control group, the fungal groups were observed to be effective relative to the control groups.



Geliş Tarihi/Received: 16.03.2022 Kabul Tarihi/Accepted: 24.08.2022

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Ahmet Onur Girişgin, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye

Tel/Phone: +90 224 294 13 17 **E-Posta/E-mail:** aogirisgin@uludag.edu.tr **ORCID ID:** orcid.org/0000-0002-0020-2708

Conclusion: According to the data, it was determined that *M. anisopliae* fungus preparation could be used as an alternative control methods against wax moth larvae in storage conditions.

Keywords: Entomopathogenic fungus, control, essential oil, wax moth

GİRİŞ

Bal arısı yetiştiriciliğinde gözlenen hastalık ve zararlılar, uygun kontrol ve tedavi yöntemleri uygulanmazsa, sektörde ciddi ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Dünyada arıcılık sektöründe görülen zararlı organizmalara karşı, çevre-ürün-arı dostu ilaçların kullanımı giderek artmaktadır. Arı yetiştiriciliğinde kimyasal ilaçlar, sadece arı zararlısı *Varroa destructor* (Anderson & Trueman, 2000) parazitine karşı sınırlı olarak kullanılmakta, başka herhangi bir etkene karşı kimyasal ilaç veya antibiyotik kullanılmamaktadır (1,2).

Bal arısı zararlılarından petek kurdu, mum kurdu, mum güvesi olarak da tanınan petek güvelerinin larvaları, kovanlarda ve depolanmış peteklerde büyük zararlar meydana getirmektedir. Ergin veya pupa evresi peteklerde bir tahribata neden olmazken, larvaları özellikle karanlık, sıcak ve havalandırması yetersiz ortamlarda depolanan peteklere ve zayıf kolonili kovanlara büyük zararlar vererek ekonomik kayıplara neden olur (3). Ülkemizde büyük [*Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758)] ve küçük petek güvesi [*Achroia grisella* (Fabricius, 1794)] olarak tanınan iki çeşidi bulunmaktadır. İki tür aynı anda kovanları/petekleri istila edebilir ve biyolojileri benzerdir (4,5). Petek güveleri Türkiye'nin birçok bölgesinden ve ilinden bildirilmiş, yaygın bir bal arısı paraziti ve depo zararlısıdır (6-8).

Güvelerin erginlerinin, yavru dönemlerinin (larva/pupa) veya dışkılarının; tek başına veya birlikte petek üzerinde çıplak gözle görülmesiyle teşhis konmaktadır. Güçlü arı kolonilerinde güve problemi görülmemekte, işçi arılar bu kelebeği kovanda gördükleri anda saldırarak onu etkisiz hale getirmekte veya güve yumurtalarını kovandan çıkarmaktadırlar (3,5).

Depolarda petek güvesi mücadelesi teknik, fiziksel, biyolojik ve kimyasal olmak üzere dörde ayrılmakta; peteğe (dolaylı olarak arıya ve insana) ve çevreye zarar vermeyen biyolojik mücadele yöntemleri özellikle önem kazanmaktadır. Günümüzde biyolojik mücadelede ticari olarak iki etken madde kullanılmaktadır: 1) *Bacillus thuringiensis* (Berliner 1915) bakterisi ve 2) *Metarhizium anisopliae* (Sorokin, 1879) entomopatojenik mantarı (1,5). Bakteriyel ürün Türkiye'de kullanılmaktayken, mantar ürünü Türkiye'de bulunmamakta, sadece birkaç ülkede bulunmaktadır.

Bitkisel yağlar ve *M. anisopliae* mantarıyla ilgili dünyada farklı ülkelerde birçok çalışma yapılmasına rağmen, Türkiye'de yapılan araştırmalar sınırlıdır. Sohail ve ark. (9), bitkisel yağların içinde bulunan bazı bileşikler kullanarak hazırladıkları çalışmada, en çok thymolün etkili olduğunu bulmuşlardır. Said ve ark. (10) ise lavanta, nane, okaliptüs, karanfil ve biberiye bitkilerinin uçucu yağlarını larvalar üzerine denediklerinde; biberiye, lavanta ve okaliptüsün larvaları öldürmede başarılı olduğunu gözlemişlerdir. Oreste ve ark. (11), güve mücadelesinde *Beauveria bassiana*'nın yüksek, *M. anisopliae*'nin orta düzeyde etkili olduğunu bildirmişlerdir. Türkiye'de bitkisel ürünlerin petek güvesi larvaları üzerine yapılmış bir çalışma bulunmazken, entomopatojenik mantarlarla yapılan tek çalışmada araştırmacılar *Beauveria* ve *Metarhizium* mantarlarının güveler üzerine etkili olduğunu belirlemişlerdir (12).

Bu çalışma, %5'lik karanfil-defne-kekik uçucu yağlarının ve *Metarhizium anisopliae* mantarından elde edilen preparatın, küçük petek güvesi larvalarına karşı laboratuvar koşullarındaki etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

YÖNTEMLER

Larvaların ve Peteklerin Hazırlanması

Daha önceden sönmüş arı kovanlarından larvalar toplanmış ve laboratuvarda kültür edilmiştir. Kültür sonucu küçük petek güvesi (*Achroia grisella*) olarak teşhis edilen larvalar, dönemlerine (büyüklüklerine) göre küçük (L1-L3)/orta (L4-L5)/büyük (L6-L8) olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Larvaların ayırımında baş genişliği esas alınmıştır (12). Temel petekler 6×6 cm ebatlarında kesilerek, 7 cm çapında ve 13 cm yüksekliğindeki cam kavanozlar içerisine konulmuşlardır. Her bir petekli kavanoza larva gruplarından beşer larva konarak (her kavanozda toplam 15 larva), deneme ve kontrol grupları hazır hale getirilmiştir.

Bitkisel Uçucu Yağların Hazırlanması

Çalışmada kullanılan karanfil, kekik ve defne uçucu yağları ticari ürün olarak elde edilmiş ve seyreltici olarak aseton kullanılarak her bir bitkisel yağdan %5 oranında solüsyonlar hazırlanmıştır. Her solüsyon temiz sprey şişelerine konularak, petek numuneleri üzerine tüm yüzeyi kaplayacak şekilde ortalama 1 mL püskürtülmüştür.

Uçucu Yağ Analizleri

Kullanılan uçucu yağların içerik tayinleri, gaz kromatografi/kütle spektrometrisi (GC/MS) cihazı ile yapılarak bileşenleri belirlenmiştir. Analiz koşulları Girişgin ve ark.'dan (13) alınmış, bileşenlerin miktarları ve tanımlamaları cihaza ekli yazılım ve kütüphane tarafından belirlenmiştir.

Mantar Preparatının Hazırlanması

Metarhizium anisopliae mantar sporu içeren toz preparat, yurtdışındaki bir firmadan temin edilmiştir. Üretici firmanın belirttiğine göre, toz preparatta mantar sporu oranı %1,15'tir. Yani 100 gr üründe 1,15 gr mantar sporu bulunmaktadır. 1 gr sporda ise ortalama 10⁸ (Yüz milyon) adet spor bulunmaktadır. Her bir deneme grubu için; 5 gr ürün + 5 mL distile su karıştırılıp toplam 10 mL süspansiyon elde edildikten sonra, homojenizasyon amacıyla içerisine birkaç damla Tween 20 damlatılmıştır (11). Hazırlanan süspansiyon, bir fırça yardımıyla hazırlanan temel petek numunelerinin üzerine film tabakası oluşturacak şekilde sürülmüştür.

Kontrol Grubunun Hazırlanması

Kontrol gruplarında ise; küçük/orta/büyük beşer larvadan toplam 15 larva içeren iki kavanoz hazırlanmıştır. Birinci kontrol grubunda uçucu yağları seyreltmekte kullanılan aseton püskürtülmüş, ikinci kontrol grubunda ise mantar preparatını sulandırmada kullanılan distile su püskürtülmüştür. Her iki kontrol grubunda da aseton/distile su uygulanan petekler kuruyunca, larvalarla birlikte deneme kavanozlarına konmuştur.

Laboratuvar Denemeleri

Uygulanan mantar süspansiyonları veya uçucu yağ solüsyonları kuruduktan sonra, her gruba ait larvalar kavanozlara konmuş ve kavanozlar 25 °C sıcaklık/%75 nispi nem koşullarında etüvde muhafaza edilmişlerdir. Güvelerin yaşam döngüsü 1-9 hafta arasında değişebildiği için, her kavanoz dokuz hafta boyunca her gün kontrol edilmiş, ölen larvalar toplanarak kavanozdan alınmış, kalan pupalardan canlı güve çıkma sayıları kaydedilmiştir. Üç dönem larva içeren birer grup deneme ve birer grup kontrol olmak üzere 12 kavanoz kullanılmış ve ikiye tekrar yapılmıştır (toplam 8 deneme + 4 kontrol). Larva dönemlerine ve günlere göre ölüm oranları belirlenmiştir.

Kovan Denemeleri

Deneme gruplarında kullanılan ürünlerin pratikte olası kullanımı durumunda, bal arılarının bu petekleri örme için tercih etme davranışını tespit etmek istenmiştir. Bu amaçla, standart boy kullanıma hazır temel petekler çerçevelere gerilerek, denemelerde kullanılan ürünler ikiye çerçeveye aynı şekilde uygulanmıştır (dört deneme grubu için toplam sekiz çerçeve). Kontrol grubu olarak ise bir gruba aseton bir gruba distile su uygulanarak ayrı koliler içinde muhafaza edilmişlerdir. Depoda dört ay boyunca (kış sezonunda) bekletilen çerçeveler, ilkbahar nektar akımı sezonunda her bir arılı kovanın ballık katına ikiye çerçeve olmak üzere altı kovana konmuştur (dört deneme iki kontrol kovani).

İstatistiksel Analiz

Kullanılan ürünlerin etkinlikleri için, kullanımdan sonraki larva sayılarının öncekilerine göre farkının yüzdeleri hesaplanarak değerlendirme yapılmıştır. Ayrıca gruplar arası farklılığı belirlemek amacıyla Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır (14).

BULGULAR

Toplam dokuz hafta boyunca, her gün yapılan kontroller sonucu elde edilen veriler tablo haline getirilmiştir (Tablo 1). Genel olarak, deneme gruplarında ölen larvalar genelde ilk dört hafta içinde ölmüşlerdir. Bitkisel uçucu yağlardan karanfil, kekik ve defne gruplarında ilk dört haftadaki larva ölüm oranları sırasıyla ortalama %43,3; %26,6; %3,3 olmuşken, mantar grubunda ise %66,6 olmuştur. Kontrol gruplarında ise her iki grupta da ilk dört haftadaki larva ölüm oranı %0 olmuştur, yani hiç larva ölmemiştir. Tüm gruplarda ölümlerin dokuz haftaya yayıldığı gözlenmiştir. Denemelerin yapıldığı sürede yani dokuz haftadaki larva ölüm oranları ve tüm evrelere göre ölüm yani ürünlerin etkinlik oranları ise tabloda belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre en yüksek etkinliğin mantar grubunda olduğu (%88,35), daha sonra ise sırasıyla karanfil (%64,95), kekik (%56,65) ve defne (%35,0) uçucu yağlarının geldiği görülmektedir. Gruplara uygulanan çoklu karşılaştırma testine göre dokuz hafta sonunda; kontrol gruplarıyla tüm deneme grupları arasında, mantar grubuyla kekik ve defne uçucu yağları arasında belirgin bir fark olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$).

Bitkisel uçucu yağların içerikleri çoğunluk (majör) bileşenleri ile tabloda verilmiştir (Tablo 2). Buna göre karanfile en çok eugenol (%75,3), defne 1,8 cineole (%71,5), kekikte ise carvacrol (%80,2) bileşenleri bulunmaktadır.

Takip eden ilkbahar sezonunda (Mayıs 2021), mantar süspansiyonu ve uçucu yağ uygulanmış ikiye petek, arılı kovanlara kat şeklinde verilmiş ve arıların peteğe çıkma ve petek

örme davranışları gözlenmiştir. Aynı zamanda kontrol grubuna da herhangi bir işlem görmemiş temel petekler verilmiştir. Petekler verildikten bir gün sonra ve birer hafta arayla iki kez kontrol edilmiş, deneme ve kontrol grupları arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir. İlk kontrollerde arıların her grupta eklenen peteklere çıktıkları, sonraki kontrollerde ise petek örmeye başladıkları görülmüştür. Bu zaman aralığında anormal arı ölümleri gözlenmemiştir.

TARTIŞMA

Bal arısı hastalıklarında biyolojik ve doğal ürünlerden elde edilen ürünlerin kullanımı, insan/arı sağlığı ve gıda/çevre güvenliği açısından son yıllarda önem kazanmaktadır. Bu doğrultuda arı zararlılarından biri olan petek güvelerine karşı da doğal koruma yolları bulunmaya çalışılmaktadır. Şimdiye kadar gerek Türkiye'de gerek dünyadaki diğer bazı ülkelerde bazı çalışmalar yapılmıştır. Bakteri içeren solüsyon püskürtmek (15), karbondioksit gazı uygulaması (16), soğuk uygulaması (17) gibi uygulamalar yapılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır.

Bitkisel özler veya mantarların petek güvelerine karşı etkinliği, çeşitli çalışmalarda belirlenmiştir. Denenen ürünlerin oranları ve miktarları farklılık göstermektedir. Baydar ve ark. (18), *G. mellonella*'nın 3. ve 4. dönem larvalarına karşı farklı mantarların etkinliğini denemişler ve denemelerden sonraki ilk 10 günde en çok *Beauveria* ve *Metarhizium* cinsi mantarların etkili olduğunu bulmuşlardır. Doğan ve Keskin (19) ise, *Beauveria bassiana* mantarının 10^7 /mL spor içeren solüsyonunu en etkili bulmuşlardır. Buna rağmen, Abu-Shaara (20), *B. bassiana*'nın etkili olabilmesi için larva başına 6 gr ürün gerektiğini ve bunun pratikte pek anlamlı olmadığını belirtmiştir. Çalışmamızda ise *M. anisopliae* mantarından elde edilen ürün, 36 cm² temel petek üzerine 5 gr uygulanarak olumlu sonuçlar alınmıştır.

Farklı bitkilerin uçucu yağlarıyla ilgili çeşitli denemeler yapılmış ve farklı sonuçlar alınmıştır. Mahmoud ve Abdel-Rahman (21); karanfil, sarımsak ve biberiye yağlarını %1,5 ve %3 oranlarında 4. dönem larvalar üzerine denemişler ve bir hafta sonra yağların larvalara karşı ortalama etkinliğini sırasıyla %68,3; %51,6 ve %38,6 olarak bulmuşlardır. Said ve ark. (10), dört farklı oranda beş farklı uçucu yağı, 3. dönem larvalar üzerinde denemişler ve denemelerden sonraki 24 ve 48. saatlerde ölçümler yapmışlardır. Bir önceki araştırmacıların aksine, %100'lük en yüksek etkiyi %20 'lik biberiye uçucu yağında bulmuşlardır. Denedikleri diğer uçucu yağlar olan lavanta, okaliptüs, karanfil ve nanede ise yağ oranı yükseldikçe etkinin arttığını (%72-92) belirtmişlerdir.

Bazı çalışmalar ise sadece bitkinin uçucu yağından değil, yağın içeriğindeki moleküllerle yapılmıştır. Genelde yağ içinde yüksek oranda bulunan ve insektisit/larvisit etkileri olduğu düşünülen thymol, carvacrol, carvone, estragole, citral, linalool, limonene ve γ -terpinene ile yapılan bir çalışmada, bu özler çeşitli oranlarda güve larvalarının diyetine konmuş veya vücutlarına temas ettirilmiştir. Denemelerden 72 saat sonra yapılan ölçümlerde thymol, carvacrol, carvone ve citral yüksek toksisite göstermişken, diğerleri düşük toksisite göstermiştir (9). Yüksek etki gösteren bu moleküllerden thymol, carvacrol ve carvone, çalışmamızda kullanılan bitkilerin içerisinde de bulunmaktadır.

Kullanılan ürünlerin bal arısı kolonilerine yani arı bireylerine olası etkileri, yukarıda bahsedilen çalışmalarda denenmemiş, sadece laboratuvar çalışmaları yapılmıştır. Bizim çalışmamızda olduğu gibi bazı araştırmacılar, kullandıkları ürünlerin laboratuvar

Tablo 1. Deneme ve kontrol gruplarında elde edilen veriler ve ortalama etkinlikler

Deneme	1. hafta ölen larva			2. hafta ölen larva			3. hafta ölen larva			4. hafta ölen larva			9 haftada toplam ölen larva sayısı				Kalanlardan kekebek çıkma oranı %				Tüm evrelere göre ürünün ortalama etkinliği %
	K	O	B	K	O	B	K	O	B	K	O	B	K	O	B	% Ortalama	K	O	B	Ort.	
Mantar 1	1	1	0	4	4	5	-	-	-	-	-	-	5	5	5	80,0	-	-	-	3,3	88,35
Mantar 2	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	5	2	2		-	-	20		
Karanfil 1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	43,2	0	0	20	13,3	64,95
Karanfil 2	2	2	3	1	0	1	0	0	0	0	1	1	3	3	5		0	0	60		
Kekik 1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	26,6	0	0	20	13,3	56,65
Kekik 2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	4	2		0	0	60		
Defne 1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	3,3	0	0	20	33,3	35,0
Defne 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	80	100		
Kontrol																					
Distile su-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	1	10	100	95	95	97,5	-
Distile su-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0		95	100	100		
Aseton-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	3,3	100	100	100	99,1	-
Aseton-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0		100	95	100		
K: Küçük, O: Orta, B: Büyük																					

K: Küçük, O: Orta, B: Büyük

denemelerinin yanında, ürünlerin aralı kovandaki etkisini de denemişlerdir. Telles ve ark. (22), neem ve okaliptüs yağlarının yanında tütün ve malagueta biberi özlerini hem larvalara hem de ergin arılara püskürterek uygulamışlardır. Kullandıkları tüm ürünlerin güve larvalarına etkili olduğunu tespit etmişler, fakat Neem ve okaliptüs yağlarının ergin arılara toksik etki gösterdiğini belirtmişlerdir (22). Çalışmamızda ürünlerin arılara etkisinin olup olmadığı, ürünleri direkt arılar üzerine uygulayarak değil, ürün uygulanmış peteklerin arılara verilmesi ve peteğe çıkma/örme tercihlerini gözlemleyerek tespit edilmiştir. Gerek uçucu yağlar gerekse mantarların direkt arılar üzerine uygulanmasının arılara zarar vereceği bilinmektedir ve gerçekçi bir yaklaşım değildir.

Arıların peteğe çıkma ve petek örme davranışının etkilanmemesinin sebebinin, uçucu yağların belirli bir süre

sonunda balmumundan buharlaşması olduğu; depoda yapılacak uygulamada ise buharlaşmaya kadar geçecek olan sürenin, yeterli sayıda güve larvasının ölümüne sebep olacağı ve belirlenen oranlarda enfestasyonu azaltacağı düşünülmektedir. Çalışmamızda kullanılan ürünlerden *M. anisopliae* mantar sporu içeren tozun etkinliğinin (%88,35), bitkisel uçucu yağların etkinliklerinden [en yüksek karanfil (%64,95)] belirgin şekilde yüksek olduğu ortaya konmuştur. Bunun muhtemel sebebinin, bitkisel uçucu yağların pestisit etkisinin çevre/ortam koşullarına göre değişken olabilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada kullanılan mantar sporu tozundan ve dört bitkisel uçucu yağdan, bal arılarının ve depodaki peteklerin önemli zararlılarından biri olan petek güveleriyle (Lepidoptera: Pyralidae) mücadele konusunda umut verici sonuçlar alınmıştır. Ürünlerin standardizasyonu ile ilgili ileri çalışmalar yapılarak ürünün sonbaharda depoda uygulanması ve ilkbaharda bu peteklerin kovana verilmesiyle, petek güvesinin doğal ürünlerle mücadelesinde pratik ve kullanışlı bir yöntem uygulanabilecektir.

***Bilgilendirme:** Dayanak: 2547 sayılı Yükseköğretim Kanunu'nun 14'üncü maddesine dayalı olarak 15/2/2014 tarih ve 28914 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan Hayvan Deneyleri Etik Kurallarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik, Madde 4, Fıkra 1-d.

*Etik

Etik Kurul Onayı: Makalemiz, omurgasız canlıları kapsadığından herhangi bir etik kurul izni gerektirmemektedir.

Hasta Onayı: Makalemiz, omurgasız canlıları kapsadığından gerek duyulmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Tablo 2. Bitkisel uçucu yağların GC/MS ile yapılan içerik tayini sonucu yağların çoğunluk (majör) içerikleri

Uçucu yağ	İçerik	%
Karanfil	Eugenol	75,35
	Trans-caryophyllene	9,10
	Beta-selinene	2,15
	Delta-cadinene	0,98
Defne	1,8 cineole	71,5
	Sabinen	6,4
	Alfa terpinil acetate	6,2
	Beta pinene	1,8
Kekik	Carvacrol	80,2
	P-cymene	6,5
	Trans caryophyllene	1,5
	Thymol	1,4

GC/MS: Gaz kromatografi/kütle spektrometrisi

***Yazarlık Katkıları**

Medikal Uygulama: N.Ç., Konsept: S.A.Z., Dizayn: L.A., Veri Toplama veya İşleme: N.Ç., Analiz veya Yorumlama: L.A., S.A.Z., Literatür Arama: A.O.G., Yazan: A.O.G.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Ertürk YE, Yılmaz O. Organic Beekeeping in Turkey. COMU Journal of Agriculture Faculty 2013; 1: 35-42.
2. Aydın L. Varroosis. İçinde: Doğanay A, Aydın L, editörler. Bal Arısı Yetiştiriciliği, Ürünleri, Sağlığı. Dora Basımevi, Bursa. 2021.250-64.
3. Kwadha CA, Ongamo GO, Ndegwa PN, Raina SK, Fombong AT. The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. Insects 2017; 8: 61.
4. Uygur ŞÖ, Girişgin AO. Diseases and Pests of Honeybee. U. Bee J 2008; 8: 130-42.
5. Girişgin AO. Petek güveleri (Büyük petek güvesi). İçinde: Doğanay A, Aydın L, editörler. Bal Arısı Yetiştiriciliği, Ürünleri, Sağlığı. Dora Yayıncılık, Bursa, 2021.267-73.
6. Aydın L, Çakmak İ, Güleğen E, Korkut M. Honeybee Pests and Diseases Survey in Southern Marmara Region of Turkey. U. Bee J 2003; 3: 37-40.
7. Kaygın AT, Yıldız Y. Bartın yöresi bal arısı (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera, Apidae) zararlıları. ZKÜ Bartın Orman Fakültesi Dergisi 2006; 8: 64-73.
8. Kutlu MA. Uludere ilçesi arıcılık işletmelerinin genel yapısı ve arıcılık faaliyetleri üzerine bir çalışma. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi 2019; 6: 511-7.
9. Sohail M, Aqueel MA, Dai P, Ellis JD. The larvicidal and adulticidal effects of selected plant essential oil constituents on greater wax moths. J Econ Entomol 2021; 114: 397-402.
10. Said SM, Hammam MA, Abd-el Kader SK. Insecticidal activity against the greater wax moth (*Galleria mellonella* L.) and chemical composition of five plant essential oils. Menoufia J Plant Prot 2019; 4: 145-61.
11. Oreste M, Bubici G, Polisenio M, Triggiani O, Tarasco E. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin against *Galleria mellonella* L. and *Tenebrio molitor* L. in laboratory assays. Journal of Zoology 2012; 95: 43-8.
12. Ellis JD, Graham JD, Mortensen A. Standard methods for wax moth research. J Apic Res 2013; 52: 1-17.
13. Girişgin AO, Barel S, Zilberman-Barzilai D, Girişgin O. Determining the stability of clove oil (eugenol) for use as an acaricide in beeswax. Israel J Vet Med 2014; 69: 192-6.
14. SPSS® for Windows: Rel. 17.0.0. IBM Statistics 23, Chicago: SPSS Inc, 2018.
15. Boşgelmez A, Cakmakçı L, Gürkan B, Gürkan F, Cetinkaya G. The effects of *Bacillus thuringiensis* on the greater wax moth, *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Galleriidae). Mikrobiyol Bul 1983; 17: 233-42.
16. Akyol E, Yeninar H, Şahinler N, Ceylan DA. The Using of Carbon dioxide (CO₂) on Controlling of The Greater Wax Moth's *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) Damages. U Bee J 2009; 9: 26-31.
17. Akyol E, Korkmaz A. The Effect of -5°C Cold Application to Protect Honeycombs against Greater Wax-Moth *Galleria mellonella* Damage. U Bee J 2008; 8: 26-9.
18. Baydar R, Güven Ö, Karaca I. Occurrence of entomopathogenic fungi in agricultural soils from Isparta province in Turkey and their pathogenicity to *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. Egypt J Biol Pest Control 2016; 26: 323-7.
19. Doğan Y, Keskin NE. Isolation of entomopathogenic fungi from Turkey soil and testing of different doses on *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). Commun Fac Sci Univ Ank Ser C Biology 2020; 29: 213-42.
20. Abu-Shaara HF. Effects of the fungus, *Beauveria bassiana*, on the larval development of the greater wax moth, *Galleria mellonella*, (Lepidoptera: Pyralidae) under laboratory conditions. J Apic 2020; 35: 81-4.
21. Mahmoud MA, Abdel-Rahman YA. Influence of some honey bee products and plant oils on the greater wax moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). Egypt Acad J Biolog Sci (A. Entomology) 2021; 14: 9-20.
22. Telles DM, Martineli GM, Scaloppi MF, Ferreira Da Luz MP, Kadri SM, et al. Natural products can efficiently control the greater wax moth (Lepidoptera: Pyralidae), but are harmless to honey bees. Sociobiology 2020; 67: 89-93.

Effect of Education and Regular Examination on the Prevalence of Head Louse Infestations in Adana

Adana'da Eğitim ve Düzenli Muayenenin Baş Biti Enfestasyonlarının Prevalansına Olan Etkisi

© Hakan Kavur¹, © Halil Özkurt¹, © Fatma Büyükkatran², © Gülşah Evyapan³, © Sümeyye Kalkan⁴,
© Zehra Çelik⁴, © Emine Kurcan⁴, © Duran Ali Karataş⁵, © Davut Alptekin⁶

¹Çukurova University, Karaisalı Vocational School, Adana, Turkey

²Çukurova University Faculty of Education, Department of Classroom Teaching, Adana Turkey

³Van Yüzüncü Yıl University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Van, Turkey

⁴Çukurova University Faculty of Education, Department of Preschool Teaching, Adana, Turkey

⁵Ministry of Health, Community Health Center, Adana, Turkey

⁶Çukurova University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Adana, Turkey

Cite this article as: Kavur H, Özkurt H, Büyükkatran F, Evyapan G, Kalkan S, Çelik Z, Kurcan E, Karataş DA, Alptekin D. Effect of Education and Regular Examination on the Prevalence of Head Louse Infestations in Adana. Türkiye Parazitol Derg 2022;46(4):327-33.

ABSTRACT

Objective: The current study provides training to parents and teachers about pediculosis in schools in three villages in Adana to measure their knowledge level by conducting surveys and to determine the prevalence of pediculosis in these foci.

Methods: Pre- and post-questionnaires including 30 questions about pediculosis were handed to parents and teachers. The answers were analyzed with the Pearson correlation analysis. Overall, 418 school pupils were examined for lice. The results of the head louse control were analyzed by the chi-square test and t-test.

Results: We observed that the level of awareness increased in parents and teachers. Additionally, the gender of both teachers and parents was determined as the most important factor in increasing this awareness. Because of interventions for the control of head and lice, the prevalence of pediculosis decreased from 15.22% to 1.71%.

Conclusion: It is very important that parents and teachers are aware of the health problems related to pediculosis, while regular combing of school children may be essential for the control of this common infestation.

Keywords: Head lice, pediculosis, education, combing, prevalence

ÖZ

Amaç: Çalışmamızın amacı, Adana ilinde üç köyde bulunan okullarda pediküloz konusunda ailelere ve öğretmenlerin bilgi düzeylerini eğitimlerle vererek, ve anketler yardımıyla ölçmek, ve bu odaklarda pediküloz prevalansını belirlemektir.

Yöntemler: Ebeveynlere ve öğretmenlere pediküloz ile ilgili 30 sorudan oluşan ön ve son anket uygulanmıştır. Anketlere verdikleri cevaplar Pearson korelasyon analizi ile analiz edilmiştir. Üç okulda yapılan dört saç biti kontrolünde, ortalama 418 öğrenci taranmıştır. Kontroller sonucunda elde edilen bulgular ki-kare testi ve t-testi ile analiz edilmiştir.

Bulgular: Ebeveynler ve öğretmenlerin pediküloz hakkındaki farkındalık düzeyinin arttığı belirlenmiştir. Ayrıca hem öğretmenlerin hem de velilerin cinsiyet durumu bu farkındalığın artmasında en önemli faktör olarak tespit edilmiştir. Düzenli kontroller sonrasında pediküloz prevalansının %15,22'den %1,71'e düştüğü görülmüştür.

Sonuç: Velilerin ve öğretmenlerin, öğrencilerin karşılaştıkları pediküloz gibi sağlık sorunlarının farkında olmaları çok önemlidir. Ayrıca çalışmanın sonuçları, bu yaygın istilanın kontrolü için okul çocuklarının düzenli taranmasının gerekli olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Saç biti, pedikülozis, eğitim, saç taraması, prevalans



Received/Geliş Tarihi: 12.04.2022 Accepted/Kabul Tarihi: 28.09.2022

Address for Correspondence/Yazar Adresi: Hakan Kavur, Çukurova University, Karaisalı Vocational School, Adana, Turkey
Phone/Tel: +90 322 551 20 57 E-mail/E-Posta: hkavur@cu.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0002-4188-440X

INTRODUCTION

The head louse is an ectoparasitic insect responsible for infestations of humans (pediculosis) worldwide. Head lice, have three life stages as egg, nymph and adult, and are mostly transmitted to humans in spring and winter months. In other publications the prevalence of head louse infestations are higher in autumn months (1). There is no relationship between pediculosis and socio-economic status, but may cause a socially unpleasant condition accompanied by social stigma and pruritus. There are many publications showing that there is a relationship between pediculosis and socio-economic status (2). In pediculosis, the most common symptom is the intense itching in the head area, while secondary infections such as impetigo and furunculosis and lymphadenopathy may occur as a result of bacterial contamination of the abrasions as a result of scratching (3). Head lice control is carried out by mechanical (physical), herbal and chemical (synthetic and semi synthetic) methods, as in other ectoparasitic arthropods. Chemicals such as malathion, carbaryl, permethrin, phenothrin are generally used in the treatment of pediculosis (4). Pediculosis that causes psychological frustration for parents and children, has been known since antiquity. Moreover, preventive and therapeutic practices, such as head shaving and the “no-nit” policy of excluding infected children from school, can also induce social stress that affected their wellbeing. Though the stigma exists that pediculosis is related to being poor and dirty, this was shown to be not correct and children from all socio-economic levels can be infested with head lice (5-7).

Head lice affect approximately 6-12 million people in the United States each year. They are widely seen all over the World (1). There is no relationship between pediculosis and socio-economic status, but lice may cause a socially unpleasant condition accompanied by stigma and pruritus (2). Prevalence of pediculosis was determined to be between 0.3% and 34.1% in previous studies carried out with 578,938 people treated for head in Turkey between 1982 and 2012 years (8). Several risk factors related to the prevalence of pediculosis included the educational status of parents, children's gender and their age (9). The pediculosis prevalence detected in Turkey was found to be higher than in Europe (0.48% to 22.4%), while lower than the many countries in America (3.6% to 61.4%) (10).

It is known that, primary-school students are intermingled in classes and have high contact rates, transmission of *P. h. capitis* occurs frequently. Thus it has been reported in various studies conducted in schools that pediculosis is more common in childhood (11,12). Therefore, it is very important that both teachers and parents are role models in the hygiene education of children and regular head lice controls are very important (13,14). In this study we aimed to lower the prevalence of pediculosis with raising awareness of parents and teachers about pediculosis and conducting regular head lice controls in three schools in Karaisalı district, Adana, Turkey.

METHODS

Ethics Committee Approval

The study was approved by the Ethical Committee of Çukurova University Medical School (letter dated: 05.07.2019 and numbered: 2019-90).

Selection of Schools and Participants

The study was conducted in three schools in the rural area of Karaisalı district, 50 km away from Adana, where pediculosis cases are quite high according to the reports of the local representative of the Ministry of Education in 2018-2019 education period (Figure 1).

Informing and Surveying

The first questionnaire with 30 questions about pediculosis was handed to 363 parents and 34 teachers. Respondents were asked to answer the questions as “True”, “False” and “I don't know”. In a 2-hour courses, teachers and parents were divided into groups and presentations were made by a physician, an education specialist and parasitologists, in which information about the transmission, diagnosis, treatment and social negative effects of pediculosis was given. After the educational session(s), children were examined visually, after having treated those infested a second questionnaire was handed to the teachers and parents in order to determine the effect of education and treatment on the prevalence of pediculosis.

Examination of the Hair for Head Lice

Overall 440, 429, 417 and 407 pupils were examined for head lice in the four schools. Each pupil was examined four times with a louse comb and visually using the fingers. All researchers were experienced doctors and/or parasitologists familiar with the detection methods of head lice and various life stages. The pupils were examined by visual screening, in which the examiner parted the hair using his/her fingers while observing for signs of live lice and/or louse eggs for three minutes (Figure 2). The presence of louse eggs and active lice stages was recorded separately. No distinction was made between the nits and live eggs during the screening. Plastic louse combs (“PDC”, KSL Consulting, Denmark) with a distance between the teeth of 0.15 mm were used (Figure 3). Each part of the scalp was combed three times. At the end of combing removal, the suspected organisms were examined visually to confirm the diagnosis. The children found to be positive for head louse were referred to local GP for treatment.

Statistical Analysis

All statistical analyses were made using the SPSS program. The attitudes and thoughts of teachers and parents about pediculosis after the informative seminars were analyzed with the t-test, in which the answers they gave to the two questionnaires were taken as reference. In addition, Pearson correlation analysis was performed to determine the relationship between the answers given by the respondents to the questions and their educational status, age, etc. Also, the chi-square test was used for the comparison of groups for yes/no variables such as presence/absence of infestation.

RESULTS

Surveying

The correct answers given by the participants to the questions in the first and last questionnaire were compared. It was observed that the level of awareness about pediculosis raised by 9.80% in parents and 9.70% in teachers (Figure 4). T-test results show that awareness of the subject changed significantly between before and after the study ($p < 0.001$) (Table 1).

Table 1. Comparison of the change in knowledge level of parents and teachers (t-test results)

	Status	N	Mean	Standard deviation	t	p
Parents	Before education	363	10.84	4.630	-12.256	0.000*
	After education	363	13.78	3.830		
Teachers	Before education	34	12.09	5.265	-5.429	0.000*
	After education	34	15.00	3.181		

**Figure 1.** Study areas

In particular, the correct answers given by the high school and university graduate parents after the course were found to be 16.15 and 15.5 on average, respectively. In addition, it was determined that the number of correct answers given by the male parents to the questionnaire after the course was higher than that of the females. It was determined that female teachers gave more correct answers to the pre- and post-course questionnaires than male teachers.

According to the results of Pearson correlation analysis, it was determined that there was a significant correlation ($p < 0.05$) between the correct answers given to the first questionnaire and the education level of the students' parents and a significant correlation ($p < 0.01$) between the gender. In the last questionnaire, it was determined that the correct answers showed a significant correlation ($p < 0.01$) regarding the educational status and a significant correlation ($p < 0.01$) regarding the province in which they were living (Table 2). When the same analysis was repeated for the teachers, the province, and the educational status was not taken into account. It was determined that there was a significant correlation between the correct answers given by the teachers to the first and last questionnaires and their gender status (Table 3).

Pediculosis' Prevalence

The highest in the first combing to detect head lice was in the school in the Etekli neighborhood with 98.02%. During the first combing, 22.3% of the female pupils were found to be positive for pediculosis. Tables 4 and 5 show the pediculosis prevalence by

**Figure 2.** Head combing of students for detection pediculosis



Figure 3. Plastic comb for head lice detection

gender and villages, respectively. According to chi-square analysis, there was a significant difference between the infestation rate of the gender and the villages except for 3th and 4th combing results ($p < 0.01$). In Çukur district the prevalence was 24.82%. In the second combing, the prevalence of pediculosis decreased in both female and male 0.5% and 6.45%, respectively. The prevalence value increased in the third combing from 0.49 to 2.45 in male students, while no additional infested individuals were found in in Etekli village during the third examination. The lowest prevalence was observed in the last combing. Only 7 out of 407 students in three village schools were positive for pediculosis.

DISCUSSION

Pediculosis sometimes causing epidemics, is seen as a public health problem especially in rural areas. The knowledge about pediculosis of the pupils, parents and teachers in the schools and the timely diagnosis and early intervention play an important role in solving the problems caused by this infestation.

Head lice infestation causes not only clinical symptoms but also psychological stress because children and parents believe that head lice infestation is a result of being dirty. In the ages when children are forming their personality development and self-

confidence, encountering the problem of pediculosis creates psychological stress for them due to the environmental pressure. Children can overcome these negative situations only with the right approach of parents and teachers (7). The role of parents and teachers in communicating with the children and supporting the child's personality development is indisputable (15).

In the present study, it was aimed to increase the awareness levels of parents and teachers regarding pediculosis. The present results show that awareness of pediculosis varies according to both education and gender status in parents, and only gender status in teachers (Table 1). In a study that analyzed parents' communication with children and their contribution to education, it was shown determined that educational status and gender caused significant differences. In terms of educational level, it has been determined that there is a significant difference in the sub-dimensions of "communicating", volunteering "and" learning at home in favor of high school and university graduates (16). The education of teachers and parents on pediculosis is of paramount importance (17,18).

Between 1982 and 2012, 63 pediculosis prevalence studies were conducted in Turkey (8). The prevalence of pediculosis was 0.3-34.1% in elementary schools examined. The infestation rate was twice more in girls than in boys ($p < 0.05$), which is in agreement with our findings. Those studies also have shown that the prevalence increased with worsening economic status ($p < 0.05$) and the prevalence was high as 44.1% among children with illiterate mothers.

In our study, the overall observed prevalence of head lice was 15.22% during the first combing and decreased to 1.71% during the fourth combing. The prevalence could be lowered by education and regular combing for lice. We believe that also in Turkey that the prevalence of pediculosis has decreased due to social distancing during Coronavirus disease-2019 pandemic. In a study conducted in Argentina it was shown that the prevalence dropped from 69.6% to 43.9% (19).

CONCLUSION

In conclusion, head lice are common in school-age children. Head lice can be seen in all socio-economic situations, and families' awareness of the issue affects its prevalence. Timely diagnosis and early intervention with regular controls is important for

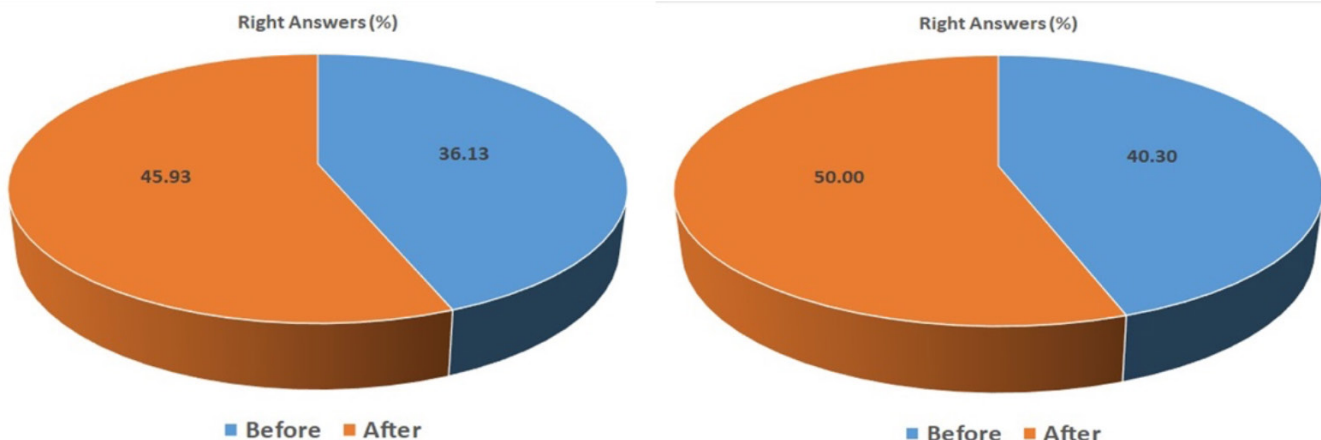


Figure 4. The level of development of awareness about pediculosis in parents and teachers

Table 2. Pearson correlation results of the correct answers given by the parents to the pre- and post-questionnaires

Pre-questionnaires					Post-questionnaires						
		Province	Gender	Education	Correct answers			Province	Gender	Education	Correct answers
Province	Correlation sig. (2-tailed) N	1	0.099	0.041	0.092	Province	Correlation sig. (2-tailed) N	1	0.099	0.041	0.110*
		-	0.059	0.440	0.080			-	0.059	0.440	0.037
		363	363	363	363			363	363	363	
Gender	Correlation sig. (2-tailed) N	0.099	1	0.064	0.188**	Gender	Correlation sig. (2-tailed) N	0.099	1	0.064	0.029
		0.059	-	0.223	0.000			-	0.223	0.223	0.583
		363	363	363	363			363	363	363	
Education	Correlation sig. (2-tailed) N	0.041	0.064	1	0.127*	Education	Correlation sig. (2-tailed) N	0.041	0.064	1	0.139**
		0.440	-	-	0.015			0.440	-	-	0.008
		363	363	363	363			363	363	363	
Correct answers	Correlation sig. (2-tailed) N	0.092	0.188**	0.127*	1	Correct answers	Correlation sig. (2-tailed) N	0.110*	0.029	0.139**	1
		0.080	0.000	0.015	-			0.037	0.583	0.008	-
		363	363	363	363			363	363	363	363

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed), * Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed), * Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)

Table 3. Pearson correlation results of the correct answers given by the teachers to the pre- and post-questionnaires

Pre-questionnaires					Post-questionnaires					
		Province	Gender	Education	Correct answers		Province	Gender	Education	Correct answers
Province	Correlation sig. (2-tailed) N	1	0.440** 0.009 34	^b - 34	0.317 0.068 34	Province	1	0.440** 0.009 34	^b - 34	0.303 0.081 34
Gender	Correlation sig. (2-tailed) N	0.440** 0.009 34	1 - 34	^b - 34	0.334 0.053 34	Gender	0.440** 0.009 34	1 - 34	^b - 34	0.320 0.065 34
Education	Correlation sig. (2-tailed) N	^b - 34	^b - 34	^b - 34	^b - 34	Education	^b - 34	^b - 34	^b - 34	^b - 34
Correct answers	Correlation sig. (2-tailed) N	0.317 0.068 34	0.334 0.053 34	^b - 34	1 - 34	Correct answers	0.303 0.081 34	0.320 0.065 34	^b - 34	1 - 34

**Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). ^bCannot be computed because at least one of the variables is constant

**Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed), ^bCannot be computed because at least one of the variables is constant

Table 4. The prevalence of pediculosis in terms of gender

Combing no	Male			Female			Total			X ²	df
	No	Infested	Prevalence (%)	No	Infested	Prevalence (%)	No	Infested	Prevalence (%)		
1.	203	14	6.89	237	53	22.3	440	67	15.22	20.262	1
2.	202	1	0.49	227	36	15.85	429	37	8.62	32.015	1
3.	204	5	2.45	213	7	3.28	417	12	2.87	0.260	1
4.	187	1	0.53	220	6	2.72	407	7	1.71	2.875	1

Table 5. The prevalence of pediculosis in terms of neighborhood

Combing no	Etekli			Çukur			Eğlence			Total			X ²	df
	No	Infested	Prevalence (%)	No	Infested	Prevalence (%)	No	Infested	Prevalence (%)	No	Infested	Prevalence (%)		
1.	99	6	6.06	141	35	24.82	200	26	13.00	440	67	15.22	17.270	2
2.	98	3	3.06	141	8	5.67	190	26	13.68	429	37	8.62	11.579	2
3.	87	0	0	121	6	4.95	209	6	2.87	417	12	2.87	4.453	2
4.	83	0	0	123	5	4.06	201	2	0.99	407	7	1.71	6.079	2

treatment. Regular head louse controls by teachers and parents who are knowledgeable about pediculosis will lower the number of infested children and the rate of transmission.

*Acknowledgement

The authors would like to thank three school authorities, the local representatives of the Ministry of Education and Health who helped in the realization of this study. We also acknowledge The Scientific and Technological Research Council of Turkey for their financial help in the realization of this project.

*Ethics

Ethics Committee Approval: The study was approved by the Ethical Committee of Çukurova University Medical School (letter dated: 05.07.2019 and numbered: 2019-90).

Informed Consent: Informed consent was obtained.

Peer-review: Internally peer-reviewed.

*Authorship Contributions

Concept: H.K., D.A., H.Ö., Design: H.K., D.A., H.Ö., Data Collection or Processing: H.K., F.B., G.E., S.K., Z.Ç., E.K., D.A.K., D.A., Analysis or Interpretation: H.K. Literature Search: H.K., H.Ö., F.B., Writing: H.K., H.Ö., D.A., F.B.

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

Financial Disclosure: This study was supported by the The Scientific and Technological Research Council of Turkey (project no: 219S203).

REFERENCES

- Özsürekcı Y, Kara A. Infestations with Lices. Klinik Tıp Pediatri Dergisi 2018; 10: 38-43.
- Kurt Ö, Tabak T, Kavur H, Muslu H, Limoncu ME, Bilaç C, et al. Comparison of two combs in the detection of head lice in school children. Türkiye Parazitoloj Derg 2009; 33: 50-3.
- Özbel Y. Vektör Artropodlar ve Mücadelesi. Bitler (Phthiraptera: Pediculidae) Vektörlükleri ve Mücadelesi. (Balcıoğlu İC, Arserim S, eds.). Türkiye Parazitoloj Derneği, İzmir, Turkey, 2017.
- Gratz NG. Human lice: their prevalence, control and resistance to insecticides—a review 1985-1997. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1997.
- Maslow AH. A Theory of Human Motivation. Psychol Rev 1943; 50: 370-96.
- Falagas ME, Matthaïou DK, Rafailidis PI, Panos G, Pappas G. Worldwide Prevalence of Head Lice. Emerg Infect Dis 2008; 14: 1493-4.
- Oh JM, Lee IY, Lee WJ, Seo M, Park SA, Lee SH, et al. Prevalence of pediculosis capitis among Korean children. Parasitol Res 2010; 107: 1415-9.
- Özkan Ö, Hamzaoglu O, Yavuz M. [The Prevalence and Management of Pediculosis Capitis in Turkey: A Systematic Review]. Türkiye Parazitoloj Derg 2015; 39: 135-46.
- Nejati J, Keyhani A, Kareshk AT, Mahmoudvand H, Saghaipour A, Khoramnasab M, et al. Prevalence and risk factors of pediculosis in primary school children in South West of Iran. Iran J Public Health 2018; 47: 1923-9.
- Falagas ME, Matthaïou DK, Rafailidis PI, Panos G, Pappas G. Worldwide prevalence of head lice. Emerg Infect Dis 2008; 14: 1493-4.
- Soonwera M. Efficacy of herbal shampoo base on native plant against head lice (*Pediculus humanus capitis* De Geer, Pediculidae: Phthiraptera) in vitro in vivo in Thailand. Parasitol Res 2014; 113: 3241-50.
- Rukke BA, Soleng A, Lindstedt HH, Ottesen P, Birkemoe T. Socioeconomic status, family background and other key factors influence the management of head lice in Norway. Parasitol Res 2014; 113: 1847-61.
- Altun AS. An Investigation of Teachers', Parents', and Students' Opinions on Elementary Students' Academic Failure. Elementary Education Online 2009; 8: 567-86.
- Balıoğlu İC, Kurt Ö, Limoncu ME, Ermiş VÖ, Tabak T, Oyrur T, et al. Are Regular Controls Conducted in Schools Adequate in Lowering the Incidence of Head Lice (*Pediculus capitis*) Infestation? Kafkas Univ Vet Fak Derg 2012; 18(Suppl A): A151-4.
- Şad SN, Gürbüzürk O. İlköğretim birinci kademe öğrenci velilerinin çocuklarının eğitimine katılım düzeyleri. Kuram ve Uygulamada Eğitim Bilimleri 2013; 13: 993-1011.

16. Tümkeya S. Investigation of the Types of Participation of Parents in School According to Some Variables. *Ç.Ü Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi* 2017; 26: 83-98.
17. Nazlı S. Teacher's Perception of Changing Guidance Services and Their Own Roles. Balıkesir University the Journal of Social Sciences Institute 2008; 11: 11-25.
18. Yıldırım MC, Dönmez B. A Study on the Cooperation Between the School and Parents. *Electronic Journal of Social Sciences* 2008; 7: 98-115.
19. Galassi F, Ortega-Insaurralde I, Adjemian V, Gonzalez-Audino P, Picollo MI, Toloza AC. Head lice were also affected by COVID-19: a decrease on Pediculosis infestation during lockdown in Buenos Aires. *Parasitol Res* 2021; 120: 443-50.

Adjunctive Agent for Treating Scabies: *In vitro* Killing Activity of Permethrin and Tea Tree Oil on *Sarcoptes scabiei* Collected from Patients

Skabiyes Tedavisinde Yardımcı Bir Ajan: Skabiyes Hastalarından Alınan Sarkoptes scabiei Paraziti Üzerinde Permetrin ve Çay Ağacı Yağının İn vitro Öldürme Aktivitesi

Aslan Yürekli

Kuşadası Public Hospital, Clinic of Dermatology, Aydın, Turkey

Cite this article as: Yürekli A. Adjunctive Agent for Treating Scabies: *In vitro* Killing Activity of Permethrin and Tea Tree Oil on *Sarcoptes scabiei* Collected from Patients. Türkiye Parazitoloj Derg 2022;46(4):334-8.

ABSTRACT

Objective: Recently, there has been a serious increase in cases of scabies. The number of patients who do not benefit from the current treatment agents is also quite high. There are publications showing that scabies mites are permethrin-resistant and ivermectin. The treatment with scabicides usually lasts for several hours and usually the treatment is repeated for at least another time, which reduces the patient's compliance with the treatment, especially in pediatric patients where the toxic effects of the products are more pronounced. Therefore there is a need for treatment modalities that are less toxic to humans. To observe the *in vitro* effect of tea tree oil (TTO) on *S. scabiei* and to compare it with those of permethrin.

Methods: Scabies specimens were removed from the patient and examined using a digital microscope. Parasites that were not damaged during sampling, and showed full motion were included in the study. No treatment was applied to the patients before removal of the mites. A total of 40 parasites were included in the study, with 10 parasites in each group. Immersion oil was applied to the control group, 5% permethrin to the first treatment group, while 5% and 25% TTO were used for the second and third study groups.

Results: The mean survival time (ST) of scabies mites in the 5% permethrin group was 350 ± 31.3 min, while this for 5% TTO group 180 ± 15.1 min and 120 ± 13.3 min in the 25% TTO group. The mean ST of the sarcoptes in the control group was 2.820 ± 90 min. The mean ST between the control, permethrin and TTO groups was statistically significant ($p=0.03$). ST between 5% and 25% TTO groups was also statistically significant ($p=0.04$). There were no statistical differences between permethrin and 5% or 25% TTO.

Conclusion: TTO has an acaricidal effect on *S. scabiei*. Although not used as the treatment of choice, it can be used as a supportive agent. Since it shows an acaricidal effect within a short time, it could be used as a shampoo or shower gel to enhance the acaricidal activity of another scabicide.

Keywords: Scabies, tea tree oil, sarcopt

ÖZ

Amaç: Son zamanlarda uyuz olgularında ciddi bir artış görülmektedir. Mevcut tedavi ajanlarından fayda görmeyen hasta sayısı da oldukça fazladır. Çalışmalar, mevcut ajanlara direnç olmadığını ve tedavi etkisizliğinin tedaviye uyumsuzluktan kaynaklandığını ortaya koymaktadır. Tedavi ajanları uygulandıktan sonra en az sekiz saat vücutta kalmalı, herhangi bir şekilde vücuttan uzaklaştırıldıysa tekrar uygulanmalıdır. Elbette ki bu durum, hastanın tedaviye uyumunu azaltmaktadır. Özellikle çocuk hastalarda ilacı bu kadar uzun süre vücutta tutmak daha da zordur. Ana etkeni desteklemek için tedaviye uyumu artıran ve daha kısa süreli uygulama gerektiren tedavi modalitelerine ihtiyaç vardır. Bu çalışma, çay ağacı yağının *S. scabiei* üzerine etkisini *in vitro* gözlemlemek ve akarisit etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla tasarlanmıştır.

Yöntemler: Uyuz hastalarından tanı amaçlı alınan örnekler dijital mikroskop kullanılarak incelendi. Örneklem sırasında zarar görmemiş, parçalanmamış ve tam hareketli parazitler çalışmaya dahil edildi. Hastalara herhangi bir tedavi uygulanmadı. Hastalardan teşhis amaçlı alınan atık örnekler incelendi. Her grupta 10 parazit olmak üzere toplam 40 parazit çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubuna immersiyon yağı; çalışma gruplarına %5 permethrin, %5 ve %25 çay ağacı yağı uygulandı.

Bulgular: Kontrol grubu (immersiyon yağı) dışındaki tüm çalışma solüsyonları *S. scabiei*'yi öldürdü. Ortalama sağkalım süresi (ST) %5 permethrin grubunda $350 \pm 31,3$ dakika idi. Ortalama ST, %5 TTO grubunda $180 \pm 15,1$ dakika, %25 TTO grubunda $120 \pm 13,3$



Received/Geliş Tarihi: 26.10.2021 Accepted/Kabul Tarihi: 28.09.2022

Address for Correspondence/Yazar Adresi: Aslan Yürekli, Kuşadası Public Hospital, Clinic of Dermatology, Aydın, Turkey
Phone/Tel: +90 543 414 66 46 E-mail/E-Posta: aslanyurekli03@hotmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0003-2812-2133

dakika idi. Kontrol grubundaki sarkoptların ortalama ST'si $47 \pm 1,5$ saat idi. Kontrol, permetrin ve TTO grubu arasındaki ortalama ST istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,03$). %5 ve %25 TTO grupları arasındaki ST de istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,04$).

Sonuç: Çay ağacı yağının sarkoptlar üzerinde akarisisidal etkisi vardır. Ana tedavi ajanı olarak kullanılsa da destekleyici ajan olarak kullanılabilir. Akarisisidal etkisini kısa sürede gösterdiği için banyo sırasında şampuan, duş jeli vb. formların kullanılması ana tedavi maddesinin etkisini destekleyecektir.

Anahtar Kelimeler: Skabiyes, çay ağacı yağı, sarkopt

INTRODUCTION

Scabiosis is an ectoparasitosis caused by the *Sarcoptes scabiei* var. *hominis* and can affect everyone regardless of gender, age and race. Transmission from person to person occurs directly through sexual intercourse, communal life, close contact, or indirectly through the personal belongings of patients with scabies. Although the diagnosis can be made easily in most cases with the anamnesis and typical clinical findings, scabiosis may also appear with different clinical manifestations, e.g., scabies-in-the-clean, which can render diagnosis more difficult (1).

The most important step in being successful with the treatment is patient compliance. Sulfur-containing agents should remain on the body for 3 days, and permethrin-containing agents should remain on the body for at least 8 hours (2). Those agents should cover the entire body regions below the neck. In fact, when scalp involvement occurs in infants and children, these agents should also be applied to the scalp (3). The difficulty of treatment emerges at this stage. Patients either do not keep the drug in their body for as long as necessary or the drug is removed e.g., by hand washing. Unless an effective treatment is applied, reinfestations can occur and the disease becomes chronic among family members. Especially in infants and children, compliance with treatment becomes more difficult due to the reluctance of this age group to use topical drugs (4). The foreign body sensation created by the applied agents and the discomfort which creates in babies, can cause irritation and discomfort, especially in the diaper area, and the baby's constant hand in her mouth make the treatment in this age group more toxic. In our clinical practice, it is observed that the infestation tends to be more chronic in families with a baby or child. We think that treatment could last for shorter times and in order to increase its efficacy is supported by additional agents.

"Tea tree oil" (TTO) is an essential oil which is being used in cosmetics and care products worldwide, and has become more popular in the last ten years due to its natural origin (5). TTO is accepted as an ideal disinfectant for topical use, as it has an antimicrobial effect against a wide range of microorganisms, penetrates the skin easily and does not cause irritation. Although the leaves of the tea tree have been used in traditional medicine for at least the 18th Century due to their antiseptic effect, It is thought to have been discovered by humans in the 1700s. The popular name of the plant, "tea tree", was first used for the leaves (possibly a *Leptospermum* species) that sailors took from this region to prepare tea on the return of Captain James Cook from his trip to Australia (1770). Today, plants belonging to *Leptospermum*, *Melaleuca* and *Kunzea* genera from Myrtaceae family are called "tea tree". The plants have no similarities with the real tea plant (*Camelia sinensis*) in terms of taste, smell and composition. The leaves of the plants in question carry an essential oil and all of these oils are known as "TTO" (6,7).

In our study, the scabicial effect of TTO on *S. scabiei* was evaluated and compared to this of permethrin.

METHODS

Materials

Topical permethrin and TTO solution were obtained from the Jeomed Company (Turkey). A total of 40 parasites were included in the study, with 10 parasites in each group. Immersion oil was applied to the control group, while 5% permethrin, 5% and 25% TTO was applied to the three study groups.

Patients

The study was conducted in accordance with Helsinki Declaration principles. Ethical approval was obtained from İstanbul Medipol University (03/02/2022/73). For the trial, the authors used the material which was obtained for the diagnosis of scabiosis. The patients were not treated before the removal of the mites and the experiments were carried out on *Scabies* specimens *in vitro*. More than 300 samples were examined over a period of one year, however only 40 mites were suitable for the present study.

Design

Parasites that were not damaged during sampling and had full motions were included in the study, while immobile, partially mobile, fragmented, or surrounded by artifacts, were excluded from the study (Figure 1).

Specimens were collected with the help of dermoscopy, the location of the parasite was determined and the parasite was gently removed from the tunnel with the help of a 22 G needle (Figure 2). The samples were assessed by a digital



Figure 1. Parasite pattern without artifacts such as skin attachment blood etc.



Figure 2. *Sarcoptes scabiei* parasite on a 22 G needle

microscope allowing magnification of 1600x (Bresser, LCD digital microscope) (Figure 3). A lamel was not used during the microscopic examination to protect the parasite as much as possible from external influences (Figure 4). A digital microscope was used to instantly monitor every movement of the parasite. Movements of parasites were checked every 60 minutes. The survival time (ST) was defined as the interval between the mites' first exposure to the solution to the time the movements ceased. The average ST was compared among different solutions to evaluate their *in vitro* killing activity. The experiments were carried at room temperature.



Figure 3. Bresser, LCD digital microscope

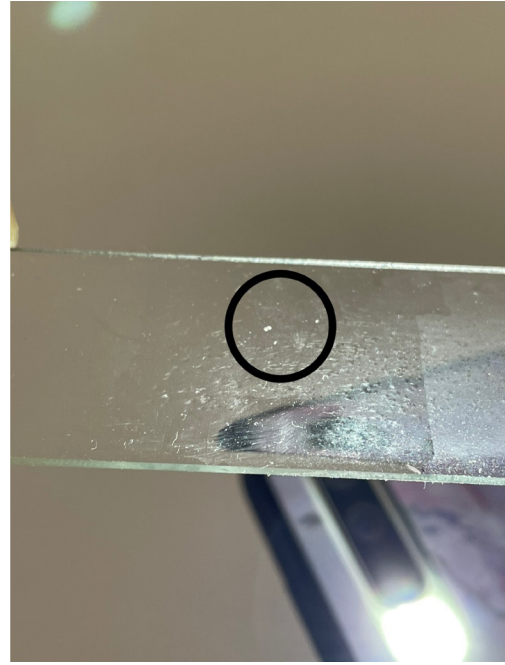


Figure 4. Lamel was not used during microscope examination

***In vitro* environment:** The parasite taken on the slide was examined on the digital microscope screen and it was determined whether it was mobile or not. Then, the working solutions were dripped onto this *in vitro* environment that was created on the slide (Figure 5). The moment of contact of the solution with the parasite could be monitored instantly through the screen of the digital microscope.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using IBM SPSS (statistical package for social sciences) for Windows, Version 22.0 package program. Numerical variables were shown as mean $\pm$ standard



Figure 5. Method of application of the active substance

deviation. The data between groups were evaluated by a two-tailed t-test. P-value <0.05 was considered significant in all comparisons.

RESULTS

The mean ST in the 5% permethrin group was 350±31.3 minutes, while this of 5% TTO group 180±15.1 minutes and 120±13.3 minutes in 25% TTO group. The mean ST of the *Sarcoptes* in the control group was 2.820±90 minutes. The mean ST between the control, permethrin and TTO groups was statistically significant ($p=0.03$). ST between the 5% and 25% TTO groups was statistically significant ($p=0.04$). There is no statistical differences between permethrin and 5% or 25% TTO ($p>0.05$).

DISCUSSION

Recently, there has been an increase in scabies cases both in our country and abroad (1). In our clinical practice, we frequently encounter chronic cases that did not respond to treatment. There are publications showing that Scabies mites are resistant to permethrin and ivermectin (8,9). Topical scabicides include permethrin, phenothrin, sulfur, benzyl benzoate, crotamiton, ivermectin, malathion, while as a systemic agent oral ivermectin is being used. Permethrin, a member of the pyrethroid family, contains pyrethrum components and derivatives. Permethrin 5% cream and lotion form shows scabidicidal and ovicidal effects in the treatment of scabies (3).

Permethrin is recommended as the first treatment option in patients with uncomplicated classical scabies in many guidelines. The body should be dry and cool before topical application. It should be applied from the neck down, including between the fingers and other areas where no clinical signs were observed, and it should be washed after 8-12 hours. Especially in infants and adults with immune deficiency, this agent should be applied to the head area by protecting the eye and mouth area. Although it is recommended as a first-line treatment agent in infants older than three months, pregnant women and lactating women, care should be taken in terms of toxicity in individuals in this group, especially infants between 3-12 months, since less than 2% of the drug can enter the systemic circulation after a single application. Permethrin is the most effective scabidicidal agent in clinical study meta-analyses in the literature. Treatment success rate of 89-98% after a single application reaches 98-100% after repeated application at 1 week interval (This sentence is not clear, please re-write!) (1-3), however lately studies show that scabies mites become resistance to permethrin (8,9).

TTO, which is considered a safe antiseptic due to its natural origin is being used in many pharmaceutical and cosmetic preparations in recent years, as it is effective on a wide range of microorganisms at very low concentrations (10,11). The main purpose of the scabidicidal treatment is the contact of the agent with the parasite in the tunnel. Success for the applied agent can be achieved by being absorbed in the stratum corneum. Therefore, the best time for treatment is when the stratum corneum is at its weakest, e.g., during bathing, when the stratum corneum softens and its permeability increases. While some publications emphasize the need of scrubbing before applying the treatment, there are others which indicate that this is unnecessary. This parasite seems to be very sensitive when removed from its natural environment. In

our study, in which we took more than 300 samples, only 60 live parasites could be isolated and only 40 could be included in the *in vitro* experiments. We observed that they died instantly even when a minor trauma was caused with the needle tip. This was the reason why mites were removed with the help of a needle rather than with the skin scraping method, as we were unable to remove live parasites with the curettage method. The parasite often settles on the wrists and ankles. Since the stratum corneum in this region is thicker than other regions, it is difficult for the active substance to reach under the skin (10). Making a pouch may thin the stratum corneum in this area and facilitate the spreading of the drug under the skin.

In the present study, it was shown that TTO has an acaricidal effect on *S. scabiei*. Although it was observed that the acaricidal effect increases with increasing concentration, it should be considered that it may cause irritation and treatment should be applied to the lowest concentration possible.

The comparative effect of these two agents was also evaluated in patients with rosacea, and both agents were found to be effective (12). In addition, the effectiveness of TTO and permethrin were evaluated in *in vitro* studies and it was found to be effective in the treatment of scabies (13). We wanted to emphasize that the combined use of these two agents, which we demonstrated *in vitro* in our study, will strengthen the treatment. Our *in vitro* study needs to be supported by *in vivo* studies. Side effects to TTO are known in human studies.

Walton et al. (13) who conducted a similar study with TTO stated that this chemical agent has an acaricidal effect, but they did not specify how long it takes to kill the parasite, while in the present study the time of death was observed in real time.

CONCLUSION

Our *in vitro* study also shows that TTO is effective against *Sarcoptes scabiei* parasite. Due to the toxic properties of scabidicidal agents such as permethrin and ivermectin, the use of these agents in infants and children requires attention. Having formulations such as shampoo and shower gel might provide the opportunity to use TTO during the bath, where the stratum corneum is more permeable.

*Ethics

Ethics Committee Approval: The study was conducted in accordance with Helsinki Declaration principles. Ethical approval was obtained from İstanbul Medipol University (03/02/2022/73).

Informed Consent: Since the study was carried out on the waste sample, no approval could be obtained.

Peer-review: Internally peer-reviewed.

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

REFERENCES

1. Sunderkötter C, Aebischer A, Neufeld M, Löser C, Kreuter A, Bialek R, et al. Increase of scabies in Germany and development of resistant mites? Evidence and consequences. *J Dtsch Dermatol Ges* 2019 ;17: 15-23.
2. Gunning K, Kiraly B, Pippitt K. Lice and Scabies: Treatment Update. *Am Fam Physician* 2019; 99: 635-42.
3. Salavastru CM, Chosidow O, Boffa MJ, Janier M, Tiplica GS. European guideline for the management of scabies. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2017; 31: 1248-53.

4. Sunderkötter C, Feldmeier H, Fölster-Holst R, Geisel B, Klink-Rehbein S, Nast A, et al. S1 guidelines on the diagnosis and treatment of scabies - short version. *J Dtsch Dermatol Ges* 2016; 14: 1155-67.
5. Lassa S, Campbell MJ, Bennett CE. Epidemiology of scabies prevalence in the U.K. from general practice records. *Br J Dermatol* 2011; 164: 1329-34.
6. Pearce AL, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Reduction of nickel-induced contact hypersensitivity reactions by topical tea tree oil in humans. *Inflamm Res* 2005; 54: 22-30.
7. Syed TA, Qureshi ZA, Ali SM, Ahmad S, Ahmad SA. Treatment of Toenail Onychomycosis with 2%Butenafine and 5%Melaleuca alternifolia (tea tree) Oil in Cream. *Trop Med Int Health* 1999; 4: 284-7.
8. Currie BJ, Harumal P, McKinnon M, Walton SF. First documentation of in vivo and in vitro ivermectin resistance in *Sarcoptes scabiei*. *Clin Infect Dis* 2004; 39: e8-12.
9. Walton SF, Myerscough MR, Currie BJ. Studies in vitro on the relative efficacy of current acaricides for *Sarcoptes scabiei* var. *hominis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94: 92-6.
10. Sunderkötter C, Wohlrab J, Hamm H. Scabies: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Dtsch Arztebl Int* 2021; 118: 695-704.
11. Richards RN. Scabies: Diagnostic and Therapeutic Update. *J Cutan Med Surg* 2021; 25: 95-101.
12. Yurekli A, Botsali A. The comparative in vitro killing activity of tea tree oil versus permethrin on *Demodex folliculorum* of rosacea patients. *J Cosmet Dermatol* 2022; 21: 2268-72.
13. Walton SF, McKinnon M, Pizzutto S, Dougall A, Williams E, Currie BJ. Acaricidal activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: in vitro sensitivity of *sarcoptes scabiei* var *hominis* to terpinen-4-ol. *Arch Dermatol* 2004; 140: 563-6.

Kurban Bayramı'nda Endemik Olmayan Bir İlde Saptanan İki Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Olgusu

Two Cases of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Detected in a Non-endemic Feast of Sacrifice

Ali Gümüş, Merve Sefa Sayar, Ali Asan

Bursa Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği, Bursa, Türkiye

Cite this article as: Gümüş A, Sefa Sayar M, Asan A. Two Cases of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Detected in a Non-endemic Feast of Sacrifice. Türkiye Parazitoloj Derg 2022;46(4):339-41.

ÖZ

Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA); kenelerle bulaşan ve ateş, kanama, myalji, halsizlik ve benzeri non-spesifik semptomlarla seyreden, akut ve ciddi seyirli olabilen viral zoonotik bir enfeksiyon hastalığıdır. Burada, endemik olmayan bir ilde Koronavirüs hastalığı-2019 (COVID-19) pandemisi devam ederken görülen iki adet KKKA olgusu tartışılmıştır. Olguların ortak özelliği, Kurban Bayramı sırasında endemik bölgedeki hayvanlarla temas etmiş olmaları, non-spesifik semptomları olması; karaciğer fonksiyon testleri, laktat dehidrogenaz ve kreatin fosfokinaz yüksekliği, lökopeni ve trombositopeni şeklinde karşımıza çıkmıştır. COVID-19 pandemisi sırasında non-spesifik semptomları olan hastaların kene ve hayvancılık teması özellikle sorgulanmalıdır.

Anahtar Kelimeler: COVID-19, hemorajik ateş virüsü, Kırım-Kongo

ABSTRACT

Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) is a viral zoonotic infectious disease transmitted by ticks, accompanied by fever, bleeding, myalgia, weakness and similar non-specific symptoms, and can have an acute and serious course. In this article, two CCHF cases seen during the Coronavirus disease-2019 (COVID-19) pandemic in a non-endemic province are described. The common feature of both cases; contact with animals in the endemic region during the feast of sacrifice, non-specific symptoms, liver function test, lactate dehydrogenase and creatine phosphokinase elevation, leukopenia and thrombocytopenia. Especially during the COVID-19 pandemic, tick and livestock contact of patients with non-specific symptoms should be questioned.

Keywords: COVID-19, hemorrhagic fever virus, Crimean-Congo

GİRİŞ

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) erişkin *Hyalomma* cinsi keneler tarafından ısırılma ile insanlara bulaşmaktadır (1). Enfekte konakların kan veya vücut sıvılarıyla da bulaş olabilmektedir. Etkeni; Bunyaviridae ailesinden Nairovirüs cinsine ait tek iplikçikli, lipid zarflı bir RNA virüsüdür. Hastalık için sığır, koyun, keçi ve yabani hayvanlar rezervuar, keneler hem rezervuar hem de vektör konumundadır. KKKA hastalığında veteriner hekimler, mezbaha çalışanları, hayvancılıkla uğraşanlar ve hayvan kesimi yapan işçiler risk grubunda yer almaktadır (2). İki olgunun takdim edildiği bu yazımız; hayvan ticareti amacıyla endemik bölgeye seyahat eden ve hayvan kesimine katılan iki erkek hastanın yazılı onamları alınarak sunulmuştur.

OLGU SUNUMU

Olgu 1 (E. Ş.)

Yirmi beş yaşında erkek hasta, Kurban Bayramı nedeni ile Ardahan'a seyahatinden döndükten dört gün sonra gelişen ateş, halsizlik, bulantı, kusma şikayetleri ile acil servise başvurdu. Bilinen bir ek hastalığı olmayan olgunun, yapılan tetkiklerde lökopeni, trombositopeni ve karaciğer enzimlerinde yükselme izlenmesi üzerine acil serviste dahiliye ve enfeksiyon hastalıkları uzmanları tarafından değerlendirildi. Fizik muayenesinde genel durumu iyi, bilinci açık, kooperasyon ve oryantasyon tamdı. Hastanın ateşi 38,7 °C, kan basıncı 100/60 mmHg ve nabız 90/dakika olarak tespit edildi. Sistem muayenesinde sağ ön kolda hiperemi, ekimoz ve ödem, her iki kol ve



Geliş Tarihi/Received: 05.11.2021 Kabul Tarihi/Accepted: 26.09.2022

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Ali Gümüş, Bursa Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği, Bursa, Türkiye

Tel/Phone: +90 555 638 35 77 **E-Posta/E-mail:** draligumus@yahoo.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0002-1131-4780

bacakta peteşileri bulunuyordu (Şekil 1, 2). Hasta hemolitik anemi ve idiopatik trombositopenik purpura ön tanılarıyla dahiliye servisine yatırıldı. Laboratuvar bulgularında lökosit sayısı 1,560/mm³, trombosit 19.000/mm³, hematokrit %42,8 ve hemoglobin 14,1 gr/dL, açlık kan şekeri 111 mg/dL, alanin aminotransferaz (ALT) 460 U/Lt, aspartat aminotransferaz (AST) 1303 U/Lt, üre 11 mg/dL, kreatinin 0,81 gr/dL, INR 1,03, protrombin zamanı (PT) 12,6 saniye, aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) 41,7 saniye, laktat dehidrogenaz (LDH) 2,564 U/Lt, kreatin fosfokinaz (CPK) 2109 U/Lt, hepatit markerları negatif bulundu. Hematoloji birimi tarafından periferik yayma ile değerlendirildi ve enfeksiyon ile uyumlu saptandı. Mevcut tabloyu açıklayacak enfeksiyöz sebepler açısından tetkik edilen hastanın Koronavirüs hastalığı-2019 (COVID-19) real time-polimeraz zincir reaksiyonu



Şekil 1. Olgu 1 sağ ön kol böcek ısırık yeri



Şekil 2. Olgu 1 sağ ön kol hematoma görünümü

(RT-PCR) testi, *Brucella* standart tüp aglütinasyon testi ve TORCH grubu enfeksiyonları serolojisi negatifti. Hasta servis takibinde genel durumda bozulma ve trombosit değerlerinde düşme nedeniyle yakın takip amaçlı yoğun bakım ünitesine alındı. Hastanın Ardahan seyahatinde hayvan kesimine katıldığını belirtmesi üzerine; viral kanamalı ateş açısından tetkik edildi. KKKA RT-PCR testi pozitif tespit edildi. Hastaya destek tedavileri ve ribavirin 30 mg/kg yükleme dozunun ardından 15 mg/kg 6 saatte bir/dört gün ve 7,5 mg/kg 8 saatte bir/altı gün alacak şekilde tedavisi düzenlendi. Ribavirin tedavisi 10 güne tamamlandı. Karaciğer fonksiyon testlerinde düzelme görülen ve pansitopenisi düzelen hasta şifa ile taburcu edildi.

Olgu 2 (V. T.)

Otuz bir yaş erkek hasta, COVID-19 polikliniğine iki gündür olan baş ağrısı, miyalji, boğaz kuruluğu, çarpıntı, bulantı şikayetleri ile başvurdu. Öyküsünde kronik bir hastalığı olmayan hastanın COVID-19 polikliniğinde yapılan fizik muayenesinde genel durumu iyi, oryante ve koopere idi, ateşi 36,6 °C, kan basıncı 110/60 mmHg ve nabız 90/dakika olarak tespit edildi. Genel sistem muayenesi doğaldı. Sağ ayak bileğinde yaklaşık 1 cm'lik kızarıklık saptandı. Hastanın laboratuvar parametreleri lökosit sayısı 4,220/mm³, trombosit 127.000/mm³, hematokrit %38,8 ve hemoglobin 13,1 gr/dL, açlık kan şekeri 107 mg/dL, ALT 25 U/Lt, AST 73 U/Lt, üre 23 mg/dL, kreatinin 1,11 gr/dL, LDH 239 U/Lt, CPK 2,878 U/Lt, saptandı. Hastanın COVID-19 semptomları olduğu için COVID-19 RT-PCR testi yapıldı, negatif saptandı ve ev izolasyonu önerilerek taburcu edildi. Hasta aynı gün ikinci defa COVID-19 polikliniğine başvurdu. Şikayetlerinin artarak devam ettiğini belirtmesi üzerine öyküsü derinleştirildi. Bir hafta önce, Erzurum'dan gelen büyük baş hayvanın kesimi sonrası duşta iken bacağında kene olduğunu fark ettiğini ve çıplak elle keneyi çıkarttığını ve ezdiğini belirtti. Hastadan ikinci defa COVID-19 RT-PCR alındı ve negatif saptandı. Laboratuvar bulguları lökosit sayısı 2,520/mm³, trombosit 89.000/mm³, hematokrit %40,4 ve hemoglobin 13,5 gr/dL, açlık kan şekeri 143 mg/dL, ALT 41 U/Lt, AST 100 U/Lt, üre 11 mg/dL, kreatinin 1,05 gr/dL, INR 0,95, PT 11,6 saniye, aPTT 25,9 saniye, LDH 300 U/Lt, CPK 2249 U/Lt bulundu. Kene teması olan hastanın KKKA RT-PCR testi pozitif sonuçlandı. Ribavirin ve destek tedavisi başlandı. Takiplerinde kanama veya bilinç değişikliği olmayan ayrıca, kan transfüzyonu ihtiyacı gelişmeyen hastanın klinik ve laboratuvar bulguları düzeldi. Ribavirin tedavisini tamamlayan hasta, tedavinin 11. gününde şifa ile taburcu edildi. Her iki hastanın laboratuvar sonuçları Tablo 1'de verilmiştir.

TARTIŞMA

KKKA mortalite oranları azımsanmayacak ölçüde yüksek olup endemik ülkeler için %4-20 arasında değişmektedir (3). 2002 yılından önce Türkiye'de KKKA hastalığı görülmezken; Avrupa, Asya ve Kuzey Afrika'yı içine alan palearktik bölgede üreyen birçok göçmen kuşun birincil göç yolu üzerinde bulunması, hastalığın kuşlar aracılığı ile gelmiş olabileceğini düşündürmektedir (4). KKKA hastalığının yayılmasında göçmen kuşların rolü ile ilgili çalışmalar mevcuttur (5). Ülkemiz gibi KKKA hastalığının endemik olduğu ülkelerde virüsün yayılımında göçmen kuşların dışında; olgu görülen şehirler ile görülmeyen şehirler arasındaki turizm faaliyetleri ve hayvan ticaretinin de hastalığın şehir merkezlerinde görülmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

Tablo 1. Hastaların laboratuvar değerleri ve tedavi durumları

	Olgu 1	Olgu 2
WBC (mm ³ /L)	1,56	2,52
Trombosit (mm ³ /L)	19.000	89.000
Hemoglobin (gr/dL)	14,1	13,5
AST (U/L)	1,303	100
ALT (U/L)	460	41
PT (s)	12,6	11,6
aPTT (s)	41,7	25,9
LDH (U/L)	2,564	300
CPK (mg/L)	2,109	2,249
CRP (mg/L)	-	17,8
KKKA IgM	Çalışılmadı	Çalışılmadı
KKKA IgG	Çalışılmadı	Çalışılmadı
KKKA PCR	+	+
Destek tedavisi (kan ve kan ürünleri)	Var	Yok
Ribavirin	Var	Yok

WBC: Beyaz küre, AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, PT: Protrombin zamanı, aPTT: Aktive parsiyel tromboplastin zamanı, LDH: Laktat dehidrogenaz, CPK: Kreatin fosfokinaz, CRP: C-reaktif protein, KKKA: Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi, IgM: İmmünoglobulin M, IgG: İmmünoglobulin G, PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

Bursa ilinde KKKA virüsü endemik olmayıp, iki olgunun da Kurban Bayramı sebebiyle endemik bölgeden gelen hayvanların üzerindeki keneler ile ve direkt enfekte hayvanın kan/dokusu ile temas sonrası enfekte oldukları tahmin edilmektedir.

Türkiye’de KKKA hastalığı Mart ve Ekim ayları arasında görülüp, Haziran ve Temmuz aylarında pik yapmaktadır (6). İki olgunun da görüldüğü dönem dikkatle incelendiğinde Temmuz ayında olması ve Kurban Bayramı nedeni ile hayvan ticareti yapılmış olması dikkat çekmektedir. Bu nedenle, hastalığın daha sık görüldüğü aylarda endemik bölgeden satış ve kesim için endemik olmayan bölgelere göç ettirilen hayvanlara dikkat edilmesi gerekmektedir. Göç ettirilen hayvanların vücutlarında bulunan keneler aracılığı ile endemik olmayan bölgelerde nadiren de olsa KKKA olgularına rastlanabilmektedir.

COVID-19 pandemisinin olduğu bu dönemde hem anamnez ve hem de fizik muayenedeki zorluklar sebebiyle de COVID-19 dışı tanılarda aksamalar olabilmektedir. COVID-19 olgularında sistemik tutulumla seyreden sitokin fırtınası tablosu görülmektedir (7). Benzer tablo, şiddetli KKKA hastalığında, endotelial hücre aktivasyonunun ve artan vasküler geçirgenliğin neden olduğu hipotansiyon, şok, çoklu organ yetmezliği ve ölümle sonuçlanan durumlarda da olmaktadır (8). Nitekim, ikinci olgumuzda olduğu gibi, pandemi döneminde COVID-19 semptomları ile benzer semptomlar olan KKKA olgusunda tanı iki gün sonra konulabildiği görüldü. Birinci olgumuzda anamnez

ve ön kol antekubital bölgedeki kene ısırığı sonucu oluşan ekimoz tanıda en büyük yardımcımızdı.

Sonuç olarak; endemik bölgeden satış ve kesim amacıyla götürülen hayvanların endemik olmayan bölgede de KKKA olgularının görülmesine sebep olabileceği akılda tutulmalıdır. COVID-19 salgınının halen devam ettiği bu dönemde özellikle yaz aylarında ve kitlesel şekilde hayvan göçlerinin olduğu kurban bayramları sırasında hastaneye başvuran hastaların ateş, miyalji, halsizlik, yorgunluk gibi semptomlarında mutlaka hayvancılık, kene teması, endemik bölgeye seyahat ya da hayvanın vücut sıvılarıyla teması sorgulanmalı ve KKKA mutlaka akla gelmelidir.

*Etik

Hasta Onayı: İki olgunun takdim edildiği bu yazımız; hayvan ticareti amacıyla endemik bölgeye seyahat eden ve hayvan kesimine katılan iki erkek hastanın yazılı onamları alınarak sunulmuştur.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

*Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: A.G., M.S.S., Konsept: A.G., M.S.S., Dizayn: A.G., M.S.S., Veri Toplama veya İşleme: A.G., M.S.S., Analiz veya Yorumlama: A.G., M.S.S., A.A., Literatür Arama: A.G., M.S.S., A.A., Yazan: A.G., M.S.S.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

KAYNAKLAR

1. John E. Bennett, Raphael Dolin, Martin J. Blaser MD, Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 2-Volume Set 9th Edition, 2019.
2. Shayan S, Bokaeian M, Shahriyar MR, Chinikar S. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. Laboratory Medicine 2015; 46: 180-9.
3. Leblebicioglu H, Ozaras R, Sunbul M. Crimean-Congo hemorrhagic fever: A neglected infectious disease with potential nosocomial infection threat. AJIC 2017; 45: 815-6.
4. Leblebicioglu H, Eroglu C, Erciyas-Yavuz K, Hokelek M, Acici M, Yilmaz H. Role of migratory birds in spreading Crimean-Congo hemorrhagic fever, Turkey. Emerg Infect Dis 2014; 20: 1331-4.
5. Mancini F, Toma L, Ciervo A, Di Luca M, Faggioni G, Lista F, et al. Virus investigation in ticks from migratory birds in Italy. New Microbiol 2013; 36: 433-4.
6. Yilmaz GR, Buzgan T, Irmak H, Safran A, Uzun R, Cevik MA, et al. The epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey, 2002-2007. Int J Infect Dis 2009; 13: 380-6.
7. Sunkara H, Dewan SMR. Coronavirus disease-2019: A review on the disease exacerbation via cytokine storm and concurrent management. International immunopharmacology 2021; 99: 108049.
8. Bodur H, Akinci E, Ongürü P, Uyar Y, Baştürk B, Gözel MG, et al. Evidence of vascular endothelial damage in Crimean-Congo hemorrhagic fever. Int J Infect Dis 2010; 14: e704-7.

Toksoplazmozise Karşı Geliştirilen Biyoteknolojik Tabanlı Rekombinant Protein Aşıları

Biotechnological Based Recombinant Protein Vaccines Developed Against Toxoplasmosis

● Tuğba Karakavuk^{1,2}, ● Ceren Gül^{1,2}, ● Muhammet Karakavuk^{1,3}, ● Aytül Gül^{1,4}, ● Sedef Erkunt Alak¹, ● Hüseyin Can^{1,5}, ● Cemal Ün^{1,5}, ● Mert Döşkaya^{1,6}, ● Adnan Yüksel Gürüz^{1,6}, ● Aysu Değirmenci Döşkaya^{1,6}

¹Ege Üniversitesi, Aşı Geliştirme, Uygulama ve Araştırma Merkezi, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

³Ege Üniversitesi, Ödemiş Meslek Yüksek Okulu, Laborant ve Veteriner Sağlık Programı, İzmir, Türkiye

⁴Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir, Türkiye

⁵Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

⁶Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Cite this article as: Karakavuk T, Gül C, Karakavuk M, Gül A, Erkunt Alak S, Can H, Ün C, Döşkaya M, Gürüz AY, Değirmenci Döşkaya A. Biotechnological Based Recombinant Protein Vaccines Developed Against Toxoplasmosis. Türkiye Parazitoloj Derg 2022;46(4):342-57.

ÖZ

Toxoplasma gondii (*T. gondii*); sıcakkanlı hayvanların çoğunu ve insanları enfekte edebilen, geniş konakçı yelpazesine sahip zorunlu hücre içi apikompleksan bir parazittir. Bu parazit ile dünya nüfusunun yaklaşık üçte biri enfektedir. Toksoplazmozis, immün sistemi sağlam bireylerde asemptomatik seyrederken, immün sistemi baskılanmış bireylerde ise ciddi klinik tablolara ve ölümlere yol açabilmektedir. Parazit, insanlara kedi dışkıyla kontamine su ve gıdaların tüketiminin yanı sıra çiğ veya az pişmiş hayvansal ürünlerle, konjenital enfeksiyon ve kan/organ nakliyle bulaşmaktadır. *T. gondii*, koyun, keçi gibi çiftlik hayvanlarında da sıklıkla saptanmaktadır. Koyun ve keçilerde parazit nedeniyle oluşan klinik tablolar ve abortuslar dünya çapında büyük ekonomik kayıplar oluşturmaktadır. Günümüzde, *T. gondii*'ye karşı sadece koyunlarda kullanılabilen Toxovax (MSD, Yeni Zelanda) ticari aşısı bulunmaktadır. Bu nedenle zararsız, kolay üretilen, parazitin neden olduğu kayıpların önüne geçilebilecek ve tüm canlılarda kullanılabilecek yenilikçi *T. gondii* aşısına ihtiyaç duyulmaktadır. İmmünoloji, moleküler biyoloji, genetik, biyoteknoloji ve proteomik alanlarındaki gelişmeler aşı çalışmalarına yeni bakış açıları kazandırmaktadır. *T. gondii*'ye karşı geliştirilen aşı çalışmaları, yeni antijenlerin *in vitro* taramalar ve biyoinformatik analizler kullanılarak keşfi, çeşitli ekspresyon sistemleri ve yeni adjuvant tiplerinin kullanımı ile hız kazanmıştır. Rekombinant protein aşıları biyoteknolojik aşılar olup çeşitli ekspresyon sistemlerinde hızlı ve kolay üretilmeleri, çok miktarda ve yüksek saflıkta ürün elde edilebilirliği, manipülasyon kolaylığı ve hem hücresel hem de humoral immün yanıtı uyatabilmeleri nedeniyle toksoplazmozise yönelik aşı çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Biyoteknolojik yöntemler kullanılarak geliştirilmekte olan bu aşılar toksoplazmozise karşı koruyucu immün yanıt sağlamak için umut vaat etmektedir. Bu derlemede, parazitin karmaşık yaşam döngüsü, patogenezi ve konakta oluşturduğu humoral ve hücrel immün yanıtın yanında özellikle, parazite yönelik gerçekleştirilen rekombinant protein aşı çalışmaları hakkında genel bir bakış sunulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Toxoplasma gondii*, rekombinant protein aşıları, biyoteknoloji, immünizasyon

ABSTRACT

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) that can infect most warm-blooded animals and humans, is an obligate intracellular apicomplexan parasite with a wide host range. About one-third of the world's population is infected with this parasite. While toxoplasmosis progresses asymptotically in individuals with a strong immune system, it can cause serious clinical manifestations and death in immunocompromised individuals. The parasite is transmitted to humans through the consumption of water and food contaminated with cat feces, as well as raw or undercooked animal products, congenital infection and blood/organ transplantation. Additionally, *T. gondii* is often observed in farm animals such as sheep and goats. Clinical manifestations and abortions caused by *T. gondii* in sheep and goats lead to enormous economic loss worldwide. There is a commercial vaccine against *T. gondii*, called Toxovax (MSD, New Zealand) that can only be used in sheep. For these reasons, there is a need for innovative *T. gondii* vaccine that is harmless, easily produced, which can prevent losses and be used in all living things. Advances in immunology, molecular biology, genetic,



Geliş Tarihi/Received: 07.12.2021 Kabul Tarihi/Accepted: 01.06.2022

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Aysu Değirmenci Döşkaya, Ege Üniversitesi, Aşı Geliştirme, Uygulama ve Araştırma Merkezi; Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Tel/Phone: +90 535 435 63 68 **E-Posta/E-mail:** aysu.degirmenci.doskaya@ege.edu.tr **ORCID ID:** orcid.org/0000-0003-0363-9099

biotechnology and proteomics bring new perspectives to vaccine studies. Studies in innovative vaccine studies against *T. gondii* have accelerated with the discovery of new antigens by *in vitro* screenings, and bioinformatic analyzes, the use of various expression systems and new adjuvant types. Recombinant protein vaccines are biotechnological vaccines that are frequently preferred due to their rapid and easy production in various expression systems, availability of very and high purity products, ease of manipulation and stimulation of both cellular and humoral immune responses. Recombinant protein vaccines, developed by biotechnological methods, are promising tools for providing a protective immune response against toxoplasmosis. In this review, an overview of the parasite complex life cycle, its pathogenesis, humoral and cellular immune responses in the host, and recombinant protein vaccine studies developed against the parasite are presented.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, recombinant protein vaccines, biotechnology, immunization

GİRİŞ

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) toksoplazmozise neden olan, insanları ve hayvanları enfekte edebilen geniş konakçı yelpazesine sahip zorunlu hücre içi bir parazittir. Yaşam döngüsü içinde yer alan kesin konak kedi ve kedigillerde eşeyli üreme ile oluşan sporozoit, ara konaklarında eşeysiz üreme sonucu oluşan takizoit ve bradizoit olmak üzere üç formu bulunmaktadır (1). Takizoitler, hareket yeteneği yüksek aktif formlardır ve akut enfeksiyona neden olmaktadır. Yapılarında bulunan proteinler sayesinde konak hücreye girerek parazitofor vakuol (PV) oluşturmada ve konağın immün sisteminden de bu strateji ile korunabilmektedir (2). İmmün sistem baskısından dolayı PV içinde daha yavaş bölünen formlar olan bradizoitler ise kronik enfeksiyonda görülmektedir. Konak canlıda hiçbir belirti göstermeden aylarca hatta yıllarca yaşamını devam ettirebilmektedir (3).

Kedi ve kedigillerde eşeyli üreme sonucunda ookistler oluşur ve uygun koşullarda sporlanarak sporozoit form haline gelirler (4). Takizoitler enfeksiyondan sonra daha yavaş bölünebilen bradizoitlere farklılaşırlar (5). Enfeksiyon immün sistemi sağlam bireylerde asemptomatiktir. İmmün sistemi baskılanmış bireylerde ise ciddi komplikasyonlar görülebilmektedir (6). Bunların yanında toksoplazmozisin nöropsikiyatrik hastalıklar, depresyon ve intihar ile ilişkisi gösterilmiştir (7).

Parazit insanları etkilediği gibi koyun, keçi, domuz gibi çiftlik hayvanlarında da ciddi sorunlar oluşturmaktadır (8). Günümüzde yalnızca koyunlarda kullanımı olan bir aşı (Toxovax®, MSD hayvan sağlığı) mevcut olsa da oluşturduğu riskler nedeniyle insanlarda kullanılamamaktadır. Bu nedenle, insanlarda ve hayvanlarda hastalığın yayılımının önlenmesi ve hastalığın yarattığı klinik tabloların engellenebilmesi için güvenilir ve etkili bir aşıya ihtiyaç duyulmaktadır (9).

Rekombinant protein aşılarında patojene ait herhangi bir materyalin direkt kullanılmaması ve buna bağlı olarak enfektif formlara dönüşme riskinin bulunmaması, bu aşıları güvenli hale getirmektedir (10). Bunun yanında üretim prosesinde manipülasyon kolaylığı ve geleneksel aşılarla oranla düşük maliyetli üretilmeleri gibi avantajları da mevcuttur (11).

Bugüne dek yapılan aşı çalışmalarında, parazite ait uygun antijenik bölgelerin ve ekspresyon sistemlerinin seçilmemesi, aşı adaylarının düşük immün yanıt oluşturmaları gibi nedenlerden dolayı hastalığa karşı henüz klinik aşamada bir rekombinant protein aşısı bulunmamaktadır. Ancak gelişen teknolojinin yardımı ile yenilikçi yaklaşımlar, yeni antijen keşifleri, kombine üretim stratejilerinin kullanımı ve parazitin yaşam formlarında görülen stratejik proteinlerin seçimi, etkin rekombinant protein aşılarının geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda adjuvantlar ile birleştirilen aşı adaylarının güçlü immün yanıt oluşturmaları ve fare deneylerindeki hayatta kalma oranlarında görülen artışlar, yapılan rekombinant protein

aşılarının gelecekte toksoplazmozise karşı etkili ve güvenli olacağına dair olumlu bir bakış açısı sunmaktadır.

Toxoplasma gondii Genel Bilgi

Toxoplasma gondii ilk kez 1908 yılında tanımlanmıştır. Nicole ve Manceaux, *Leishmania* ve virüs çalışmaları sırasında kullandıkları *Ctenodactylus gundi* adlı kemirgende gerçekleştirdikleri deneyler sırasında paraziti ilk defa tespit etmişlerdir (12,13).

1950 yılında Türkiye’de ilk kez bir köpekten *T. gondii* izolasyonu Baran ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. İlk insan olgusu 1953 yılında Unat ve ark. tarafından bildirilmiştir. 1970’li yıllarda Türkiye’de parazit bir köpekten izole edilmiş ve daha sonra bir bebekte parazite rastlanmıştır. 1972 yılında Ekmen ve Altıntaş tarafından tespit edilen bu suş *T. gondii* Ankara suşu olarak adlandırılmıştır (14,15). 2020 yılında yapılan güncel çalışmada suşa ait tüm genom çalışılmış ve NCBI veritabanına *T. gondii* TR_01 ismi ile yüklenmiştir (16).

Morfoloji ve Yaşam Döngüsü

Toxoplasma gondii’nin yaşam döngüsü incelendiğinde akut enfeksiyona sebep olan takizoit, kronik enfeksiyona sebep olan bradizoit (doku kisti) ve sporlanmış ookistler içerisinde bulunan ve sporozoit adı verilen üç farklı formu bulunmaktadır (1).

Tüm çekirdekli hücreleri enfekte edebilen takizoitler hızlı bölünebilen ve hareket edebilen aktif bir formdur (6). Takizoitler hilal şeklinde olup 2x6 µm boyuta sahiptir. Takizoitlerin yapısında patogeneze başlıca rol oynayan konoid ile mikronem (MIC), roptri (ROP) ve yoğun granüller (GRA) proteinleri bulunmaktadır (3,17). Bu proteinler sayesinde konak hücreye girer ve kendilerini PV ile çevreleyerek ovalleştirir. Hücre içinde tekrarlayan endodiyogeni ile aseksüel çoğalma nedeniyle konak immün sisteminden korunabilmektedir (2).

Takizoitler enfeksiyondan yaklaşık 10-14 gün sonra daha yavaş bölünebilen bradizoitlere farklılaşmaktadır (3). Bu form konak dokularında, içinde yüzlerce bradizoit bulunan kistler oluşturarak uzun yıllar canlı kalabilmektedir (5). Kronik enfeksiyondan sorumlu olan doku kistlerinin etrafında konak hücreler bulunması nedeniyle immün sistem elemanlarından kaçabilmektedir. Bozulmamış doku kistleri hastalıkla ilişkili olmamakla birlikte konağın yaşamı boyunca enflamatuvar yanıtı neden olmadan varlığını sürdürebilmektedir. Fakat immün yetmezliği olan kişilerde doku kistlerinin yırtılması ile bradizoitler, tekrar takizoitlere dönüşerek hastalığın reaktivasyonuna neden olmaktadır (2,5).

Kesin konak olan kedi ve kedigillerin ince bağırsaklarında eşeyli üreme sonucunda oluşan ookistler dışkılama ile ortama bırakıldığında enfektif değildirler. Havalandırma ve sıcaklığa bağlı sporlanarak enfektif hale gelmekte ve birkaç ay boyunca çevrede canlı kalabilmektedir (4). Sporlanan ookistler içerisinde iki adet sporokist ve her sporokistte dört adet sporozoit olmak

üzere toplam sekiz adet sporozoit bulunmaktadır. Sporozoitler subterminal bir çekirdeğe sahiptir ve bol miktarda MIC, ROP ve amilopektin granülü bulundurmasıyla takizoite benzerlik göstermektedir (3).

Şekil 1'de görüldüğü gibi *T. gondii* iki yaşam döngüsüne sahiptir. Eşeyli döngü kedigillerin ince bağırsağında meydana gelirken, eşeysiz döngü insanların da dahil olduğu ara konaklarda ve kesin konak olan kedigillerde gerçekleşmektedir (6). Son konak kediler parazitin üç formundan herhangi biri ile enfekte olabilmekte ve ookistleri dışkı yolu ile çevreye yaymaktadır (18). İnsanlar ise doku kisti ile enfekte çiğ veya az pişmiş etlerin tüketimiyle, kedi dışkısı ile temasla ya da kedi dışkısında bulunan ookistlerin kontamine ettiği su ve sebzelerin tüketimi ve bunların yanı sıra organ nakli, kan transfüzyonu ve konjenital geçiş yoluyla enfekte olabilmektedir (17).

Toksoplazmozis

Toksoplazmozis, immün sistemi sağlam olan bireylerde asemptomatik seyredirken bazı hastalarda servikal lenfadenopati, miyalji ve hafif grip benzeri semptomlara neden olabilmektedir (1). İmmün sistem yetmezliği olan bireylerde ise hastalığın daha ciddi semptomlarla seyrettiği bildirilmektedir. Ayrıca parazit, oküler ve konjenital toksoplazmozise neden olmaktadır (6). Gebelikte enfeksiyon ölü doğumlara ve abortlara, bebeklerde ise zeka geriliği, körlük, hidrosefali veya diğer doğumsal anomalilere neden olabilmektedir (19). Ayrıca, konjenital enfeksiyona rağmen normal doğan bebeklerde 30'lu yaşlarda toksoplazmik retinokoroidit oluşabilmektedir (20). Organ nakli alıcıları ve kanser hastaları gibi immün sistemi baskılanmış hastalarda birincil enfeksiyon veya tekrar aktivasyon ile ensefalit veya pnömoni gibi komplikasyonlara neden olabilmektedir (4,6). Bu ciddi klinik tabloların yanı sıra toksoplazmozis Alzheimer, bipolar bozukluk, şizofreni, obsesif kompulsif bozukluk, multipl skleroz ve epilepsi gibi nöropsikiyatrik hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Buna ek olarak, yapılan deneysel çalışmalarda toksoplazmozisin depresyon ve intihara neden olabileceği gösterilmektedir (7).

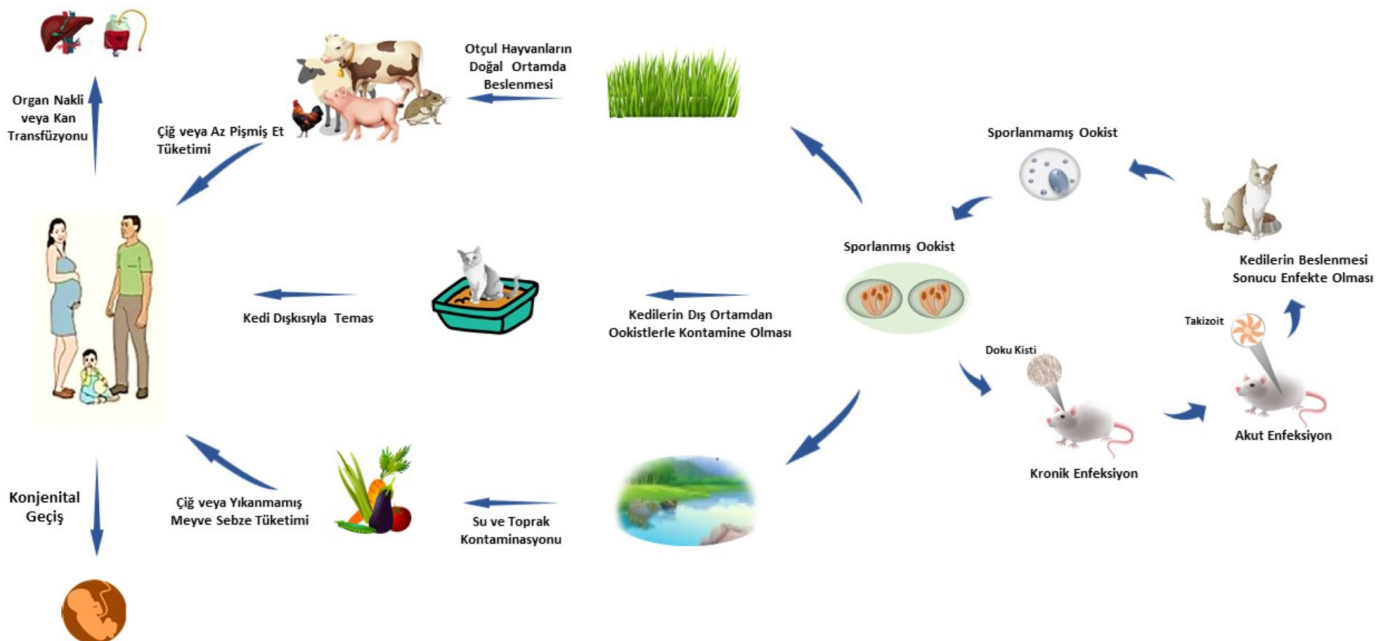
Yapılan diğer bir çalışmada *T. gondii* ile glioma riski arasında anlamlı pozitif bir ilişki gözlemlendiği belirtilmiştir (21).

Epidemiyoloji

Toxoplasma gondii dünyada oldukça yaygın olup enfeksiyonunun prevalansı üzerine yapılan epidemiyolojik çalışmalar dünya çapında farklılıklar göstermekle birlikte sosyal alışkanlıklar, hava koşulları, yaşam standartları ve coğrafik alan gibi farklı faktörlerin bu hastalığın prevalansını etkilediği bildirilmektedir (1). Afrika, Güneydoğu Asya'nın bazı kısımları ve Latin Amerika gibi gelişmekte olan veya az gelişmiş ülkelerde yüksek toksoplazmozis prevalans değerleri gözlenirken gelişmiş ülkelerde prevalansın düşük olduğu belirtilmektedir (22). 20. yüzyılda Orta Avrupa ülkelerinde seroprevalans değerleri %37-58 arasında değişirken Avusturalya ve Kuzey Afrika'da da benzer oranlar bildirilmiştir. Buna karşılık çoğu Latin Amerika ve Gine Körfezi'ndeki Batı Afrika ülkelerinde yüksek değerler gözlemlendiği bildirilmektedir (23). Güney Kore'de *T. gondii* prevalansı %1'in altındayken Brezilya'da bu oran %77'ye kadar ulaşmaktadır (24).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD) hastalık kontrol ve önleme merkezi raporlarına göre 2000'li yılların ortalarından sonlarına kadar toksoplazmozis ABD'de gıda kaynaklı hastalıklara bağlı ikinci en yaygın ölüm nedeni ve dördüncü hastaneye yatış nedenidir (1). ABD'de yaşayan insanların %8-22'sinin enfekte olduğu ve Birleşik Krallıkta da benzer bir prevalansın olduğu belirtilmektedir (19). Dünya Sağlık Örgütü, Avrupa'da gıda yoluyla bulaşan hastalık yükünün %20'sinin *T. gondii*'den kaynaklandığını tahmin etmektedir (25). Yapılan bir çalışmadan elde edilen veriler Almanya'da yaşa bağlı olarak *T. gondii* enfeksiyon oranının %20 ile %77 arasında olduğunu ve bu durumun muhtemelen çiğ sosis ürünlerinin tüketimine bağlı olarak değiştiğini göstermektedir (26). Bir başka çalışmada ise Paris'te yaşayan kadınlarda çiğ ya da az pişmiş et tüketimine bağlı olarak Londra'da yaşayan kadınlara oranla daha yüksek oranda seropozitiflik saptanmıştır (3).

Dünya'da olduğu gibi Türkiye'de de geniş bir dağılım gösteren *T. gondii* seroprevalansının belirlenmesinde çeşitli illerde çalışmalar



Şekil 1. *Toxoplasma gondii*'nin yaşam döngüsü

yapılmıştır. 2004-2015 yılları arasında yapılan çalışmalarda seroprevalans değerleri %18 ile %52 arasında değişmektedir (27-29). 2000-2018 tarihleri arasında bölgesel olarak toplanan serum örnekleri incelendiğinde seropozitifliğin Ege Bölgesi'nde %30,5, İç Anadolu Bölgesi'nde %29,5, Marmara Bölgesi'nde %28,8, Karadeniz Bölgesi'nde %21,3 Akdeniz Bölgesi'nde %3 olduğu görülmüştür (14). Hastalığın yayılımındaki en büyük risk faktörünün çiğ veya az pişmiş etler ve iyi yıkanmamış sebze ve meyvelerin tüketimi olduğu saptanmaktadır. Büyük ekonomik kayıplara neden olan bu parazitin yarattığı sorunları azaltabilmek için koruyucu tedbirler ile etkili bir aşının kullanılması gerekmektedir (30).

Patogenez

Toxoplasma gondii konak hücreye giriş yapmak ve konak hücrede proteinlerin ekspresyonunu düzenlemek için MIC, ROP ve GRA dahil olmak üzere birçok protein salgılamaktadır. Konak hücreye ilk temas yüzey antijenleri tarafından yüzey reseptörlerinin tanınmasıyla başlamaktadır (31,32). Parazit konak canlıya ookist veya doku kisti formuyla girdikten sonra bu iki formdan serbestleşen bradizoit ve sporozoitler ince bağırsak lümenini geçerek enterosit veya lamina propriadaki hücreleri istila etmekte ve sonrasında takizoit formuna dönüşmektedir (3,33). Takizoitlerin yapısında bulunan ROP'ler konak hücrede takizoitin kendini PV ile çevreleyerek ovalleşmesini ve lizozomal enzimlerden korunmasını sağlarken GRA'lar vakuol içinde parazitin çoğalmasında görevlidir. Konak hücrenin sahip olduğu endolizozomal yol ve parazitin sahip olduğu çeşitli sinyal iletim yolları sayesinde parazit vakuol içinde yaşamını devam ettirebilmektedir (2,31). ROP'ler lokalizasyonlarına bağlı olarak ROP boyun proteinleri (RON) ve ROP proteinleri olarak iki alt sınıfa ayrılmaktadır (32). ROP2, ROP5 ve ROP8 gibi psödokinaazların diğer proteinlerle etkileşime girerek *T. gondii* virülansında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (34). Takizoitlerin apikal ucunda bulunan MIC'ler ise istila sırasında hareketlilik ve bağlanma sağlayan çeşitli proteinlerin üretiminden sorumludur (35). Apikal bağlanma sırasında yüzeyde biriken MIC'lerden türetilen apikal membran antijeni (AMA1) yine bağlanma esnasında salgılanan RON'ler ile birleşmektedir (36). MIC2 proteini konak hücreye tutunmada ve parazit hareketliliğinde rol oynarken virülans ve konağa bağlanmada MIC1, MIC4 ve MIC6 proteinleri rol oynamaktadır (32). *T. gondii*'nin konak hücreden çıkışı MIC, RON ve ROP'lerin salgılanmasıyla artan kalsiyum seviyesine bağlı olarak gerçekleşmektedir (36). Bu proteinlere ek olarak BAG1 olarak da bilinen ısı şok proteini 30 (HSP30) ve HSP70 proteini gibi parazitin formuna özgü sentezlenen proteinler olduğu da bilinmektedir. BAG1 takizoitlerin bradizoitlere dönüşümünden sorumlu olan dolayısıyla paraziti çevreden gelebilecek tehlikelerden korumayı sağlayan bir proteindir (37). HSP70 proteini ise B ve yardımcı T-hücre (Th) yanıtlarının oluşmasını sağlayan, konak hücreyi öldürmeden önce takizoit formundan salgılanan bir proteindir (38). Parazitin her üç formunda ortak olarak bulunan proteinlerin toksoplazmozise karşı koruyucu bağışıklığı sağlayacak bir aşının geliştirilmesinde oldukça önemli olduğu belirtilmektedir (35,39).

Toksoplazmozise Karşı Gelişen İmmün Yanıt

Toxoplasma gondii'nin konağa bulaşması sonucu konak hücrede hem doğal hem de adaptif immün yanıt uyarımı gerçekleşmektedir. Bu uyarımın temelinde interlekin-12 (IL-12) ve interferon- γ (IFN- γ) üretimi yer almaktadır. Kimyasalların

yüksek seviyede üretimiyle patojenin yok edilmesini sağlayacak Th1 hücre yanıtı ve antijene özgü öldürücü yanıt oluşturacak CD8⁺ üretiminin artırılması sağlanır. *T. gondii* enfeksiyonu sırasında öncelikle, enfeksiyon bölgesinde bulunan hücrelerden kemokin salgılanmaktadır. Doğal immün yanıt hücreleri olan dentritik hücreler (DC), nötrofiller ve makrofajların yapısında bulunan toll benzeri reseptörler (*toll like receptor*) tarafından parazitin varlığı tespit edilerek ortamda IL-12 salgısı artırılmaktadır. CD4⁺, CD8⁺ ve doğal katil (NK) hücreler enfeksiyon bölgesine yönlendirilerek IFN- γ üretimi sağlanmaktadır. IL-12 ve IFN- γ , enfeksiyonun ilerlemesini engelleyerek konakçı hücrelerin parazitten korunmasında rol alan önemli sitokinlerdir (4,33).

Hücresel İmmün Yanıt

Parazit varlığının vücutta tespit edilmesinin ardından parazitin hücrede çoğalmasını engellemek amacıyla majör doku uyumluluk kompleksinin üretimi (MHC), parazite ait PV'nin oluşumunu engelleyecek genlerin ekspresyonu artırılır. Parazite ait yüzey antijenleri proteozomlar ile parçalanarak MHC-I ile hücre yüzeyinde sunulmakta ve CD8⁺ Th yüzeyinde bulunan Th reseptör ile MHC-I-Ag kompleksi oluşturulmaktadır. MHC-I ile CD8⁺ koreseptörü arasında güçlü bir kompleks sağlanmaktadır. Antijen sunan hücreler (APC) yüzeyinde yer alan CD80/86 molekülü ile CD8⁺ Th yüzeyinde bulunan CD28 reseptörü kompleks oluşturarak uyarımı artırmaktadır. CD8⁺ T perforin ve granzim salgıları ile APC üzerinde sitotoksik etki oluşturulmaktadır. Ayrıca, CD8⁺ Th'leri IFN- γ salgılayarak APC'den indüklenmiş nitrik oksit sentetaz salgısı ile hedef organizmanın ölümünde rol oynamaktadır (40).

Hücresel immün yanıt gelişiminde diğer bir yolak olarak patojene ait antijenler, APC tarafından peptitlerine ayrılırlar ve MHC II reseptörlerine bağlanıp APC yüzeyine iletilerek CD4⁺ T lenfositlerine sunulmaktadır. CD4⁺ T lenfositlerinin aktivasyonu CD3 koreseptörü ile gerçekleşmektedir. Bu aktivasyon, CD4⁺ Th yüzeyinde bulunan CD28 ve CD40L reseptörlerinin APC yüzeyinde yer alan CD80/86 ile CD40 reseptörlerinin birleşmesi sonucunda artırılmaktadır. MHC II-antijen kompleksi oluşumuyla APC'den IL-12 salgılanarak Th0 hücrelerinin Th1 hücrelerine dönüşümü sağlanmaktadır. Th1 hücrelerinin aktivasyonu, bu hücrelerden IFN- γ üretilerek NK hücrelerinin ve makrofajların üretimi ile hücresel immün yanıt oluşturulur. Makrofajlardan IL-12 salgılanmasıyla Th1 hücreleri miktar olarak artırılarak hücresel yanıtın güçlendirilmesi sağlanmaktadır (41,42). Aynı zamanda CD4⁺ hücreleri B lenfositleri uyarak humoral immün yanıtın oluşmasını sağlamaktadır (33).

Humoral İmmün Yanıt

Toxoplasma gondii antijenleri antijen sunan hücreler tarafından alınıp işlenerek MHC-II ile hücre yüzeyinde CD4⁺ Th'lere sunulmaktadır. CD4⁺ T hücreleri B lenfositlerini aktif hale getirerek plazmositlerin oluşumunu sağlamaktadır. *T. gondii*'nin neden olduğu enfeksiyona karşı gelişen humoral immün yanıtta görev alan plazma hücreleri IgM, IgG, IgA ve IgE üretimi gerçekleştirmektedir. Akut enfeksiyon sırasında IgM antikorunun yanında IgA ve IgE artışının da olduğu bildirilmektedir. Enfeksiyondan yaklaşık üç hafta sonra IgG antikorları ortaya çıkmaktadır. Üretilen antikorlar sayesinde parazitin konak hücrelere bağlanmasının engellenmesi ve klasik kompleman sistemin aktivasyonu sağlanmaktadır (4,40).

***Toxoplasma gondii* Genetik Çeşitliliğinin Aşı Çalışmalarındaki Önemi**

Parazit, dünya üzerinde farklı coğrafik bölgelerde çeşitli tiplerde görülmektedir (43). *T. gondii* ile ilgili yapılan genetik çalışmalarda parazite ait soylar Tip 1, Tip 2, Tip 3 ve atipik olarak sınıflandırılmıştır (14). Sınıflandırmada genetik olarak birbirlerine yakın olan bu tiplerin patojenitelerinin birbirinden farklı olduğu gösterilmiştir. Farelerde yapılan deneylerde Tip 1 suşların tek bir canlı organizma varlığında dahi öldürücü olduğu görülmüştür. Tip 2 ve 3 suşlar Tip 1'e oranla daha az patojeniktir ve kronik enfeksiyon oluşturmazlar (4). Tip 1 suşlar ile enfekte olan konakçı immün sisteminde DC ve CD8⁺ Th uyarısının az olduğu, Tip 2 suşlar ile oluşan immün sistem tepkilerinde ise bu hücrelerde güçlü yanıtlar olduğu bildirilmektedir (44). *T. gondii*'ye ait 3 suş arasındaki bu farklılıklar yanında konakta akut ve kronik enfeksiyon sırasında oluşan patolojik farklılıklar, yoğun granül ve ROP salgı proteinlerinin varlığı ve ekspresyon düzeylerindeki değişimlerden kaynaklandığı bildirilmektedir. Atipik suşlar ile ilgili ise henüz çok fazla bilgi bulunmamaktadır (43). Tip 1, Tip 2 ve Tip 3 suşlar, Kuzey Amerika ve Avrupa'da yaygın olarak gözlemlenirken Güney Amerika'da ise başta atipik ve Tip 2 suşları yaygındır (45). Yapılan diğer çalışmalarda ise konakçının herhangi bir suş ile enfekte olması bir başka suşla tekrar enfekte olarak süper enfekte olabileceğini göstermektedir. Bu durum, konakçı immün sisteminin parazite ait farklı suşlar ile enfekte olma durumunda koruma sağlamadığını ve parazitin konakçı immün yanıtından kaçmada farklı stratejiler geliştirdiğini açıkça göstermektedir (4). *T. gondii*'ye ait karmaşık yaşam döngüsünün anlaşılmasında suşların genotiplendirilmesi büyük önem taşıdığı yapılan çalışmalarda açıkça görülmektedir (46).

Rekombinant Protein Aşıları

Rekombinant protein aşıları, koruyucu immün yanıt uyarmak amacıyla enfeksiyona neden olan patojenin bir bölgesinin biyoteknolojik olarak üretilip aşı antijeni olarak kullanıldığı aşılardır. Günümüzde çeşitli patojenlere karşı geliştirilen ve geliştirilmekte olan aşılar da yüksek saflıkta rekombinant proteinler kullanılmaktadır. Rekombinant protein biyoprosesinde patojene ait antijenik gen bölgelerinin izole edilerek gen düzeyinde düzenlemeleri yapılmakta ve ardından patojenik olmayan canlılarda (bakteri, maya, böcek ve memeli hücreleri) protein ekspresyonu gerçekleştirilmektedir (47). Gen düzeyinde yapılan düzenlemeler gibi ekspresyon sistemlerinin seçimi de aşı çalışmalarında büyük önem taşımaktadır. Ekspresyon sistemi seçiminde hedef proteinin biyokimyasal özellikleri, hücre içinde salgılanma şekli ve yeri, ekspresyon seviyesi, post translasyonel modifikasyonlar ve proteolitik bozunuma dayanıklılığı gibi birçok faktör rol almaktadır (48). Bakteriyel ekspresyon sistemleri, heterolog proteinlerin üretiminde en çok kullanılan sistemlerden biridir. Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde hızlı ve kolay üretilmeleri, yüksek ekspresyon seviyelerine sahip olmaları ve genetik manipülasyonlarının kolay olması gibi pek çok avantaj bu sistemlerin tercih edilme nedenlerindendir (49). Protein verimliliğinin artırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda, maya ekspresyon sistemlerinin kullanımı büyük önem taşımaktadır. Mayalar, hem manipülasyon kolaylığı sağlamaları hem de ökaryotik organizmalar olmaları sebebiyle rekombinant proteinlerin üretimleri için uygun sistemlerdir. Yapılarında bulunan glikozilasyon ve fosforilasyon yolları yüksek protein verimliliği sağlamaktadır. En çok kullanılan maya

olan *Saccharomyces cerevisiae*'de protein üretim verimliliğinin yollar üzerinde gerçekleştirilebilecek genetik manipülasyonlar ile artırılabilirliğini bildirilmektedir (50). Böcek hücre kültürü sistemleri içinde en çok kullanılan vektör sistemi bakulovirüstür. Böcek ekspresyon sistemlerinde gerçekleşen translasyon sonrası modifikasyonlar ve doğru protein katlanmalarının memeli hücrelerine yakın olması bu sistemlerin kullanılabilirliğini artırmaktadır. Ancak, maliyetlerinin yüksek olması ve üretim zorluğu nedeniyle bakteri ve maya ekspresyon sistemlerine oranla daha az tercih edildiği bildirilmektedir (49). Translasyon sonrası modifikasyonların, glikozilasyon ve fosforilasyon mekanizmalarının doğru bir şekilde gerçekleştiği proteinlerin elde edilmesi için ise yüksek üretim sağlanabilen memeli ekspresyon sistemleri kullanılmaktadır. Bu sistemlerde de zayıf protein üretimi ve maliyetlerinin yüksek olması gibi nedenlerden dolayı kullanım zorlukları görülmektedir (48,49).

Günümüzde kullanımı devam eden ve rekombinant protein teknolojisi ile üretilen ilk aşı Hepatit B'ye karşı geliştirilmiştir. Hepatit B'ye karşı geliştirilen bu aşı yüksek immünojenik özellikte olan virüse ait yüzey antijeninin (HBsAg) maya hücrelerinde (*S. cerevisiae*) eksprese edilmesi ile oluşturulmuştur (11,48). Rekombinant protein teknolojisi ile oluşturulan diğer bir aşı insan papilloma virüsüne (HPV) karşı geliştirilmiştir. Günümüzde, virüs benzeri partiküller (VLP) kullanılarak hazırlanmış, maya ve böcek hücrelerinde protein ekspresyonları gerçekleştirilmiş iki adet HPV aşısı bulunmaktadır (11,51).

Rekombinant protein aşılarının diğer aşı teknolojilerine göre çeşitli avantajları vardır. Enfeksiyona neden olan patojene ait herhangi bir materyalin direkt kullanılmaması ve saflaştırma işlemlerinde kontaminasyon gerçekleşme ihtimalinin düşük olması en önemli avantajlardandır. Bunun yanında enfektif formlara dönüşme risklerinin az olması da bu aşıları güvenli hale getirmektedir (10). Ayrıca, geleneksel aşılar oranla rekombinant protein aşılarının üretim maliyetleri oldukça düşüktür (11). Üretim aşamasında uygun promotörlerin kullanımı ve proteinin salgılanması sırasında kullanılan sinyal dizilerinin eklenmesi gibi düzenlenmeler sayesinde yüksek miktarda ürün elde edilebilmektedir (10,48). Bunların yanında, rekombinant protein aşılarının dezavantajlarının bulunduğu noktalar da bulunmaktadır. Konak hücrede hedef proteinin proteolitik stabilitesinin korunma güçlüğü ve translasyon sonrası modifikasyonların doğru şekilde gerçekleşmeme riskleri önemli dezavantajları arasındadır. Ayrıca, oluşturulan rekombinant proteinin tek başına güçlü bir immün yanıt oluşturmaması nedeniyle, protein ile birlikte çoğunlukla kimyasal yapıda adjuvantların kullanımına gerek duyulmaktadır (47).

Rekombinant Protein Aşılarında Kullanılan Adjuvantlar

Aşılar ile oluşturulmak istenen kalıcı ve güçlü immün yanıtın elde edilmesi amacıyla kullanılan adjuvantlar, rekombinant protein aşılarının önemli biyolojik bileşenleridir (52). Geleneksel aşılar da yüksek düzeyde immün yanıt oluşturmaları nedeniyle yeni nesil aşılar oranla daha az adjuvant kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak, yeni nesil aşılar da gen düzeyinde yapılan manipülasyonlar sonucu yüksek saflıkta ürün elde edilmesi ve buna bağlı olarak aşılama sonucu hedef canlıda güçlü bir uyarım elde edilmemesi için adjuvant kullanımına olan ihtiyaç artmaktadır (53). Adjuvantlar, bağışıklık sisteminde yer alan antijen sunan hücreleri uyarak adaptif bağışıklığın etkin çalışmasını sağlamaktadır. Bu sayede

CD4⁺ T yardımcı hücrelerinin aktivitelerini artırılmaktadır. Uyarılan Th1 hücreleri, bellek oluşumundan ve antijene spesifik antikor üretiminden sorumlu B-hücrelerin ve CD8⁺ Th'lerinin aktivitelerinin artırılmasını sağlamaktadır. Bu sayede, aşılama sonucu yüksek immün yanıt elde edilmesi ve bellek oluşumu hedeflenmektedir (54).

Aşı çalışmalarında kullanılacak antijen, aşının uygulanma şekli ve oluşabilecek olası yan etkiler adjuvant seçiminde önemli faktörlerdir. Genellikle, adjuvantların güçlü immün yanıt oluşturmaları, biyolojik olarak parçalanabilir yapıda olmaları ve raf ömürlerinin uzun olması istenmektedir (55). Günümüzde aşı çalışmalarında tasarım stratejisine bağlı olarak değişen ve yaygın olarak kullanılan adjuvant tipleri ve oluşturduğu immün yanıtlar Tablo 1'de özetlenmiştir.

Toxoplasma gondii'ye Karşı Geliştirilmiş Rekombinant Protein Aşıları

Parazitin hem insan hem de hayvan sağlığı üzerinde oluşturduğu sorunlar nedeniyle ülkeler ekonomik olarak etkilenmektedir. Günümüzde yalnızca koyunlarda yaşanan ölü doğumları önlemeye yönelik canlı zayıflatılmış bir aşı (Toxovax®, MSD Hayvan sağlığı) bulunmaktadır (9). Ancak, ticari olarak kullanılan aşının virülen suşlara dönüş riski, raf ömrünün kısa olması gibi birçok olumsuz durum vardır. Geleneksel aşılarla oranla yeni nesil aşıların güvenilir olmaları, üretimlerinin kolay ve düşük maliyet ile gerçekleştirilmeleri nedeniyle rekombinant protein aşıları son yıllarda büyük bir değer kazanmıştır. Aşılarla kullanılabilecek yeni antijenlerin keşfi ve tasarım aşamalarında stratejik bölgelerin manipülasyonu aşı çalışmalarında önemli bir yere sahiptir.

Gelişen teknoloji ile adjuvant kullanımının çeşitlendirilmesi ve kombine üretim stratejilerinin kullanımıyla rekombinant protein aşı çalışmalarında karşılaşılan güçlükler azaltılmaya çalışılmaktadır. Son yıllarda, *T. gondii*'nin patogeneğinde rol oynayan proteinlerin seçilmesi, uygun ekspresyon sistemlerinin tercih edilmesi sonucunda toksoplazmozise yönelik aşı

çalışmaları da Tablo 2'de gösterildiği gibi hız kazanmıştır. *T. gondii*'ye karşı geliştirilen rekombinant protein aşı çalışmalarında parazite ait SAG proteinleri başta olmak üzere GRA, BAG, SRS, MIC ve çeşitli ROP proteinleri aşı adayı olarak kullanılmıştır. Bunların içinde en sık kullanılan antijenler SAG1, GRA1, ROP2, ROP18 olup, bu proteinlerin daha çok parazitin patogeneğinde konakçı yüzey reseptörlerinin tanınması, konak hücre lizozomal enzimlerinden korunma ve takizoitlerin PV içinde çoğalması gibi önemli rolleri bulunmaktadır. Bu çalışmalara örnek olarak, *T. gondii*'ye ait ROP13 antijenik bölgesi kullanılarak yapılan bir aşı çalışmasında bakulovirüste protein ekspresyonu gerçekleştirilmiş ve çalışma sonucunda hayatta kalma zamanında uzama gözlemlenmiştir (135). Yapılan çalışmalarda ekspresyon sistemi olarak bakteri, maya, böcek ve memeli sistemleri seçilmiştir. Bunların içinde heterolog proteinlerin üretiminde bu sistemlerin kullanılabilirliğinin en büyük sebepleri standardizasyonlarının ve manipülasyonlarının kolay, üretim maliyetlerinin düşük, ve hızlı sistemler olmasıdır. Parazite ait önemli salgı proteinlerinden biri olan SAG1 proteini ile virüs benzeri partikül (VLP) kombinasyonu kullanılan diğer bir çalışmada Sf9 böcek hücrelerinde protein eksprese edilmiş ve aşılama sonucunda güçlü bir immün yanıt elde edilerek hayatta kalma süresinde uzama sağlanmıştır (137). Aşı çalışmalarında mineral tuzları, lipid partiküller, immünoestimülör adjuvantlar, mikropartikül adjuvantlar ve mukozal adjuvant tipleri kullanılmıştır. Diğer bir örnek çalışmada ise MIC3, ROP8 ve SAG1 proteinleri Freund ve CaPNs adjuvantları ile birleştirilerek bakteriyel sistemde eksprese edilmiştir. Aşılama sonucunda immün yanıtta güçlü bir uyarılma gerçekleşmiş ve korunma zamanında uzama gözlemlenmiştir (142). Aşı çalışmalarında uygulama yolu olarak ise daha çok subkutan (S.C., deri altına) yol seçilmiş olup intramusküler (I.M., kas içine), intranasal (I.N., burun içine) ve intraperitoneal (I.P., periton içine) uygulama yolları da oldukça sık kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde yıllar içinde en kuvvetli immün yanıt ve/veya korunmanın SAG ve GRA antijenleri ile elde edildiği görülmektedir. İlgi çekici ve yenilikçi araştırmalardan bir diğeri SAG1, AMA1, ROP2 ve GRA4 proteinlerinin biyoinformatik yöntemlerle T ve B hücre epitoplarının tahmin edilmesiyle MHC moleküllerine bağlanma yeteneklerinin tespitine dayanmaktadır. Bu multimerik aşı çalışmasında proteinlerin PLG mikropartikül adjuvantı ile kullanımı sonucu kontrollere oranla yüksek düzeyde Th1 yanıt, spesifik antikor titreri, IFN- γ ve IL-2 seviyelerinde artış ve hayatta kalma oranlarında ciddi uzamalar sağlanmıştır (124). Son olarak, yakın zamanda yapılan güncel bir çalışmada ise takizoit yüzeyinde bulunan *T. gondii* ribozomal protein P2 (TgRPP2) aşı adayı olarak seçilmiştir. İlgili protein prokaryotik ekspresyon sisteminde eksprese edilerek çeşitli saflaştırma işlemlerinin ardından farelere düşükleri. Aşılama sonucunda farelerde *in vivo* deneyler ile yüksek antikor seviyeleri, sitokin ve MHC üretimleri saptanmıştır. Bu moleküllerin üretimi sayesinde farelerde hayatta kalma seviyelerinde ciddi uzamalar gözlemlenmiştir. Sonuçlara bakıldığında TgRPP2 aşılmasının toksoplazmoz için potansiyel bir aşı adayı olduğu bildirilmektedir (144).

SONUÇ

Toxoplasma gondii enfeksiyonu sonucunda hem hayvanlarda hem de insanlarda yaşamı zorlaştıran ciddi sağlık sorunları ve ekonomik kayıplar gözlemlenmektedir.

Tablo 1. Rekombinant protein aşı çalışmalarında yaygın olarak kullanılan adjuvantlar

Adjuvant	İçerik	Oluşturduğu immün yanıt
Alüminyum hidroksit Alüminyum fosfat Kalsiyum fosfat	Mineral tuzları	B ve Th2 hücre yanıtları Zayıf Th1 hücre yanıtı
Emülsiyonlar (MF59, Freund, Montanide, vb.) Lipozomlar Virozomlar	Lipid partiküller	Güçlü B ve Th1 hücre yanıtları
MPL (Monofosforil lipid A) CpG ODN Saponinler Sitokinler (IL-2, IL-12, vb.)	İmmünoestimülör adjuvantlar	Th1, CD8 ⁺ T-hücreleri
Virüs benzeri partiküller (VLP) PLG (polilaktidekoglitolit) mikropartikülleri	Mikropartikül adjuvantlar	Th1, CD8 ⁺ T-hücreleri
Kitosan Kolera toksini Mutant toksinler Polimerize lipozomlar	Mukozal adjuvantlar	Th1 ve B-hücre yanıtları

Tablo 2. Toksoplazmozise karşı yapılan rekombinant protein aşı çalışmaları

Aşı adayları	Ekspresyon sistemi	Adjuvant	Aşılama yolu	Sonuçlar	Yazar	Yılı
rSAG1 proteini	<i>E. coli</i>	Alum	I.P.	İmmün yanıtta uyarılma, korunma süresinde uzama	Petersen ve ark. (56)	1998
rSAG1 proteini	<i>E. coli</i>	IL-12	I.P.	İmmün yanıtta uyarılma, beyin kistlerinde %40 azalma	Letscher ve ark. (57)	1998
rGRA1 proteini	<i>M. bovis</i>	Freund	I.P.	İmmün yanıtta uyarılma, korunma süresinde uzama	Supply ve ark. (58)	1999
rSAG1 proteini	<i>P. pastoris</i>	SBAS1	S.C.	Konjenital bulaştan %48 koruma	Haumont ve ark. (59)	2000
rSAG1, rSAG2, rSAG3, rSRS1, rP54 proteinleri	<i>E. coli</i>	Freund	I.P.	Korunma süresinde %17 uzama	Mishima ve ark. (60)	2001
rSAG1 proteini	<i>E. coli</i>	-	S.C.	İmmün yanıtta uyarılma, bulaşta azalma	Letscher-Bru ve ark. (61)	2003
GRA4, rROP2 proteinleri ve karışımı	<i>E. coli</i>	Alum	I.M.	GRA4 ile beyin kistinde azalma	Martin ve ark. (62)	2004
rROP2-Hsp83 füzyon proteini	<i>E. coli</i>	-	Ayak tabanı	İmmün yanıtta uyarılma, korunma süresinde uzama	Echeverria ve ark. (63)	2006
rGRA2, rGRA6 proteinleri ve karışımları	<i>E. coli</i>	MPL	S.C.	GRA2 beyin kistinde %69,8 azalma, rGRA2+ rGRA6 beyin kistinde %48,2 azalma	Golkar ve ark. (64)	2007
rSAG1-GRA2 füzyon proteini	<i>P. pastoris</i>	Freund	S.C.	İmmün yanıtta uyarılma, korunma süresinde uzama	Zhou ve ark. (65)	2007
rGRA1 proteini	<i>E. coli</i>	Provax	I.P.	İmmün yanıtta uyarılma, hayatta kalma sürelerinde iki kat uzama	Döşkaya ve ark. (66)	2007
rROP2 proteini	<i>M. bovis</i>	-	S.C.	İmmün yanıtta uyarılma, korunma süresinde uzama	Wang ve ark. (67)	2007
Serin proteaz inhibitörü-1 proteini	<i>E. coli</i>	Alum	I.M.	İmmün sistemde uyarılma, beyin kistlerinde azalma, korunma süresinde %40 uzama	Cuppari ve ark. (68)	2008
rROP2+ rGRA5+ rGRA7	<i>E. coli</i>	Kolera toksini	I.N.	İmmün uyarılma, beyin kist oluşumunda %58,3 azalma	Igarashi ve ark. (69)	2008
rSAG1, rGRA1, rMAG1 epitopları ve karışımları	<i>E. coli</i>	Freund	S.C./I.P.	Beyin kistlerinde %89 azalma, immün uyarılma	Gatkowska ve ark. (70)	2008
rROP2+rROP4	<i>E. coli</i>	Freund	S.C.	İmmün uyarılma, beyin kistlerinde %46 azalma	Dziadek ve ark. (71)	2009
rSAG1 proteini	Bakulovirüs	-	I.M.	Korunma süresinde %50 uzama, immün yanıtta uyarılma	Fang ve ark. (72)	2010
rSAG2 proteini	Rekombinant influenza ve adenovirüs	-	I.N.	Beyin kistlerinde %85 azalma	Machado ve ark. (73)	2010
rRON4 proteini	Schneider böcek hücreleri	Freund	I.M.	İmmün yanıtta uyarılma	Rashid ve ark. (74)	2011
rROP2, rGRA4 proteinleri ve karışımı	<i>E. coli</i>	-	I.M.	Beyin kistlerinde %63-66 azalma	Sánchez ve ark. (75)	2011
rROP2+rROP4, rGRA4 ve rROP2+rROP4+ rSAG1	<i>E. coli</i>	Freund	S.C.	rROP2+rROP4+rGRA4 beyin kistlerinde %59 azalma; rROP2 + rROP4 + rSAG1 ile %90 beyin kistlerinde azalma	Dziadek ve ark. (76)	2011
rSAG1, rGRA1, rGRA4 epitop peptitleri	-	Freund	I.M.	Korunma süresinde uzama, immün yanıt uyarımı	Wang ve ark. (77)	2011

Tablo 2. Devamı

Aşı adayları	Ekspresyon sistemi	Adjuvant	Aşılama yolu	Sonuçlar	Yazar	Yılı
rROP2+rROP4+ rGRA4 ve rROP2+rROP4+ rSAG1	<i>E. coli</i>	Freund	S.C.	rROP2 + rROP4 + rGRA4 ile beyin kistlerinde %84 azalma, rROP2+ rROP4 + rSAG1 ile %77 beyin kistlerinde azalma	Dziadek ve ark. (78)	2012
rGRA4 proteinini	Tütün bitkisi hücreleri (<i>Nicotiana tabacum</i>)	-	P.O.	Güçlü immün yanıt uyarımı, korunma süresinde %59 uzama	Del ve ark. (79)	2012
rGRA7 proteinini	<i>E. coli</i>	Freund	S.C./I.M.	DNA aşısı + protein aşısı uygulama; korunma süresinde %60 uzama, immün yanıtta uyarılma	Min ve ark. (80)	2012
rROP5+rSAG1	<i>E. coli</i>	Freund	S.C.	İmmün uyarılma ve korunma süresinde uzama	Zheng ve ark. (81)	2013
rROP18 proteinini	<i>E. coli</i>	Ginsenoside Re	S.C.	İmmün uyarılma ve korunma süresinde uzama	Qu ve ark. (82)	2013
rSiklofilin proteinini	<i>M. bovis</i>	-	P.O./I.V.	İmmün uyarılma ve hayatta kalma süresinde %17 uzama	Yu ve ark. (83)	2013
rDisülfid izomeraz proteinini (TgPDI)	<i>E. coli</i>	-	I.N.	İmmün yanıtta uyarılma, korunma süresinde %31 uzama	Wang ve ark. (84)	2013
rAktin proteinini (TgACT)	<i>E. coli</i>	-	I.N.	Karaciğer kistlerinde %60,05, beyin kistlerinde %49,75 azalma ve korunma süresinde %50 uzama	Yin ve ark. (85)	2013
rSAG1 proteinini	<i>E. coli</i>	PLG mikropartikül/ Vet L-10	I.P.	PLG mikropartikül aşısı ile yüksek immün yanıt uyarımı, korunma süresinde %80 uzama	Chuang ve ark. (86)	2013
rSAG1/2 proteinini	<i>E. coli</i>	PLG mikropartikül/ Vet L-10	I.P.	PLG mikropartikül aşısı ile immün yanıtta uyarılma, korunma süresinde %83 uzama	Chuang ve ark. (87)	2013
rSAG1 proteinini	Rekombinant adenovirüs	-	S.C.	Modifiye SAG1 Ankara virüsüyle rSAG1 aşısı ile korunma süresinde uzaman ve beyin kistlerinde azalma	Mendes ve ark. (88)	2013
TgRACK-1 (rC kinaz 1'i aktive eden reseptör proteinini)	<i>E. coli</i>	-	I.N.	İmmün yanıtta uyarılma ve korunma süresinde %45 uzama	Wang ve ark. (89)	2014
rROP17 proteinini	<i>E. coli</i>	-	I.N.	İmmün yanıtta uyarılma ve korunma süresinde %50 uzama	Wang ve ark. (90)	2014
rSAG2 proteinini	<i>E. coli</i>	PLG mikropartikül/ Vet L-10	I.P.	PLG mikropartiküllü aşıda immün yanıt uyarımı daha fazladır, korunma süresinde %87 uzama	Chuang ve Yang (91)	2014
rProfilin proteinini (rTgPF)	<i>E. coli</i>	Oligomannoz kaplı lipozom (OML)	S.C.	İmmün uyarılma ve korunma süresinde %41,7 uzama	Tanaka ve ark. (92)	2014
rBAG1, rSRS4, rSRS9 proteinleri	<i>E. coli</i>	rMinding proteinini/ Freund	I.M.	rMindingin adjuvant olarak kullanımı, immün yanıtta uyarılma, korunma süresinde uzama	Sun ve ark. (93)	2014
AMA1, RON2, RON4	-	-	I.N.	AMA1 + RON2 ile korunma süresinde %70 uzama	Zhang ve ark. (94)	2015

Tablo 2. Devamı

Aşı adayları	Ekspresyon sistemi	Adjuvant	Aşılama yolu	Sonuçlar	Yazar	Yılı
rSAG1,rMAG1,rGRA7(SMG) epitopları	<i>E. coli</i>	GERBU	S.C.	Beyin kistlerinde azalma, immün yanıtta uyarılma	Wagner ve ark. (95)	2015
rSGA5A	-	-	I.M.	İmmün uyarılma, beyin kistinde %35 azalma	Lu ve ark. (96)	2015
PLG ile kapsüllenmiş TgROP18, TgROP38	<i>E. coli</i>	PLG	S.C.	İmmün yanıtta uyarılma, beyin kistinde %81,3 azalma	Xu ve ark. (97)	2015
chLiHsp83-SAG1	<i>N. tabacum</i>	-	P.O.	rSAG1'e özgü antikorlarda artışa bağlı olarak beyin kistlerinde %57 azalma	Albarracín ve ark. (98)	2015
rTgPI-1	<i>E. coli</i>	Alum, CpG-ODN	I.D./I.N.	Humoral immün yanıtta uyarılma, beyin kistinde %62 azalma	Sánchez ve ark. (99)	2015
rROP1, pVAX-ROP1	<i>E. coli</i>	Freund	I.M./S.C.	Humoral immün yanıt uyarımı, akut toksoplazmoza karşı rROP1 aşısı ile %100 koruma	Sonaimuthu ve ark. (100)	2016
rTgPGAM2	<i>E. coli</i>	-	I.N.	Korunma süresinde %70 uzama, beyin ve karaciğer takizoitlerinde sırasıyla %57 ve %69 azalma, yüksek IgG1, IFN- γ , IL-2, IL-4 seviyeleri	Wang ve ark. (101)	2016
rCDPK6 ve rROP18	<i>E. coli</i>	PLG	S.C.	Güçlü immün yanıt uyarımı, yüksek IFN- γ ve IL-2 ile Th1 yanıtı, korunma süresinde uzama, beyin kistinde azalma	Zhang ve ark. (102)	2016
rTgMDH	<i>E. coli</i>	-	I.N.	Güçlü antikor titresi, IL-2 ve IFN- γ seviyelerinde artış, korunma süresinde %47 uzama, karaciğer ve beyinde parazit yükünde %58 ve %42 azalma	Liu ve ark. (103)	2016
rBAG1 ve rGRA1	<i>E. coli</i>	Alum	I.P.	Güçlü IgG yanıtı, yüksek IgG2a yanıtı, CD8 ⁺ T lenfosit oranında iki kat artış, beyin kistinde %10,5 azalma	Gedik ve ark. (104)	2016
rTgADF	<i>E. coli</i>	-	I.N.	Yüksek IgA ve IgG titresi, IL-2 ve IFN- γ artışı, korunma zamanında %36,6 uzama, parazit yükünde karaciğer ve beyinde sırasıyla %67,66 ve %51,01 azalma	Liu ve ark. (105)	2016
Et-rTgSAG1	<i>E. coli</i>	-	I.P./P.O.	TgSAG1'e özgü Th1-dominant immün yanıt, korunma süresinde uzama	Tang ve ark. (106)	2016
rGRA2 ve rGRA5	<i>E. coli</i>	Freund	S.C.	İmmün yanıtta uyarılma, yüksek IgG üretimi, IFN- γ , IL-2, IL-4 ve IL-10 artışı, akut enfeksiyona karşı kısmi koruma	Ching ve ark. (107)	2016
rSAG1 ve rGRA2	<i>E. coli</i>	PLGA	S.C.	Yüksek IFN- γ /IL-10 oranı ve daha yüksek miktarda IgG antikorlarına bağlı olarak korunmada uzama	Allahyari ve ark. (108)	2016
rSAG1, rSRS52A, rSAG2C, rGRA6 ve rGRA5 epitopları	<i>E. coli</i>	GLA-SE	S.C.	İmmün yanıtta uyarılma, beyin kistinde %30 azalma	El Bissati ve ark. (109)	2016

Tablo 2. Devamı

Aşı adayları	Ekspresyon sistemi	Adjuvant	Aşılama yolu	Sonuçlar	Yazar	Yılı
rTgENO2 ve rTgTrxLp	<i>E. coli</i>	Freund	S.C.	Yüksek IgG antikorları, IFN- γ , IL-2, CD4 ⁺ ve CD8 ⁺ T-hücreleri, güçlü immün yanıt, korunma zamanında uzama, beyin kistinde %69,77, %58,14 ve %20,93 azalma	Wang ve ark. (110)	2016
IMC-influenza M1 nrVLP aşısı	Sf9 böcek hücreleri	-	I.N.	Güçlü IgG, IgG1 ve IgG2a antikor yanıtları ve dışkıda IgA antikor yanıt artışı, %100 hayatta kalma, beyin kistinde azalma	Lee ve ark. (111)	2016
TgPrx3-GST	<i>E. coli</i>	-	S.C.	İmmün yanıtta uyarılma, hayatta kalma oranında %55,6 artış, parazit yükünde azalma	Fereig ve Nishikawa (112)	2016
rROP18	<i>E. coli</i>	Montanide-PLGA	I.P./I.N.	PLGA-rROP18, rROP18 ve montanide-rROP18'e kıyasla yüksek IgA ve IgG2a yanıtı	Nabi ve ark. (113)	2017
rTgHSP70	-	Alum	S.C.	Yüksek IgG1 üretimi, beyin kistlerinde azalma, parazit yükünde azalma	Czarnewski ve ark. (114)	2017
rROP2	<i>E. coli</i>	Quil-A	I.N.	Kediler ile gerçekleştirilen çalışmada aşılama sonucunda kist sayısında azalma	Zulpo ve ark. (115)	2017
rTgPrx1	<i>E. coli</i>	Freund	I.P./S.C.	Spesifik antikor üretiminde uyarılma, artan IFN- γ üretimi, korunma süresinde uzama, parazit yükünde azalma	Fereig ve ark. (116)	2017
rROP18	Schneider böcek hücreleri	Poly I:C/ Montanide-Kolera toksini	I.N./S.C.	Th1/Th2 bağımsızlık yanıtı, beyin kistinde %50 azalma	Rashid ve ark. (117)	2017
rTgEF-1 α	<i>E. coli</i>	Freund	S.C.	Korunma süresinde uzama, yüksek anti- <i>T. gondii</i> antikorları, IFN- γ ve IL-4 üretimi,	Wang ve ark. (118)	2017
TgHSP70	<i>E. coli</i>	GSLS	S.C.	İmmün yanıtta uyarılma, GSLS dozunun artışı ile antikor oranında yükselme, hayatta kalma süresinde artış	Zhuo ve ark. (119)	2017
rSAG1, rSAG2, GRA1	<i>E. coli</i>	MDP	I.M.	Periferik kan hücrelerinde hem IFN- γ üretimi hem de serumda bulunan GRA1'e özgü IgG2 seviyesinde artma	Oledzka ve ark. (120)	2017
rMIC16	<i>S. cerevisiae</i>	-	P.O./I.P.	İmmün yanıtta güçlü uyarılma, aşılama sonucu %10-%20 oranında korunma süresinde uzama	Wang ve ark. (121)	2018
SAG1	Schneider böcek hücreleri	Poly I:C	I.N/S.C.	SAG1 kronik enfeksiyona karşı koruma, parazit yükünde azalma, güçlü Th1 yanıt	Lakhrif ve ark. (122)	2018
rSAG1, rGRA2, rGRA7 epitopları	<i>E. coli</i>	Freund	S.C.	Th1/Th2 indüklenmesi, yüksek IFN- γ salınımı	Hajissa ve ark. (123)	2018

Tablo 2. Devamı

Aşı adayları	Ekspresyon sistemi	Adjuvant	Aşılama yolu	Sonuçlar	Yazar	Yılı
SAG1, AMA1, ROP2, GRA4 epitopları	<i>E. coli</i>	PLGA (poly lactic-co-glycolic acid), Alum	I.P.	PLGA içeren ve içermeyen multiepitop bazlı aşı Th1 yanıtında artış, korunma süresinde uzama, yüksek spesifik antikor titreri, IFN- γ ve IL-2, alum içeren aşı ile Th2 uyarımı	Roosbehani ve ark. (124)	2018
ROP18 ve MIC8 epitopları ile VLP aşısı	Sf9 böcek hücreleri	-	I.M.	Parazit yükünde azalma ve bellek hücresi oluşumu	Lee ve ark. (125)	2018
ROP4 ve ROP18- influenza M1 VLP aşısı	Rekombinant bakulovirüs	-	I.M.	ROP18-VLP yüksek seviyede immün yanıt ve kist sayısında azalma	Kang ve ark. (126)	2018
TgPI-1, rROP2 ve rGRA4 kokteyli	<i>E. coli</i>	Alum, CpG-ODN	I.D./I.N.	Parazit yükünde %50 azalma, kronik toksoplazmozise karşı yüksek koruma	Picchio ve ark. (127)	2018
rSAG1	<i>E. coli</i>	PLGA	I.P./I.N.	PLGA-rSAG1 yüksek humoral yanıt	Naeem ve ark. (128)	2018
rGRA14	<i>E. coli</i>	Alum ve CaPNs	I.M.	rGRA14-CaPNs ile immün yanıtta uyarılma, korunma süresinde uzama, rGRA14 + alum ile immün yanıtta uyarılma	Pagheh ve ark. (129)	2019
rTgCDPK3	<i>E. coli</i>	Freund	I.M.	Güçlü immün yanıt uyarımı, korunma zamanında uzama	Wu ve ark. (130)	2019
rTgCDPK1	<i>E. coli</i>	-	I.P.	Güçlü immün yanıt uyarımı, korunma zamanında uzama	Huang ve ark. (131)	2019
rTgMIF	<i>E. coli</i>	Freund	I.M.	İmmün yanıtta uyarılma, beyin kistlerinde %62,26 azalma	Liu ve ark. (132)	2019
IMC, ROP18, MIC8 influenza M1 VLP aşısı	Rekombinant bakulovirüs	-	I.M.	Hayatta kalmada %20 artış	Lee ve ark. (133)	2019
ROP4 ve ROP13	Rekombinant bakulovirüs	-	I.N.	İmmün yanıtta uyarılma, beyin doku kistlerinde azalma	Kang ve ark. (134)	2019
ROP13	Rekombinant bakulovirüs	-	I.N. ve I.M.	IN aşılama sonucu yüksek IgG ve IgA antikorları, beyin doku kistlerinde azalma	Kang ve ark. (135)	2019
ROP4 ve ROP13 VLP aşısı	Rekombinant bakulovirüs	-	I.M.	İmmün yanıtta uyarılma, %100 hayatta kalma	Kang ve ark. (136)	2020
SAG1	Sf9 böcek hücreleri	-	I.M.	İmmün yanıtta uyarılma, hayatta kalma oranında %75 uzama	Choi ve Park (137)	2020
AMA1	Rekombinant bakulovirüs	-	I.N.	Yüksek IgG ve IgA antikorları, beyin doku kistlerinde %40 azalma	Kim ve ark. (138)	2020
rTgERK7	<i>E. coli</i>	Freund	S.C. ve I.M.	İmmün yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Li ve ark. (139)	2020
Altıvalanlı rekombinant protein aşısı	<i>E. coli</i>	Montanide ISA 50 V	I.P.	IgG ve Ig2a seviyelerinde artış, korunma zamanında uzama	Atalay Şahar ve ark. (140)	2020
IMC, rROP18 ve rMIC8	Rekombinant bakulovirüs	CpG-ODN	I.V.	İmmün yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Kang ve ark. (141)	2021
MIC3, ROP8, SAG1 epitopları	<i>E. coli</i>	Freund ve CaPNs	S.C.	İmmün yanıtta uyarılma, Freund ve CaPNs ile birlikte uygulama sonucunda korunma zamanında uzama	Dodangheh ve ark. (142)	2021

Tablo 2. Devamı

Aşı adayları	Ekspresyon sistemi	Adjuvant	Aşılama yolu	Sonuçlar	Yazar	Yılı
rTgPF ve GRA7	<i>E. coli</i>	Freund	I.D.	İmmün yanıtta uyarılma, beyin kistlerinde %46 azalma	Arcon ve ark. (143)	2021
rTgRPP2	<i>E. coli</i>	Freund	I.M.	İmmün yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Yu ve ark. (144)	2021

I.M.: İntramusküler, kas içine, I.P.: İntraperitoneal, periton içine, I.D.: Deri içine, I.V.: Damar içine, I.N.: İntranazal, burun içine, P.O.: Peroral, ağız içine, S.C.: Subkutan, deri altına, *E. coli*: *Escherichia coli*, *S. cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae*, *N. tabacum*: *Nicotiana tabacum*, *M. bovis*: *Mycobacterium bovis*

Parazitin neden olabileceği klinik etkilerin azaltılması, gebelerde oluşabilecek düşüklüğün önlenmesi ve başta immün sistemi zayıf olan bireylerde olmak üzere ölümlerin engellenebilmesi amacıyla güvenli, etkili ve kolay elde edilebilir bir aşıya ihtiyaç duyulmaktadır. Tüm dünyada parazite yönelik aşı geliştirme çalışmaları hızla devam etmektedir. Günümüze dek yapılan aşı geliştirme çalışmalarından elde edilen verilerde farelerde güçlü immün yanıt uyarımları, hayatta kalma sürelerinde uzamalar ve parazit yükünde ciddi azalmalar sağlandığı bildirilmiştir. Bu çalışmalarda yenilikçi stratejiler kullanılmaktadır. Özellikle parazite yönelik doğru antijenik proteinlerin ve ekspresyon sistemlerinin seçimi rekombinant protein aşılarının geliştirilebilmesinde büyük önem taşımaktadır. Ancak tüm bunlara rağmen, insanların kullanımına uygun bir rekombinant protein aşısı henüz bulunmamaktadır. Bu durumun temel sebepleri, parazitin karmaşık yaşam döngüsü, konakçı immün sisteminden kaçmaya yönelik geliştirdiği stratejiler ve yapısında bulunan protein çeşitliliğidir. Bunlara ek olarak, parazite ait suş çeşitliliğinin fazla olması, seçilen antijenik bölgenin her suşta etkin yanıtlar oluşturmama riskini ortaya çıkarmaktadır.

Son yıllarda *T. gondii*'ye yönelik yapılan rekombinant protein aşı çalışmalarında, parazitin yaşam döngüsünde yer alan üç formda da bulunan yüksek antijenik gen bölgelerinin seçimine önem verilmesi, bu bölgelerin uygun ekspresyon sistemleri kullanılarak eksprese edilmesi ve elde edilen proteinlerin seçilen hayvan modellerine uygulanması ile olumlu sonuçlar elde edilmektedir. Rekombinant protein aşılarının canlı ya da inaktif patojen taşıyamaları bu aşıları güvenilir hale getirmektedir. Üretimlerinde çeşitli ve düşük maliyetli ekspresyon sistemlerinin kullanılabilirliği sayesinde üretim kolaylığı sağlamaktadır. Aşılama sonucunda hem hücresel hem de humoral immün yanıtta uyarım sağlamaları gibi pek çok olanak ise rekombinant protein aşılarının değerini artıran özelliklerdir. Ayrıca, son zamanlarda suşlar üzerine yapılan genotiplendirme çalışmalarının sonuçları aşı adayları antijen seçiminde suş çeşitliliğinin önemini açıkça gösterilmektedir. Tüm bunlara biyoteknolojik ilerlemelerin de eklenmesi rekombinant protein aşılarının üretiminde kombine stratejilerin kullanım gereksinimini artırmaktadır. Yaşanan bu ilerlemeler, toksoplazmozisin yayılmasının önlenmesi ve oluşturduğu zararların azaltılmasında bir çözüm yolu olarak rekombinant protein aşılarının umut vaat ettiğini açıkça göstermektedir.

*Etik

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

*Yazarlık Katkıları

Veri Toplama veya İşleme: T.K., C.G., M.K., A.G., H.C., C.Ü., M.D., A.Y.G., A.D.D., Analiz veya Yorumlama: T.K., C.G., S.E.A., H.C., C.Ü., M.D., A.Y.G., A.D.D., Literatür Arama: T.K., C.G., M.K., A.G., S.E.A., A.D.D., Yazan: T.K., C.G., H.C., M.D., A.D.D.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Yektaeian N, Malekpour A, Atapour A, Davoodi T, Hatam G. Genetic immunization against toxoplasmosis: A review article. *Microb Pathog* 2021; 155: 104888.
- Gürüz AY, Delibaş SB. Toksoplazmozis ve İmmunoloji. Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji, Özcel MA, İnci A, Turgay N, Köroğlu E. Editors. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2007;p.167-94.
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 267-99.
- Wang JL, Zhang NZ, Li TT, He JJ, Elsheikha HM, Zhu XQ. Advances in the development of anti-*Toxoplasma gondii* vaccines: challenges, opportunities, and perspectives. *Trends Parasitol* 2019; 35: 239-53.
- Lyons RE, McLeod R, Roberts CW. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol* 2002; 18: 198-201.
- Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. *Scand J Infect Dis* 2012; 44: 805-14.
- Inceboz M, Inceboz T. Toxoplasmosis and Neuropsychological Effects. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2021; 45: 49-55.
- Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol* 2009; 39: 895-901.
- Innes EA, Hamilton C, Garcia JL, Chryssafidis A, Smith D. A one health approach to vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Food Waterborne Parasitol* 2019; 15: e00053.
- Liljeqvist S, Ståhl S. Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J Biotechnol* 1999; 73: 1-33.
- Nascimento IP, Leite LCC. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Braz J Med Biol Res* 2012; 45: 1102-11.
- Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol* 2008; 55: 467-75.
- Dubey JP. *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*, and other tissue cyst forming Coccidia of humans and animals. *Parasitic Protozoa* 1993; 6: 5-57.
- Kolören Z, Dubey JP. A review of toxoplasmosis in humans and animals in Turkey. *Parasitology* 2020; 147: 12-28.
- Döşkaya M, Caner A, Ajzenberg D, Değirmenci A, Dardé ML, Can H, et al. Isolation of *Toxoplasma gondii* strains similar to Africa 1 genotype in Turkey. *Parasitol Int* 2013; 62: 471-4.
- Yucesan B, Guldemir D, Babur C, Kilic S, Cakmak A. Whole-genome sequencing of a *Toxoplasma gondii* strain from a Turkish isolate using next-generation sequencing technology. *Acta Trop* 2021; 218: 105907.
- Attias M, Teixeira DE, Benchimol M, Vommaro RC, Crepaldi PH, De Souza W. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasit Vectors* 2020; 13: 588.

18. Beder D, Taşbent FE. Genel Özellikleri ve Laboratuvar Tanısı ile *Toxoplasma gondii* Enfeksiyonları. Türkiye Parazit Derg 2020; 44: 94-101.
19. Aguirre AA, Longcore T, Barbieri M, Dabritz H, Hill D, Klein PN, et al. The one health approach to toxoplasmosis: epidemiology, control, and prevention strategies. Ecohealth 2019; 16: 378-90.
20. Jones JL, Kruszon-Moran D, Sanders-Lewis K, Wilson M. *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2004, decline from the prior decade. Am J Trop Med Hyg 2007; 77: 405-10.
21. Hodge JM, Coghill AE, Kim Y, Bender N, Smith-Warner SA, Gapstur S, et al. *Toxoplasma gondii* infection and the risk of adult glioma in two prospective studies. Int J Cancer 2021.
22. Al-Malki ES. Toxoplasmosis: stages of the protozoan life cycle and risk assessment in humans and animals for an enhanced awareness and an improved socio-economic status. Saudi J Biol Sci 2021; 28: 962-9.
23. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol 2000; 30: 1217-58.
24. Djurković-Djaković O, Dupouy-Camet J, Van der Giessen J, Dubey JP. Toxoplasmosis: overview from a one health perspective. Food Waterborne Parasitol 2019; 15: e00054.
25. Havelaar AH, Kirk MD, Torgerson PR, Gibb HJ, Hald T, Lake RJ, et al. World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. PLoS Med 2015; 12: e1001923.
26. Pleyer U, Gross U, Schlüter D, Wilking H, Seeber F. Toxoplasmosis in Germany. Dtsch Arztebl Int 2019; 116: 435-44.
27. Ocak S, Zeteroglu S, Ozer C, Dolapcioglu K, Gungoren A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, rubella and cytomegalovirus among pregnant women in southern Turkey. Scand J Infect Dis. 2007; 39: 231-4.
28. Kayman T, Kayman M. Kayseri'deki Gebelerde Toksoplazmoz Seroprevalans. Perinatoloji Derg 2015; 18: 92-6.
29. Toklu GD. Antibodies frequency against Toxoplasmosis, Rubella Virus and Cytomegalovirus in pregnant women. J Clin Anal Med 2013; 4: 38-40.
30. Karakavuk M, Can H, Gül A, Döşkaya AD, Alak SE, Ün C, et al. GRA8 DNA vaccine formulations protect against chronic toxoplasmosis. Microb Pathog 2021; 158: 105016.
31. Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. Expert Rev Mol Med 2001; 2001: 1-19.
32. Zhang Y, Lai BS, Juhas M, Zhang Y. *Toxoplasma gondii* secretory proteins and their role in invasion and pathogenesis. Microbiol Res 2019; 227: 126293.
33. Weiss LM, Kim K. *Toxoplasma gondii*, The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods, Elsevier 2011; pp. 800.
34. Talevich E, Kannan N. Structural and evolutionary adaptation of rhoptyr kinases and pseudokinases, a family of coccidian virulence factors. BMC Evol Biol 2013; 13: 117.
35. Rezaei F, Sarvi S, Sharif M, Hejazi SH, Sattar Pagheh A, Aghayan SA, et al. A systematic review of *Toxoplasma gondii* antigens to find the best vaccine candidates for immunization. Microb Pathog 2019; 126: 172-84.
36. Sibley LD. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. Immunol Rev 2011; 240: 72-91.
37. Mohamed RM, Aosai F, Chen M, Mun HS, Norose K, Belal US, et al. Induction of protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma gondii* HSP70, HSP30 and SAG1 genes. Vaccine 2003; 21: 2852-61.
38. Kikumura A, Fang H, Mun HS, Uemura N, Makino M, Sayama Y, et al. Protective immunity against lethal anaphylactic reaction in *Toxoplasma gondii*-infected mice by DNA vaccination with *T. gondii*-derived heat shock protein 70 gene. Parasitol Int 2010; 59: 105-11.
39. Döşkaya M, Liang L, Jain A, Can H, İz SG, Felgner PL, et al. Discovery of new *Toxoplasma gondii* antigenic proteins using a high throughput protein microarray approach screening sera of murine model infected orally with oocysts and tissue cysts. Parasit Vectors 2018; 11: 393.
40. Filisetti D, Candolfi E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. Ann Ist Super Sanita 2004; 40: 71-80.
41. Henriquez FL, Woods S, Cong H, McLeod R, Roberts CW. Immunogenetics of *Toxoplasma gondii* informs vaccine design. Trends Parasitol 2010; 26: 550-5.
42. Pier GB, Lyczak JB, Wetzler LM. Immunology, infection, and immunity. American Society for Microbiology, Washington D.C. 2004.p.697.
43. Xiao J, Yolken RH. Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. Acta Physiol (Oxf) 2015; 213: 828-45.
44. Munoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM. Immunology of *Toxoplasma gondii*. Immunol Rev 2011; 240: 269-85.
45. Hunter CA, Sibley LD. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. Nat Rev Microbiol 2012; 10: 766-78.
46. Karakavuk M, Aldemir D, Mercier A, Atalay Şahar E, Can H, Murat JB, et al. Prevalence of toxoplasmosis and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strains isolated in wild birds of prey and their relation with previously isolated strains from Turkey. PLoS One 2018; 13: e0196159.
47. Hansson M, Nygren P, Ståhl S. Design and production of recombinant subunit vaccines. Biotechnol Appl Biochem 2000; 32: 95-107.
48. Andersson C. Production and delivery of recombinant subunit vaccines, Department of Biotechnology Royal Institute of Technology (KTH), Sweden, 2000; p. 92.
49. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv 2009; 27: 297-306.
50. Andersen DC, Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. Curr Opin Biotechnol 2002; 13: 117-23.
51. Hudu SA, Shinkafi SH, Shuaibu U. An overview of recombinant vaccine technology, adjuvants and vaccine delivery methods. Int J Pharm Pharm Sci 2016; 8: 19-24.
52. Shi S, Zhu H, Xia X, Liang Z, Ma X, Sun B. Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvant activity. Vaccine 2019; 37: 3167-78.
53. Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines. Nat Med 2013; 19: 1597-608.
54. Pollet J, Chen WH, Strych U. Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. Adv Drug Deliv Rev 2021; 170: 71-82.
55. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. Immunol Cell Biol 2004; 82: 488-96.
56. Petersen E, Nielsen HV, Christiansen L, Spenter J. Immunization with *E. coli* produced recombinant *T. gondii* SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. Vaccine 1998; 16: 1283-9.
57. Letscher Bru V, Villard O, Risse B, Zauke M, Klein JP, Kien TT. Protective effect of vaccination with a combination of recombinant surface antigen 1 and interleukin 12 against toxoplasmosis in mice. Infect Immun 1998; 66: 4503-6.
58. Supply P, Sutton P, Coughlan SN, Bilo K, Saman E, Trees AJ, et al. Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*. Vaccine 1999; 17: 705-14.
59. Haumont M, Delhaye L, Garcia L, Margarita J, Pasqualina M, Véronique D, et al. Protective immunity against congenital toxoplasmosis with recombinant SAG1 protein in a guinea pig model, Infect Immun 2000; 68: 4948-53.
60. Mishima M, Xuan X, Shioda A, Omata Y, Fujisaki K, Nagasawa H, et al. Modified protection against *Toxoplasma gondii* lethal infection and brain cyst formation by vaccination with SAG2 and SRS1. J Vet Med Sci 2001; 63: 433-8.
61. Letscher-Bru V, Pfaff AW, Abou-Bacar A, Filisetti D, Antoni E, Villard O, et al. Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG-1 protein is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice. Infect Immun 2003; 71: 6615-9.
62. Martin V, Supanitsky A, Echeverria P, Litwin S, Tanos T, Roodt, A, et al. Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the GRA4 gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis. Clin Diagn Lab Immunol 2004; 11: 704-10.

63. Echeverria P, Miguel N, Costas M, Angel S. Potent antigen-specific immunity to *Toxoplasma gondii* in adjuvant-free vaccination system using Rop2-Leishmania infantum Hsp83 fusion protein. *Vaccine* 2006; 24: 4102-10.
64. Golkar M, Shokrgozar MA, Rafati S, Musset K, Assmar M, Sadaie, R, et al. Evaluation of protective effect of recombinant dense granule antigens GRA2 and GRA6 formulated in monophosphoryl lipid A (MPL) adjuvant against *Toxoplasma* chronic infection in mice. *Vaccine* 2007; 25: 4301-11.
65. Zhou H, Gu Q, Zhao Q, Zhang J, Cong H, Li Y, et al. *Toxoplasma gondii*: expression and characterization of a recombinant protein containing SAG1 and GRA2 in *Pichia pastoris*. *Parasitol Res* 2007; 100: 829-35.
66. Döşkaya M, Kalantari-Dehaghi M, Walsh CM, Hiszyczyńska-Sawicka E, Davies DH, et al. GRA1 protein vaccine confers better immune response compared to codon-optimized GRA1 DNA vaccine. *Vaccine* 2007; 25: 1824-37.
67. Wang HL, Liu Q, Liu K, Zhong W, Gao S, Jiang L, An N. Immune response induced by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing ROP2 gene of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Int* 2007; 56: 263-8.
68. Cuppari AF, Sanchez V, Ledesma B, Frank FM, Goldman A, Angel SO, et al. *Toxoplasma gondii* protease inhibitor-1 (TgPI-1) is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis. *Vaccine* 2008; 26: 5040-5.
69. Igarashi M, Kano F, Tamekuni K, Machado RZ, Navarro IT, Vidotto O, et al. *Toxoplasma gondii*: evaluation of an intranasal vaccine using recombinant proteins against brain cyst formation in BALB/c mice. *Exp Parasitol* 2008; 118: 386-92.
70. Gatkowska J, Gasior A, Kur J, Długowska H. *Toxoplasma gondii*: chimeric Dr fimbriae as a recombinant vaccine against toxoplasmosis. *Exp Parasitol* 2008; 118: 266-70.
71. Dziadek B, Gatkowska J, Brzostek A, Dziadek J, Dzitko K, Długowska H. *Toxoplasma gondii*: the immunogenic and protective efficacy of recombinant ROP2 and ROP4 rhoptry proteins in murine experimental toxoplasmosis. *Exp Parasitol* 2009; 123: 81-9.
72. Fang R, Feng H, Nie H, Wang L, Tu P, Song Q, et al. Construction and immunogenicity of pseudotype baculovirus expressing *Toxoplasma gondii* SAG1 protein in BALB/c mice model. *Vaccine* 2010; 28: 1803-7.
73. Machado A, Caetano B, Barbosa R, Salgado AP, Rabelo R, Garcia, C, et al. Prime and boost immunization with influenza and adenovirus encoding the *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) induces strong protective immunity. *Vaccine* 2010; 28: 3247-56.
74. Rashid I, Hedli D, Moire N, Pierre J, Debierre-Grockiego, F, Dimier-Poisson I, et al. Immunological responses induced by a DNA vaccine expressing RON4 and by immunogenic recombinant protein RON4 failed to protect mice against chronic toxoplasmosis. *Vaccine* 2011; 29: 8838-46.
75. Sánchez VR, Pitkowski MN, Fernández Cuppari AV, Rodríguez FM, Fenoy IM, Frank FM, et al. Combination of CpG-oligodeoxynucleotides with recombinant ROP2 or GRA4 proteins induces protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Exp Parasitol* 2011; 128: 448-53.
76. Dziadek B, Gatkowska J, Brzostek A, Dziadek J, Dzitko K, Grzybowski M, et al. Evaluation of three recombinant multi-antigenic vaccines composed of surface and secretory antigens of *Toxoplasma gondii* in murine models of experimental toxoplasmosis. *Vaccine* 2011; 29: 821-30.
77. Wang Y, Wang M, Wang G, Pang A, Fu B, Yin H, et al. Increased survival time in mice vaccinated with a branched lysine multiple antigenic peptide containing B- and T-cell epitopes from *T. gondii* antigens. *Vaccine* 2011; 29: 8619-23.
78. Dziadek B, Gatkowska J, Grzybowski M, Dziadek J, Dzitko K, Długowska H. *Toxoplasma gondii*: the vaccine potential of three trivalent antigen-cocktails composed of recombinant ROP2, ROP4, GRA4 and SAG1 proteins against chronic toxoplasmosis in BALB/c mice. *Exp Parasitol* 2012; 131: 133-8.
79. Del L, Yácono M, Farran I, Becher ML, Sander V, Sánchez VR, Martin V, et al. A chloroplast-derived *Toxoplasma gondii* GRA4 antigen used as an oral vaccine protects against toxoplasmosis in mice. *Plant Biotechnol J* 2012; 10: 1136-44.
80. Min J, Qu D, Li C, Song X, Zhao Q, Li XA, et al. Enhancement of protective immune responses induced by *Toxoplasma gondii* dense granule antigen 7 (GRA7) against toxoplasmosis in mice using a prime-boost vaccination strategy. *Vaccine* 2012; 30: 5631-6.
81. Zheng B, Lu S, Tong Q, Kong Q, Lou D. The virulence-related rhoptry protein 5 (ROP5) of *Toxoplasma gondii* is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis in mice. *Vaccine* 2013; 31: 4578-84.
82. Qu D, Han J, Du A. Enhancement of protective immune response to recombinant *Toxoplasma gondii* ROP18 antigen by ginsenoside Re. *Exp Parasitol* 2013; 135: 234-9.
83. Yu Q, Huang X, Gong P, Zhang Q, Li J, Zhang G, et al. Protective immunity induced by a recombinant BCG vaccine encoding the cyclophilin gene of *Toxoplasma gondii*. *Vaccine* 2013; 31: 6065-71.
84. Wang HL, Li YQ, Yin LT, Meng XL, Guo M, Zhang JH, et al. *Toxoplasma gondii* Protein Disulfide Isomerase (TgPDI) is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis. *PLoS One* 2013; 8: e70884.
85. Yin LT, Hao HX, Wang HL, Zhang JH, Meng XL, Yin GR. Intranasal immunisation with recombinant *Toxoplasma gondii* actin partly protects mice against Toxoplasmosis. *PLoS One* 2013; 8: e82765.
86. Chuang SC, Ko JC, Chen CP, Du JT, Yang CD. Induction of long-lasting protective immunity against *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice by recombinant surface antigen 1 protein encapsulated in poly (lactide-co-glycolide) microparticles. *Parasit Vectors* 2013; 6: 34.
87. Chuang SC, Ko JC, Chen CP, Du JT, Yang CD. Encapsulation of chimeric protein rSAG1/2 into poly(lactide-co-glycolide) microparticles induces long-term protective immunity against *Toxoplasma gondii* in mice. *Exp Parasitol* 2013; 134: 430-7.
88. Mendes ÉA, Fonseca FG, Casério BM, Colina JP, Gazzinelli RT, Caetano BC. Recombinant vaccines against *T. gondii*: comparison between homologous and heterologous vaccination protocols using two viral vectors expressing SAG1. *PLoS One* 2013; 8: e63201.
89. Wang HL, Pang M, Yin LT, Zhang JH, Meng XL, Yu BF, et al. Intranasal immunisation of the recombinant *Toxoplasma gondii* receptor for activated C kinase 1 partly protects mice against *T. gondii* infection. *Acta Trop* 2014; 137: 58-66.
90. Wang HL, Zhang TE, Yin LT, Pang M, Guan L, Liu H, et al. Partial protective effect of intranasal immunization with recombinant *Toxoplasma gondii* Rhoptry Protein 17 against toxoplasmosis in mice. *PLoS One* 2014; 9: e108377.
91. Chuang SC, Yang CD. Sustained release of recombinant surface antigen 2 (rSAG2) from poly(lactide-co-glycolide) microparticles extends protective cell-mediated immunity against *Toxoplasma gondii* in mice. *Parasitology* 2014; 140: 1-10.
92. Tanaka S, Kuroda Y, Ihara F, Nishimura M, Hiasa J, Kojima N, et al. Vaccination with profilin encapsulated in oligomannose-coated liposomes induces significant protective immunity against *Toxoplasma gondii*. *Vaccine* 2014; 32: 1781-5.
93. Sun X, Mei M, Zhang X, Han F, Jia B, Wei X, et al. The extracellular matrix protein mindin as a novel adjuvant elicits stronger immune responses for rBAG1, rSRS4 and rSRS9 antigens of *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice. *BMC Infect Dis* 2014; 14: 429.
94. Zhang TE, Yin LT, Li RH, Wang HL, Meng XL, Yin GR. Protective immunity induced by peptides of AMA1, RON2 and RON4 containing T- and B-cell epitopes via an intranasal route against toxoplasmosis in mice. *Parasit Vectors* 2015; 8: 15.
95. Wagner A, Schabussova I, Rutkowski B, Peschke R, Kur J, Kundi M, et al. Prime-boost vaccination with *Toxoplasma* lysate antigen, but not with a mixture of recombinant protein antigens, leads to reduction of brain cyst formation in BALB/c mice. *PLoS One* 2015; 10: e0126334.
96. Lu G, Wang L, Zhou A, Han Y, Guo J, Song P, et al. Epitope analysis, expression and protection of SAG5A vaccine against *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop* 2015; 146: 66-72.
97. Xu Y, Zhang NZ, Wang M, Dong H, Feng SY, Guo HC, et al. A long-lasting protective immunity against chronic toxoplasmosis in mice induced by recombinant rhoptry proteins encapsulated in poly (lactide-co-glycolide) microparticles. *Parasitol Res* 2015; 114: 4195-203.
98. Albarracín RM, Becher ML, Farran I, Sander VA, Corigliano MG, Yácono ML, et al. The fusion of *Toxoplasma gondii* SAG1 vaccine candidate to

- Leishmania infantum heat shock protein 83-kDa improves expression levels in tobacco chloroplasts. *Biotechnol J* 2015; 10: 748-59.
99. Sánchez VR, Fenoy IM, Picchio MS, Soto AS, Arcon N, Goldman A, et al. Homologous prime-boost strategy with TgPI-1 improves the immune response and protects highly susceptible mice against chronic *Toxoplasma gondii* infection. *Acta Trop* 2015; 150: 159-65.
 100. Sonaimuthu P, Ching XT, Fong MY, Kalyanasundaram R, Lau YL. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in BALB/c mice vaccinated with *Toxoplasma gondii* Rhopty-1. *Front Microbiol* 2016; 7: 808.
 101. Wang HL, Wen LM, Pei YJ, Wang F, Yin LT, Bai JZ, et al. Recombinant *Toxoplasma gondii* phosphoglycerate mutase 2 confers protective immunity against toxoplasmosis in BALB/c mice. *Parasite* 2016; 23: 12.
 102. Zhang NZ, Xu Y, Wang M, Chen J, Huang SY, Gao Q, et al. Vaccination with *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase 6 and rhopty protein 18 encapsulated in poly (lactide-co-glycolide) microspheres induces long-term protective immunity in mice. *BMC Infect Dis* 2016; 16: 168.
 103. Liu Z, Yuan F, Yang Y, Yin L, Liu Y, Wang Y, et al. Partial protective immunity against toxoplasmosis in mice elicited by recombinant *Toxoplasma gondii* malate dehydrogenase. *Vaccine* 2016; 34: 989-94.
 104. Gedik Y, İz SG, Can H, Döşkaya AD, Gürhan SİD, Gürüz Y, et al. Immunogenic multistage recombinant protein vaccine confers partial protection against experimental toxoplasmosis mimicking natural infection in murine model. *Trials in Vaccinology* 2016; 5: 15-23.
 105. Liu Z, Yin L, Li Y, Yuan F, Zhang X, Ma J, et al. Intranasal immunization with recombinant *Toxoplasma gondii* actin depolymerizing factor confers protective efficacy against toxoplasmosis in mice. *BMC Immunol* 2016; 17: 37.
 106. Tang X, Yin G, Qin M, Tao G, Suo J, Liu X, et al. Transgenic *Eimeria tenella* as a vaccine vehicle: expressing TgSAG1 elicits protective immunity against *Toxoplasma gondii* infections in chickens and mice. *Sci Rep* 2016; 6: 29379.
 107. Ching XT, Fong MY, Lau YL. Evaluation of immunoprotection conferred by the subunit vaccines of GRA2 and GRA5 against acute toxoplasmosis in BALB/c mice. *Front Microbiol* 2016; 7: 609.
 108. Allahyari M, Mohabati R, Amiri S, Rastaghi ARE, Babaie J, Mahdavi M, et al. Synergistic effect of rSAG1 and rGRA2 antigens formulated in PLGA microspheres in eliciting immune protection against *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol* 2016; 170: 236-46.
 109. El Bissati K, Chentoufi AA, Krishack PA, Zhou Y, Woods S, Dubey JP, et al. Adjuvanted multi-epitope vaccines protect HLA-A* 11: 01 transgenic mice against *Toxoplasma gondii*. *JCI Insight* 2016; 1: e85955.
 110. Wang M, Yang XY, Zhang NZ, Zhang DL, Zhu XQ. Evaluation of protective immune responses induced by recombinant TrxLp and ENO2 proteins against *Toxoplasma gondii* infection in BALB/c mice. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 3571962.
 111. Lee DH, Lee SH, Kim AR, Quan FS. Virus-like nanoparticle vaccine confers protection against *Toxoplasma gondii*. *PLoS One* 2016; 11: e0161231.
 112. Fereig RM, Nishikawa Y. Peroxiredoxin 3 promotes IL-12 production from macrophages and partially protects mice against infection with *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Int* 2016; 65: 741-8.
 113. Nabi H, Rashid I, Ahmad N, Durrani A, Akbar H, Islam S, et al. Induction of specific humoral immune response in mice immunized with ROP18 nanospheres from *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* 2017; 116: 359-70.
 114. Czarnewski P, Araújo EC, Oliveira MC, Mineo TW, Silva NM. Recombinant TgHSP70 immunization protects against *Toxoplasma gondii* brain cyst formation by enhancing inducible nitric oxide expression. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7: 142.
 115. Zulpo DL, Igarashi M, Sammi AS, Santos JRD, Sasse JP, Cunha IALD, et al. rROP2 from *Toxoplasma gondii* as a potential vaccine against oocyst shedding in domestic cats. *Rev Bras Parasitol Vet* 2017; 26: 67-73.
 116. Fereig RM, Kuroda Y, Terkawi MA, Mahmoud ME, Nishikawa Y. Immunization with *Toxoplasma gondii* peroxiredoxin 1 induces protective immunity against toxoplasmosis in mice. *PLoS One* 2017; 12: e0176324.
 117. Rashid I, Moiré N, Hérault B, Dimier-Poisson I, Ménélec MN. Enhancement of the protective efficacy of a ROP18 vaccine against chronic toxoplasmosis by nasal route. *Med Microbiol Immunol* 2017; 206: 53-62.
 118. Wang S, Zhang Z, Wang Y, Gadahi JA, Xu L, Yan R, et al. *Toxoplasma gondii* elongation factor 1-alpha (TgEF-1α) is a novel vaccine candidate antigen against toxoplasmosis. *Front Microbiol* 2017; 8: 168.
 119. Zhuo X, Sun H, Wang S, Guo X, Ding H, Yang Y, et al. Ginseng Stem-and-Leaf Saponin (GSLs)-enhanced protective immune responses induced by *Toxoplasma gondii* Heat Shocked Protein 70 (HSP70) against toxoplasmosis in mice. *J Parasitol* 2017; 103: 111-7.
 120. Oledzka G, Bo L, Hiszczynska-Sawicka E, Gelder FB, Kur J, McFarlane RG. *Toxoplasma gondii*: Immunological response of sheep to injections of recombinant SAG1, SAG2, GRA1 proteins coupled to the non-toxic microparticle muramyl dipeptide. *Small Rum Res* 2017; 150: 111-7.
 121. Wang L J, Xiao T, Xu C, Li J, Liu GZ, Yin K, et al. Protective immune response against *Toxoplasma gondii* elicited by a novel yeast-based vaccine with microneme protein 16. *Vaccine* 2018; 36: 3943-8.
 122. Lakhri Z, Moreau A, Hérault B, Di-Tommaso A, Juste M, Moiré N, et al. Targeted delivery of *Toxoplasma gondii* antigens to dendritic cells promote immunogenicity and protective efficiency against toxoplasmosis. *Front Immunol* 2018; 9: 317.
 123. Hajissa K, Zakaria R, Suppian R, Mohamed Z. Immunogenicity of Multiepitope Vaccine Candidate against *Toxoplasma gondii* Infection in BALB/c Mice. *Iran J Parasitol* 2018; 13: 215-24.
 124. Roozbehani M, Falak R, Mohammadi M, Hemphill A, Razmjou E, Reza Meamar A, et al. Characterization of a multi-epitope peptide with selective MHC-binding capabilities encapsulated in PLGA nanoparticles as a novel vaccine candidate against *Toxoplasma gondii* infection. *Vaccine* 2018; 36: 6124-32.
 125. Lee SH, Kang HJ, Lee DH, Kang SM, Quan FS. Virus-like particle vaccines expressing *Toxoplasma gondii* rhopty protein 18 and microneme protein 8 provide enhanced protection. *Vaccine* 2018; 36: 5692-700.
 126. Kang HJ, Lee SH, Chu KB, Lee DH, Quan FS. Virus-like particles expressing *Toxoplasma gondii* rhopty protein 18 induces better protection than rhopty protein 4 against *T. gondii* infection. *Korean J Parasitol* 2018; 56: 429-35.
 127. Picchio MS, Sánchez VR, Arcon N, Soto AS, Sibilía MP, Aldirico MDLA, et al. Vaccine potential of antigen cocktails composed of recombinant *Toxoplasma gondii* TgPI-1, ROP2 and GRA4 proteins against chronic toxoplasmosis in C3H mice. *Exp Parasitol* 2018; 185: 62-70.
 128. Naeem H, Sana M, Islam S, Khan M, Riaz F, Zafar Z, et al. Induction of Th1 type-oriented humoral response through intranasal immunization of mice with SAG1-*Toxoplasma gondii* polymeric nanospheres. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018; 46(Suppl 2): 1025-34.
 129. Pagheh AS, Sarvi S, Gholami S, Asgarian-Omran H, Valadan R, Hassannia H, et al. Protective efficacy induced by DNA prime and recombinant protein boost vaccination with *Toxoplasma gondii* GRA14 in mice. *Microb Pathog* 2019; 134: 103601.
 130. Wu M, An R, Chen Y, Chen T, Wen H, Yan Q, et al. Vaccination with recombinant *Toxoplasma gondii* CDPK3 induces protective immunity against experimental toxoplasmosis. *Acta Trop* 2019; 199: 105148.
 131. Huang SY, Chen K, Wang JL, Yang B, Zhu XQ. Evaluation of protective immunity induced by recombinant calcium-dependent protein kinase 1 (TgCDPK1) protein against acute toxoplasmosis in mice. *Microb Pathog* 2019; 133: 103560.
 132. Liu K, Wen H, Cai H, Wu M, An R, Chu D, et al. Protective effect against toxoplasmosis in BALB/c mice vaccinated with *Toxoplasma gondii* macrophage migration inhibitory factor. *Front Microbiol* 2019; 10: 813.
 133. Lee SH, Kang HJ, Lee DH, Quan FS. Protective immunity induced by incorporating multiple antigenic proteins of *Toxoplasma gondii* into influenza virus-like particles. *Front Immunol* 2019; 9: 3073.
 134. Kang HJ, Lee SH, Kim MJ, Chu KB, Lee DH, Chopra M, et al. Influenza virus-like particles presenting both *Toxoplasma gondii* ROP4 and ROP13

- enhance protection against *T. gondii* Infection. *Pharmaceutics* 2019; 11: 342.
135. Kang HJ, Chu KB, Lee SH, Kim MJ, Park H, Jin H, et al. Virus-like Particle Vaccine Containing *Toxoplasma gondii* Rhopty Protein 13 Induces Protection against *T. gondii* ME49 Infection in Mice. *Korean J Parasitol* 2019; 57: 543-7.
136. Kang HJ, Chu KB, Lee SH, Kim MJ, Park H, Jin H, et al. *Toxoplasma gondii* virus-like particle vaccination alleviates inflammatory response in the brain upon *T. gondii* infection. *Parasite Immunol* 2020; 42: e12716.
137. Choi WH, Park JS. Immunogenicity and Protective Effect of a Virus-Like Particle Containing the SAG1 Antigen of *Toxoplasma gondii* as a Potential Vaccine Candidate for Toxoplasmosis. *Biomedicines* 2020; 8: 91.
138. Kim MJ, Lee SH, Kang HJ, Chu KB, Park H, Jin H, et al. Virus-like particle vaccine displaying *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen 1 induces protection against *T. gondii* ME49 infection in mice. *Microb Pathog* 2020; 142: 104090.
139. Li ZY, Guo HT, Calderón-Mantilla G, He JJ, Wang JL, Bonev BB, et al. Immunostimulatory efficacy and protective potential of putative TgERK7 protein in mice experimentally infected by *Toxoplasma gondii*. *Int J Med Microbiol* 2020; 310: 151432.
140. Atalay Şahar E, Can H, İz S, Döşkaya A, Kalantari-Dehaghi M, Deveci R, et al. Development of a hexavalent recombinant protein vaccine adjuvanted with Montanide ISA 50V and determination of its protective efficacy against acute toxoplasmosis. *BMC Infect Dis* 2020; 20: 493.
141. Kang HJ, Chu KB, Kim MJ, Lee S H, Park H, Jin H, et al. Protective immunity induced by CpG ODN-adjuvanted virus-like particles containing *Toxoplasma gondii* proteins. *Parasite Immunol* 2021; 43: e12799.
142. Dodangeh S, Fasihi-Ramandi M, Daryani A, Valadan R, Asgarian-Omran H, Hosseinienejad Z, et al. Protective efficacy by a novel multi-epitope vaccine, including MIC3, ROP8, and SAG1, against acute *Toxoplasma gondii* infection in BALB/c mice. *Microb Pathog* 2021; 153: 104764.
143. Arcon N, Picchio MS, Fenoy IM, Moretta RE, Soto AS, Sibilio MDP, et al. Synergistic effect of GRA7 and profilin proteins in vaccination against chronic *Toxoplasma gondii* infection. *Vaccine* 2021; 39: 933-42.
144. Yu Z, Lu Y, Liu Z, Aleem MT, Liu J, Luo J, et al. Recombinant *Toxoplasma gondii* ribosomal protein P2 modulates the functions of murine macrophages *in vitro* and provides immunity against acute toxoplasmosis *in vivo*. *Vaccines (Basel)* 2021; 9: 357.

Malacological Epidemiology of *Opisthorchis* spp. and Sewage Viral Epidemiology of SARS-CoV-2: Interrelationship in Big City

Opisthorchis spp. Malakolojik Epidemiyoloji ve SARS-CoV-2'nin Kanalizasyon Viral Epidemiyolojisi: Büyük Şehirde Karşılıklı İlişki

Pathum Sookaromdee¹, Viroj Wiwanitkit²

¹Private Academic Consultant, Bangkok, Thailand

²Department of Community Medicine, Dr DY Patil Vidyapeeth, Pune, India

Cite this article as: Sookaromdee P, Wiwanitkit V. Malacological Epidemiology of *Opisthorchis* spp. and Sewage Viral Epidemiology of SARS-CoV-2: Interrelationship in Big City. Türkiye Parazitol Derg 2022;46(4):358-9.

Dear Editor,

Environmental epidemiology surveillance is an important tool in environmental medicine and public health. Many infections disease are associated with contamination in environmental samples and the data from environmental surveillance are useful for public health planning for management of the problem (1). In clinical parasitology, contamination of parasite egg and metacercariae are possible and it might be related to disease outbreak.

In tropical countries, contamination in big city is also possible and the problem is usually neglected.

Here, the authors discuss on the situation from Indochina where opisthorchiasis is very common (2). For surveillance, environmental monitoring of metacercariae in intermediate host is regularly done. Malacological epidemiology of *Opisthorchis* spp. is an important public health parameter. Since 2020, the new emerging severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2) infection also attack Indochina and this area is the second area after China that disease has existed since early January 2020 (3). Until present, the disease is still not successfully controlled. Disease surveillance is regularly done. Of several surveillance system, sewage viral epidemiology of SARS-CoV-2 is also important public health surveillance in this area (4).

In the same area that both parasitic disease and Coronavirus disease-2019 (COVID-19) are common,

little data on environmental epidemiology are available. Here, the authors reappraise on available data from an area in Indochina that COVID-19 and opisthorchiasis are common problems.

The authors reanalyzed the most recent public available data in 2021 on malacological epidemiology of opisthorchis spp. and sewage viral epidemiology of SARS-CoV-2 in a city area (GPS location 13.76779525743989, 100.6687726131797) in Indochina (4,5). Based on primary data from the environmental metagenomics studies (4,5), primary data on location related prevalence of both *Opisthorchis* spp. Contamination in snails and SARS-CoV-2 contamination in waste water are collected and used for construct of overlapping GIS map as shown in Figure 1.

Regarding relationship, although there is no statistical association, there is a trend of co-occurrence of contamination of both *Opisthorchis* spp. in snails and SARS-CoV-2 in sewage samples in the same area. Since poor sanitation is the rooted cause of contamination of either parasite sor virus into environmental samples, hence, the environmental contamination detection should give the result in the same way. Detection of contamination by an infective agent might be an indirect clue for requirement for sanitation improvement for prevention for any other pathogens as well.

Keywords: Opisthorchis, SARS-CoV-2, epidemiology, environment



Received/Geliş Tarihi: 05.11.2021 Accepted/Kabul Tarihi: 28.09.2022

Address for Correspondence/Yazar Adresi: Pathum Sookaromdee, Private Academic Consultant, Bangkok, Thailand
Phone/Tel: +2828828222 E-mail/E-Posta: pathumsook@gmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0002-8859-5322

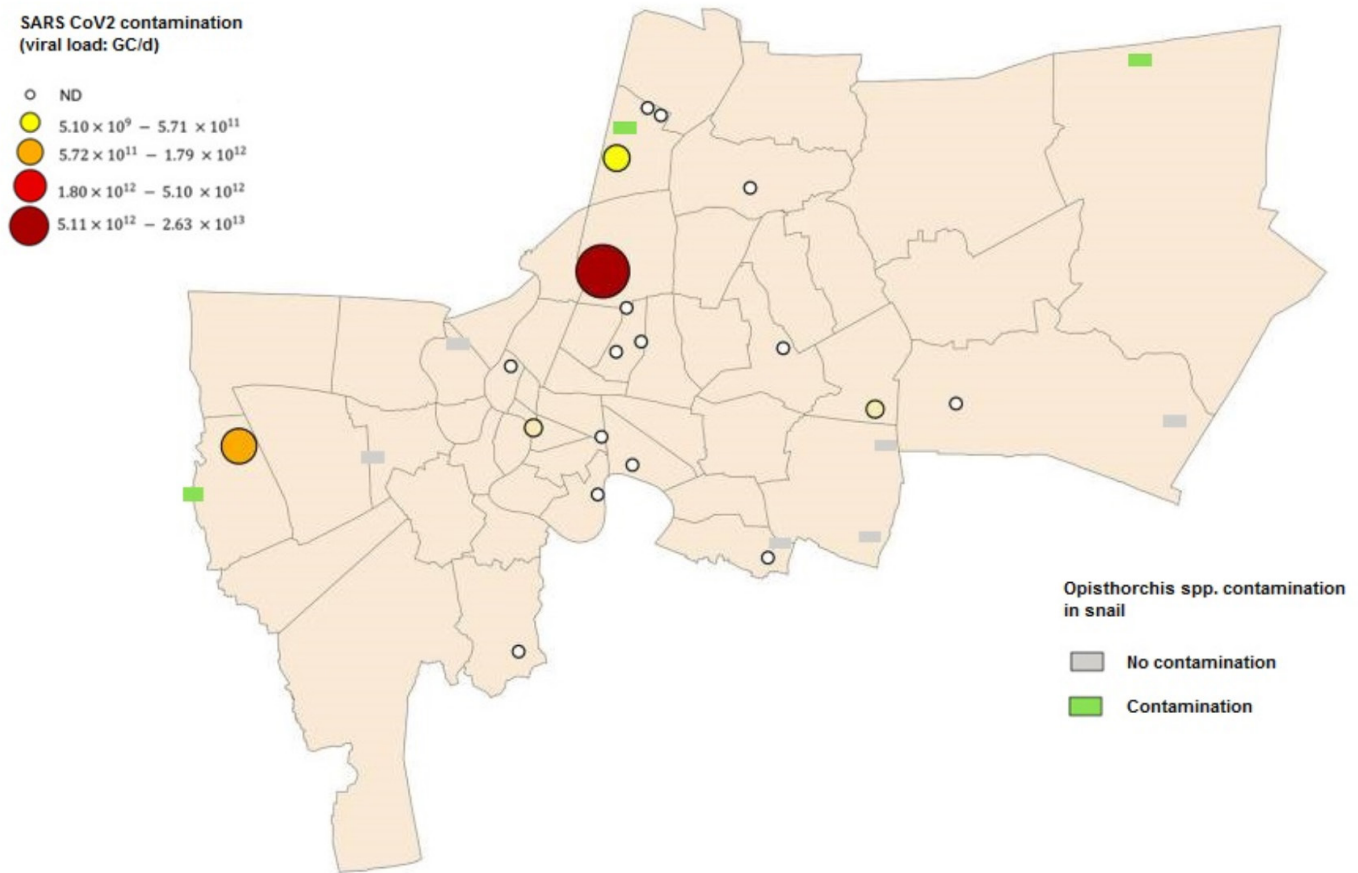


Figure 1. GIS map showing malacological epidemiology of *Opisthorchis* spp. and sewage viral epidemiology of SARS-CoV-2
SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2

Anahtar Kelimeler: *Opisthorchis*, SARS-CoV-2, epidemiyoloji, çevre

***Ethics**

Peer-review: Internally peer-reviewed.

*** Authorship Contributions**

Surgical and Medical Practices: P.S., V.W., Concept: P.S., V.W., Design: P.S., V.W., Data Collection or Processing: P.S., V.W., Analysis or Interpretation: P.S., V.W., Literature Search: P.S., V.W., Writing: P.S., V.W.

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

1. Sookaromdee P, Wiwanitkit V. Considerations on Laboratory Quality Management for Environmental Metagenomics Testing in Clinical Laboratory. Clin Lab 2021; 67.
2. Sripa B, Leonardo L, Hong SJ, Ito A, Brattig NW. Status and perspective of asian neglected tropical diseases. Acta Trop 2021; 225: 106212.
3. Hsia W. Emerging new coronavirus infection in Wuhan, China: situation in early 2020. Case Study Case Rep 2020; 10: 8-9.
4. Rachprakhon P, Purivirojkul W. Very low prevalence of *Opisthorchis viverrini* s.l. cercariae in *Bithynia siamensis siamensis* snails from the canal network system in the Bangkok Metropolitan Region, Thailand. Parasite 2021; 28: 2.
5. Sangsanont J, Rattanakul S, Kongprajug A, Chyerochana N, Sresung M, Sriporatana N, et al. SARS-CoV-2 RNA surveillance in large to small centralized wastewater treatment plants preceding the third COVID-19 resurgence in Bangkok, Thailand. Sci Total Environ. 2021; 809: 151169.

Golgi-to-endosome Protein Pathway, Monkeypox and Malaria: Correspondence

Golgi-endozom Proteini Patika, Maymun Hastalığı ve Sıtma: Uygunluk

✉ Rujittika Mungmunpantipantip¹, ✉ Viroj Wiwanitkit²

¹Consultant Center, Private Academic Consultant, Bangkok, Thailand

²Department of Community Medicine, Dr DY Patil Vidyapeeth, Pune, India

Cite this article as: Mungmunpantipantip R, Wiwanitki V. Golgi-to-endosome Protein Pathway, Monkeypox and Malaria: Correspondence. Türkiye Parazit Derg 2022;46(4):360-1.

Dear Editor,

Novel zoonotic infections are a key source of concern in today's clinical medicine (1). Monkeypox has spread throughout Europe, creating a significant public health risk (2). Monkeypox is a rare pox infection that has returned, most likely as a result of zoonosis (1). Monkeypox has spread over Europe, America and Asia, creating a significant public health risk (2). Monkeypox is an uncommon type of pox that has resurfaced, most likely due to zoonosis. The possibility of human-to-human transmission is being considered. The medical community is concerned as the number of reported cases in various countries climbs, and careful preparation to correspond the possible big outbreak is required. We must move swiftly and rapidly in order to conduct a full inquiry and put essential processes in place (2).

The western section of Africa, such as Nigeria, is the traditional endemic location for monkeypox infection. Malaria is a significant local public health issue in the same region. In this area, however, there has never been a report of co-infection or a concurrent

outbreak. The authors analyse the pathophysiological pathways of both monkeypox and malaria using bioinformatic pathophysiological pathway analysis. The common path is investigated. This is the usual technique for understanding the pathophysiological process of virus infection that has been employed in prior pathophysiological pathway analysis studies (3). The Golgi-to-endosome protein route was identified as a common pathway in both illnesses based on pathway analysis. Golgi-associated retrograde protein complex genes are involved in the double-membrane wrapping of monkeypox virus required for extracellular virus production in monkeypox, implicating the host endosomal trafficking pathway in orthopoxvirus infection (4). In asexual blood stage parasites, the hypothesised Golgi-to-endosome protein sorting pathway plays a role (5). Figure 1 is a diagram that depicts a common pathway. The current findings suggest that *Plasmodium* spp. and monkeypox share a natural competitive pathophysiological pathway, which could explain why there is no overlap or co-occurrence of the two important local infectious illnesses in endemic African countries.



Received/Geliş Tarihi: 11.06.2022 Accepted/Kabul Tarihi: 28.09.2022

Address for Correspondence/Yazar Adresi: Rujittika Mungmunpantipantip, Consultant Center, Private Academic Consultant, Bangkok, Thailand

Phone/Tel: +68328328822 E-mail/E-Posta: rujittika@gmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0003-0078-7897

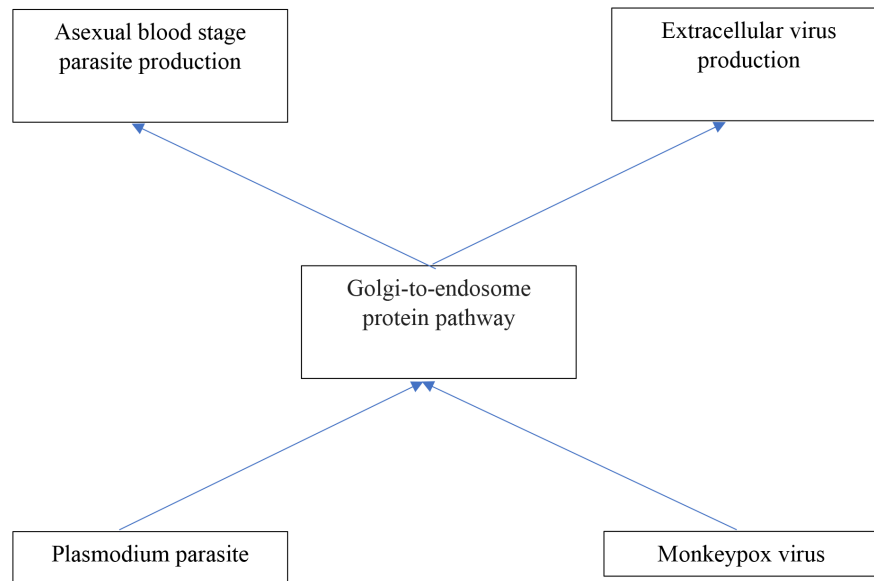


Figure 1. Common pathway analysis at Golgi-to-endosome protein pathway between malaria and monkeypox

Keywords: Golgi-to-endosome protein, pathway, monkeypox, malaria

Anahtar Kelimeler: Golgi-endozom proteini, patika, maymun hastalığı, sıtma

***Ethics**

Peer-review: Internally peer-reviewed.

*** Authorship Contributions**

Surgical and Medical Practices: R.M., V.W., Concept: R.M., V.W., Design: R.M., V.W., Data Collection or Processing: R.M., V.W., Analysis or Interpretation: R.M., V.W., Literature Search: R.M., V.W., Writing: R.M., V.W.

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

1. Wiwanitkit S, Wiwanitkit V. Atypical zoonotic pox: Acute merging illness that can be easily forgotten. *J Acute Dis* 2018; 7: 88-89.
2. Mungmunpantipantip V, Wiwanitkit V. Re-emerging monkeypox: an old disease to be monitored. *BMJ Rapid Response* Accessible online at: <https://www.bmj.com/content/377/bmj.o1239/rr-1> Accessed on: 21 May 2022
3. Yasri S, Wiwanitkit V. Usefulness of ginseng in management of dengue: a bioinformatics pathway interrelationship analysis. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2022; 14: 114-7.
4. Realegeno S, Puschnik AS, Kumar A, Goldsmith C, Burgado J, Sambhara S, et al. Monkeypox Virus Host Factor Screen Using Haploid Cells Identifies Essential Role of GARP Complex in Extracellular Virus Formation. *J Virol* 2017; 91: e00011-17.
5. Krai P, Dalal S, Klemba M. Evidence for a Golgi-to-endosome protein sorting pathway in *Plasmodium falciparum*. *PLoS One* 2014; 9: e89771.

Abdollah Rafiei
Abdurrahman Ekici
Afshin Barazesh
Ahmet Duran Ataş
Ahmet Gödekmerdan
Ahmet Onur Girişgin
Ahmet Özbilgin
Ali Ahmet Kilimcioğlu
Ali Aydoğdu
Ali İhsan Diker
Alparslan Yıldırım
Armağan Erdem Ütük
Aysu Değirmenci Döşkaya
Ayşe Caner
Ayşe Gül Ünver
Ayşegül Taylan Özkan
Banuçiçek Yücesan
Bekir Oğuz
Berna Hamamcı
Canan Eryıldız
Cengiz İkten
Cenk Soner Bölükbaş
Cihangir Akdemir
Derya Dirim Erdoğan
Derya Yapar
Emrah Erdoğan
Emre Öz
Erdoğan Malatyalı
Erol Ayaz

Esin Güven
Esmâ Kozan
Eylem Akdur Öztürk
Gönül Dinç
Gönül Tanır
Gözde Güreli
Gülay Aral Akarsu
Gülay Vural
Gülnaz Çulha
Hamza Avcıoğlu
Haroon Ahmed
Harun Kaya Kesik
Hatice Ertabaklar
Hatice Öge
Hilal Bedir
Hüseyin Can
İpek Mumcuoğlu
İsmail Davarcı
Kader Yıldız
Kirami Ölgün
Kor Yereli
Kosta Y Mumcuoglu
Mehmet Aykur
Mehmet Karakuş
Mehmet Salih Gürel
Metin Pekağırbaş
Muhammet Karakavuk
Mükremin Özkan Arslan
Münir Aktaş

Mustafa Açıcı
Nermin Şakru
Nihal Doğan
Oktay Alver
Onur Girişgin
Özgür Kurt
Özlem Miman
Özlem Uluslan Bağcı
Samed Koç
Sami Gökpinar
Selma Usluca
Sema Ertuğ
Semih Öge
Semra Özçelik
Seray Töz
Serdar Düşen
Serpil Değerli
Sevgi Ergin
Soykan Özkoç
Şinasi Umur
Tonay İnceboz
Turabi Güneş
Ufuk Mert
Ülfet Çetinkaya
Ülkü Karaman
Yeliz Çetinkol
Yunus Emre Beyhan
Yusuf Tutar
Zuhal Önder

Abdullah Küçükyavaşlıoğlu	207	Derya Dirim Erdoğan	163
Abdurrahman Ekici	39, 45, 108, 276	Derya Korkmaz	224
Adnan Yüksel Gürüz	253, 342	Devrim Akıncı	195
Ahmed Galip Halidi	108, 276	Dilek Yılmaz Çiftdoğan	189
Ahmet Bülent Doğrul	195	Dipak Ranjan Mandal	213
Ahmet Ergin Çapar	189	Duran Ali Karataş	327
Ahmet Hakan Ünlü	108	Durmuş Ali Çetin	145
Ahmet Mermer	60	Duygu Beder	1
Ahmet Onur Girişgin	322	Eda Karadağ Öncel	189
Ahmet Özbilgin	7, 86, 97, 249	Eda Sivcan	133
Ahmet Uzel	288	Elaheh Biranvand	91
Ahmet Yıldırım	249	Emek Güldoğan	140
Ahu Kara Aksay	189	Emine Kurcan	327
Ali Asan	339	Emrah Erdoğan	133
Ali Erkan Yenigül	145	Emre Ünal	195
Ali Gümüş	339	Enis Fuat Tüfekci	288
Alican Bilden	119	Erdal Polat	163
Alparslan Yıldırım	180, 312	Ergun Mete	271
Alper Şener	78	Ersan Ersin Demirel	301
Amidou Samie	14	Ertay Gümüş	167
Aslan Yürekli	334	Esra Gürbüz	108, 276
Aslıhan Şahin	189	Fatih Çakır	119
Ayhan Akbulut	50	Fatih Mehmet Şimşek	307
Ayşe Sağmak Tartar	50	Fatma Büyükkatran	327
Ayşegül Aksoy Gökmen	235	Fatma Esenkaya Taşbent	1
Ayşegül Elvan Tüz	189	Fatma Kılınç	246
Aysu Değirmenci Döşkaya	253, 342	Figen Çelik	150
Ayten Gündüz	301	Fikriye Milletli Sezgi	219
Aytül Gül	253, 342	Filiz Demirel	184
Bahadır Feyzioğlu	1	Fulya Bayındır Bilman	235
Bayram Pektaş	235	Funda Şahin	140
Bedia Dinç	184	Gökhan Köylüoğlu	189
Berna Erdal	54	Gülçin Patmano	145
Bilal Olcay Peker	235	Gülhan Ünlü	7
Büşra Çalışır	288	Gülrihan Üstündağ	189
Carol Gilchrist	14	Gülşah Evyapan	327
Cem Aslan	172	Hakan Kavur	327
Cemal Ün	253, 342	Halil Özkurt	327
Ceren Gül	253, 342	Hasan Çantay	201
Cüret Alev	140	Hasan Yılmaz	45, 108, 276
Çetin Kılınç	288	Hilal Bedir	129
Cihan Yüksel	78	Hülya Albayrak	54
Çisil Özel	78	Hüseyin Bilgin Bilgiç	28
Davut Alptekin	327	Hüseyin Can	253, 342
Derya Alabaz	246	Hüseyin Hakan Er	235

Hüsne Özen.....	172	Mübeccel Atelge	180
Ivy Kundu	213	Nafiye Koç.....	75
İbrahim Çavuş	97, 249	Naim Sağlam	228
İbrahim Cüneyt Balcıoğlu.....	167	Neriman Mor.....	129
İlayda Kaya	172	Neşe Demirtürk.....	224
İnan Karakuş	39	Neşe İnal	114
İpek Baysal.....	195	Nevin Turgay	97
Jasem Saki.....	91	Nezahat Akpolat.....	119
Kadir Oktay	246	Nilgün Aydın	20
Kalenahalli Jagadish Kumar	72	Nimetullah Korkut.....	228
Kemal Gültekin	163	Nurgül Çimenlikaya	322
Krishna kumar H C	72	Nuriz Ödemiş	108
Kutbeddin Demirdağ	50	Nurten Baran.....	235
Kürşat Altay.....	293	Okan Akhan.....	195
Lambok Siahaan.....	102	Orçun Zorbozan	97, 124
Levent Aydın	322	Orkun Tolunay	242
Maksut Şahin	34	Ozan Yaman	133
Mehmet Harman.....	97	Ömer Faruk Şahin	293
Mehmet Hüseyin Metineren	78	Ömer Furkan Dura.....	172
Mehmet Karakuş.....	86	Ömer Serdar Akgül.....	78
Mehmet Özdemir.....	1	Önder Düzlü	312
Mehmet Patmano.....	145	Özlem Özgür Gündeşlioğlu	246
Mehmet Tugay Eren.....	281	Özlem Ulusan Bağcı	235
Mehmet Ünlü	7	Özlem Yöner	281
Melike Yaşar Duman	288	Pathum Sookaromdee.....	82, 358
Merhamet Ölçen	276	Petek Konya.....	224
Mert Döşkaya	253, 342	Pınar Solmaz Hasdemir	167
Merve Kılıç Çil.....	242	Prashanth Satya Narayana.....	72
Merve Sefa Sayar.....	339	Rahmi Yıldız	34, 108
Merve Yürük.....	133	Renay Ngobenı	14
Metin Çil.....	242	Reza Arjmand.....	91
Metin Doğan.....	1	Rujittika Mungmunpantipantip	84, 360
Metin Pekağırbaş	28	Sadık Akgün.....	140
Mevlüt Yılmaz	219	Sami Şimşek	150
Milad Torkamarian Afshar.....	34	Samiye Yabanoğlu Çiftçi	195
Muhammed Nalçacı	86	Sare İlknur Yavaşoğlu.....	307
Muhammet Karakavuk	253, 342	Sedef Erkunt Alak	253, 342
Mükremın Özkan Arslan	20, 129	Sefer Özer Babat	163
Murat Fırat	301	Selahattin Aydemir	34, 108, 276
Mustafa Karatepe.....	180	Selçuk Kaya.....	235
Mustafa Koyun.....	228	Selin Hacılarlıoğlu	28
Mustafa Onur Öztan.....	189	Selin Taşar	189
Mustafa Turhan Şahin	249	Seray Töz.....	86
Mutalip Çiçek	108, 119	Serçin Özlem Çalışkan	172
Muttalip Çiçek.....	219	Serdar Düşen	271

Serkan Bakırcı	28
Serpil Değerli	281
Serpil Nalbantoğlu	75
Serra Örsten	195
Sevil Alkan Çeviker	78
Sıla Çetik	75
Sibel Ergüven	75, 114
Sinan Karakuş	108
Songül Uzgeliir	242
Suna Aslı Zengin	322
Süha Kenan Arserim	60
Sümeyye Aygün	312
Sümeyye Kalkan	327
Şafak Özer Balin	50
Şehriban Yürektürk	108
Taha Ayyıldız	219
Taylan Önder	78
Tuba Elaltunkara	228
Tufan Gümüş	145
Tuğba Karakavuk	253, 342
Tuğba Sağlam	271
Tuğçe Ünalın Altıntop	75, 114
Tuncay Çelik	140
Turgut Anuk	201

Tülay Aksoy	249
Tülin Karagenç	28
Türkmen Çiftçi	195
Ufuk Erol	293
Uğur Uslu	207
Umur Anıl Pehlivan	246
Umut Yılmaz	7
Ülkü Karaman	271
Ümit Çelik	242
Ümmühan Çay	246
Varol Tunalı	97
Vildan Turan Faraşat	167
Viroj Wiwanitkit	82, 84, 358, 360
Yakut Akyön	75, 195
Yakut Akyön Yılmaz	114
Yener Özel	7
Yeter Taylan Bozkurt	45
Yıldız Ekemen Keleş	189
Yusuf Özbek	60, 86
Zati Vatansever	20
Zehra Çelik	327
Zeynep Taş Cengiz	34, 39, 45

<i>A. phagocytophilum</i> -like 1 ve 2/ <i>A. phagocytophilum</i> -like 1 and 2	293
<i>A. phagocytophilum</i> / <i>A. Phagocytophilum</i>	293
Afyonkarahisar/Afyonkarahisar.....	224
Ağrı ili/Ağrı.....	34
Akne vulgaris/Acne vulgaris	54
Albendazol/Albendazole	72, 78
Allele özgü primer/Allele-specific primer	307
Annelida/Annelida	228
<i>Anopheles sacharovi</i> / <i>Anopheles sacharovi</i>	312
<i>Anopheles superpictus</i> / <i>Anopheles superpictus</i>	307
Anti- <i>Echinococcus granulosus</i> /Anti- <i>Echinococcus granulosus</i>	129
Antijen/Antigen	150
Antikor/Antibody.....	235
Asetilkolinesteraz/Acetylcholinesterase.....	307
Aydın Dağları/Aydın Mountains	60
<i>Babesia</i> / <i>Babesia</i>	20
Bağırsak parazitleri/Intestinal parasites	14, 119, 124
Banyo/Bath.....	201
Batı Anadolu/Western Anatolia	60
Bingöl/Bingöl.....	228
Birinci basamak sağlık hizmetleri/Primary health care...	102
Biyoteknoloji/Biotechnology.....	342
<i>Blastocystis</i> sp./ <i>Blastocystis</i> sp.	114
<i>Blastocystis</i> / <i>Blastocystis</i>	184
Blefarit/Blepharitis	301
Brain heart infusion/Brain heart infusion	7
Bronkoalveolar lavaj/Bronchoalveolar lavage.....	276
cDNA/cDNA	86
<i>Channa punctata</i> / <i>Channa punctata</i>	213
COVID-19 pandemisi/COVID-19 pandemic	50
COVID-19/COVID-19.....	82, 84, 124, 339
<i>Cryptosporidium</i> spp./ <i>Cryptosporidium</i> spp.	14, 271, 281
<i>Cyclospora cayetanensis</i> / <i>Cyclospora cayetanensis</i>	271
Çay ağacı yağı/Tea tree oil.....	334
Çevre/Environment	359
Çocuk/Child.....	39, 189, 242
<i>Demodex</i> spp./ <i>Demodex</i> spp.	54
<i>Demodex</i> / <i>Demodex</i>	219, 301
Denizli/Denizli	271
<i>Dientamoeba fragilis</i> / <i>Dientamoeba fragilis</i>	114, 184
Dihidroartemisinin-Piperaquine/Dihydroartemisinin-Piperaquine.....	102
DNA aşılı/DNA vaccines.....	253
<i>Echinococcus granulosus</i> /	
<i>Echinococcus granulosus</i>	140, 145, 201
Eğitim düzeyi/Education level.....	201
Eğitim/Education	327
Ekinokokkoz/Echinococcosis	78

Ekonomik kayıp/Economic loss	207
Ekspresyon analizleri/Expression analysis.....	312
Eksternal oftalmomiyaz/External ophthalmomyiasis	163
ELFA/ELFA	1
ELISA endoskopi/ELISA endoscopy.....	281
ELISA/ELISA	180
Enflamatuvar belirteçler/Inflammatory marker	195
<i>Entamoeba histolytica</i> / <i>Entamoeba histolytica</i>	281
Entomopatojenik mantar/Entomopathogenic fungus	322
Entübasyon/Intubation	75
Epidemiyoloji/Epidemiology	224, 359
<i>Eustrongylides</i> sp./ <i>Eustrongylides</i> sp.	213
Fauna/Fauna	228
Filarezis/Filaria	82
Flora/Flora.....	301
Gebe/Pregnant	1, 235
<i>Giardia intestinalis</i> / <i>Giardia intestinalis</i>	281
<i>Giardia</i> spp./ <i>Giardia</i> spp.....	14, 271
Golgi-endozom proteini/Golgi-to-endosome protein	361
Göçmen/Refugee.....	184
Halk sağlığı/Public health.....	271
Helmintler/Helminths.....	34
Hemorajik ateş virüsü/Hemorrhagic fever virüs.....	339
Hidatidoz/Hydatidosis	78
Hidatik hastalığı/Hydatid disease.....	189
Hirudinea/Hirudinea	228
IFAT/IFAT	28, 133
IgG/IgG	288
IgM/IgM	288
IHA/IHA	133
İlaç direnci/Drug resistance.....	97
İlaç/Drug.....	150
İmmünizasyon/Immunization	253, 342
İmmünoşüpresif hasta/Immunosuppressive patient	1
İnce iğne aspirasyon sitolojisi/Fine needle aspiration cytology	72
İndirekt hemaglutinasyon testi (IHA)/Indirect hemagglutination assay (IHA).....	140
İnsidans/Incidence.....	82, 84
İntestinal parazitler/Intestinal parasites.....	39, 45
İntestinal ve kan parazitleri/Intestinal and blood parasites.....	108
İntramusküler sistiserkoz/Intramuscular cysticercosis.....	72
İshal/Diarrhea	39
İzlem/Follow-up	189
Kanser/Cancer.....	150
Karaciğer hidatidozu/Liver hydatidosis.....	207
Keçi/Goat.....	180, 293
Kene/Tick	50

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virüsü/Crimean Congo Hemorrhagic Fever virüs	224
Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi/Crimean-Congo Hemorrhagic Fever.....	50
Kırım-Kongo/Crimean-Congo.....	339
Kirpik/Eyelash.....	219
Kist hidatik/Hydatid cyst	145, 195, 201
Kistik ekinokokkoz/Cystic echinococcosis	195, 246
Kistik ekinokokkozis/Cystic echinococcosis....	129, 133, 140
Klinik belirtiler/Clinical symptoms	39
Klinik özellikler/Clinical features.....	224
Knockdown/Knockdown	307
Kolonoskopi/Colonoscopy.....	281
Konjonktiva/Conjunctiva	301
Konjonktival flora/Conjunctival flora	219
Kontrol/Control	322
Konya/Konya.....	207
Köpek/Dog	28
Koyun/Sheep.....	20, 293
Kullanma suyu/Potable water	201
Kum sineği/Sandy fly	60
Kutanöz leishmaniasis/Cutaneous leishmaniasis	97, 249
Kültür/Culture	249
Larva/Larvae	75
<i>Leishmania major/Leishmania major</i>	91
<i>Leishmania</i> RNA virus 2/ <i>Leishmania</i> RNA virus 2	86
<i>Leishmania tropica/Leishmania tropica</i>	91, 172
<i>Leishmania/Leishmania</i>	28, 86
Leishmaniasis/Leishmaniasis.....	60
Lenfopeni/Lymphopenia	50
LRV2/LRV2	86
Madde bağımlıları/Substance abusers	45
Maymun hastalığı/Monkeypox	361
Mevsimsel aktivite/Seasonal activity.....	60
Miltefosin/Miltefosine	97
Miyazis/Myiasis	75
Moleküler karakterizasyon/Molecular characterization	312
Moleküler kimlik/Molecular identification	213
Multipleks PZR/Multiplex PCR.....	167
Multisistem enflamatuvar sendrom/Multisystem inflammatory syndrome	242
<i>Neospora caninum/Neospora caninum</i>	180
Nested PCR/Nested PZR.....	276
Nüks/Recurrence	246
<i>Oestrus ovis/Oestrus ovis</i>	163
Opisthorchis/Opisthorchis.....	359
Oral/Oral	75
P-selektin/P-selectin.....	195
Parapleji/Paraplegia	78

Parazit/Parasite	150, 184
Parazitoloji/Parasitology	114
Patika/Pathway.....	361
PCR/PCR.....	133
Pedikülozis/Pediculosis.....	327
Petek güvesi/Essential oil	322
<i>Phormia regina/Phormia regina</i>	75
Pityriasis folliculorum/Pityriasis folliculorum	54
<i>Plasmodium falciparum/Plasmodium falciparum</i>	108
<i>Pneumocystis jirovecii/Pneumocystis jirovecii</i>	276
Prevalans/Prevalence	39, 45, 119, 140, 235, 327
Protozoa/Protozoa	14
PZR/PCR.....	28
QPCR/QPCR.....	133
qPCR/qPCR.....	86
Rekombinant protein aşılı/Recombinant protein vaccines.....	342
Resistin/Resistin	195
Retrospektif/Retrospective	28
Reverse line blotting/Reverse line blotting	20
Rosacea/Rosacea	54
Rose bengal/Rose bengal	172
RPMI-1640 besiyeri/RPMI-1640 medium.....	249
Saç biti/Head lice.....	327
Saç taraması/Combing.....	327
Sağlık bakımı/Healthcare	124
Sanitasyon/Sanitation	119
Sarkopt/Sarcopt	334
SARS-CoV-2/SARS-CoV-2	242, 359
<i>Schistosoma mansoni/Schistosoma mansoni</i>	108
Schistosomiasis/Schistosomiasis	108
Seroloji/Serology.....	235
Seropozitif/Seropozitivity.....	129
Seroprevalans/Seroprevalans	180
Seroprevalans/Seroprevalence	288
Sığır/Cattle	207
Sıtma/Malaria	84, 102, 361
Sivas/Sivas	293
Skabiyes/Scabies	334
Sokak köpekleri/Stray dogs	34
Sonodinamik tedavi/Sonodynamic therapy	172
Spinal kist hidatik/Spinal hydatid cyst	78
Spinal/Spinal	246
<i>Staphylococcus epidermidis/Staphylococcus epidermidis</i>	219
Sterol taşıyıcı protein-2/Sterol carrier protein-2	312
Sulak alan/Wetland.....	228
<i>T. vaginalis/T. vaginalis</i>	7
Taksonomi/Taxonomy	213
Tanı/Diagnosis	167, 189

Taramalı elektron mikroskopisi/Scanning electron microscopy.....	213
Tedavi/Treatment	189
Tesadüf/Coincidence.....	84
<i>Theileria/Theileria</i>	20
Thioglukolat/Thioglycolate	7
Toksoplazma/Toxoplasma	253
<i>Toxoplasma gondii/Toxoplasma gondii</i>	1, 288, 342
<i>Toxoplasma/Toxoplasma</i>	235
<i>Trichomonas vaginalis/Trichomonas vaginalis</i>	167
Trypticase soya broth/Trypticase soy broth.....	7
Trypticase-yeast-extract-maltose/Trypticase-yeast-	

extract-maltose	7
Türkiye/Turkey.....	20, 97, 129, 163, 276
Uçucu yağ/Wax moth.....	322
Ultrasonografi/Ultrasonography	72
Visseral leishmaniasis/Visceral leishmaniasis.....	242
WB/WB	133
Yaygınlık/Prevalence.....	207
Yumuşak doku kitlesi/Soft tissue mass	145
<i>Z. officinale/Z. officinale</i>	91
Zencefil/Gingers.....	91
<i>Zingiber officinale/Zingiber officinale</i>	91