

Leishmania spp., *Plasmodium* spp. ve *Toxoplasma gondii*'nin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincirleme Tepkimesi ile Tanısı: Limit Saptama Pilot Çalışması

Identification of Leishmania spp., Plasmodium spp. and Toxoplasma gondii with Polymerase Chain Reaction: A Pilot Study for Limit Determination

Tuba Oyur*¹, Özgür Kurt**², İbrahim Çavuş*¹, Ahmet Özbilgin*¹

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

**Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Öz

Amaç: Kan ve dokularda yerleşen parazitler hastalıklar insan sağlığı için dünya çapında büyük tehlike oluşturmaktadır. Sıtma, leishmaniasis ve toksoplazmoz her yıl çok sayıda kişinin yaşamını kaybetmesine neden olmakta, tedavi maliyetleri ve iş gücü kaybı nedeniyle ülke ekonomilerine büyük yük getirmektedir. Bu çalışmada, *Plasmodium* spp., *Leishmania* spp. ve *Toxoplasma gondii*'nin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) ile klinik örneğin mikrolitresinde belirlenebilecek en düşük parazit sayısının belirlenmesi, test validasyonlarının yapılması ve GZ-PZR testinin rutin laboratuvarlara dâhil edilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: *Leishmania tropica* (promastigot ve amastigot), *L. infantum* (promastigot ve amastigot), *T. gondii* Thoma lamı ile mikroskop altında sayılarak *P. falciparum* ve *P. vivax* ise yayma preparatları hazırlanıp Giemsa ile boyandıktan sonra mikroskop altında incelenerek parazitemi yoğunluğu saptanmıştır. Daha sonra bu parazitlerin PBS solüsyonu ile mikrolitrede 1, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1.000, 2.500, 5.000 ve 10.000 parazit olacak şekilde dilüsyonları yapılmıştır. Tüm parazit süspansiyonlarından DNA izolasyonu yapılarak GZ-PZR ile pozitif sonuç alınan en düşük parazit süspansiyonu belirlenmiştir. Daha sonra da negatif sonuç alınan süspansiyon ile bir önceki pozitif süspansiyon arası yine dilüsyon yapılarak testin saptayabildiği en düşük parazit sayısı belirlenmiştir.

Bulgular: GZ-PZR testinde *P. falciparum* ile *L. tropica* ve *L. infantum*'un promastigot ve amastigot formlarında en düşük parazit sayısı 10, *P. vivax* ve *T. gondii* parazitlerinde ise 12 olarak bulunmuştur.

Tartışma: *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp. ve *T. gondii*'nin GZ-PZR ile tanısında çok düşük sayıdaki parazitlerin başarı ile saptanması, bu testin her üç parazitin moleküler tanısında güvenle kullanılabilceğini düşündürmüştür.

Ahtar kelimeler: GZ-PZR, *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii*

ABSTRACT

Objective: Parasitic diseases that involve blood and tissues pose a significant threat to human health worldwide. Malaria, leishmaniasis and toxoplasmosis kill thousands of people worldwide annually, and impose a great burden on national economies due to treatment costs and loss of labour. The aim of this study are to determine the lowest number of parasites detectable by Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for *Plasmodium* spp., *Leishmania* spp. and *T. gondii* and to validate the RT-PCR test, and integrate RT-PCR in routine laboratories applications.

Methods: *Leishmania tropica* (both promastigotes and amastigotes), *L. infantum* (both promastigotes and amastigotes) and *T. gondii* were counted using a hemocytometer, while Giemsa-stained smears of *P. falciparum* and *P. vivax* were examined under the microscope to define their parasitic load. Then, dilutions as 1, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1.000, 2.500, 5.000 and 10.000 parasites/ul were prepared in PBS solutions. DNA isolation was performed from all parasite suspensions and the lowest parasite suspension which was positively detected by RT-PCR method was identified. This was followed by further dilutions between the previous negative and last positive dilutions, to further determine the lowest number of parasites that RT-PCR could eventually identify.

Results: Our assessments showed that the lowest number of parasites necessary for positive RT-PCR were 10 for *P. falciparum* and amastigotes and promastigote forms of *L. tropica*/*L. infantum*, while 12 for *P. vivax* and *T. gondii*.

Conclusion: These results show that RT-PCR is a reliable diagnostic option to be used successfully for the detection of *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp. and *T. gondii*, even for infections with low parasitemia.

Keywords: *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii*, RT-PCR

Alındığı tarih / Received:
18.11.2019 / 18.November.2019

Kabul tarihi / Accepted:
02.12.2019 / 02.December.2019

Yayın tarihi / Publication date:
31.03.2020 / 31.March.2020

ORCID Kayıtları

T. Oyur 0000-0001-8014-284X
Ö. Kurt 0000-0001-5575-588X
İ. Çavuş 0000-0002-3860-0146
A. Özbilgin 0000-0003-3613-8741

✉ icvs26@yahoo.com

Atf: Oyur T, Kurt Ö, Çavuş İ, Özbilgin A. *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp. ve *Toxoplasma gondii*'nin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincirleme Tepkimesi ile Tanısı: Limit Saptama Pilot Çalışması. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2020;50(1):56-62.

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır. Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing. Licensed by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

GİRİŞ

Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü tarafından altı önemli tropikal hastalıktan biri olarak kabul edilen ve dünyada her yıl tahminen 1.3 milyon yeni olgu ve 200-300 bin kişinin ölümüne yol açtığı sanılan önemli bir enfeksiyondur. *Leishmania* türleri memelilerin zorunlu hücre içi paraziti olup, enfekte *Phlebotomus* veya *Lutzomyia* cinsi tatarcıklar (yakarca) tarafından kan emme sırasında bulaştırılmaktadır^(1,2). Sıtma, leishmaniasis ve toksoplazmoz tüm dünyada insan sağlığını etkileyen önde gelen parazitler hastalıkları arasındadır. Yapılan araştırmalar, dünyada her yıl yaklaşık 2 milyon kişinin ve her 30 saniyede bir çocuğun sıtma nedeniyle yaşamını kaybettiğini; dünya nüfusunun %40'ının sıtma riski altında olduğunu ve her yıl 300-350 milyon insanın enfeksiyonu aldığını göstermektedir. Bunun yanı sıra, özellikle immünsüpresif hastalar ile gebeler için ciddi bir sağlık tehdidi olan toksoplazmoza dünya nüfusunun %13'ünde rastlanılmaktadır⁽³⁻⁶⁾.

Bu üç parazitin neden olduğu enfeksiyonun tanı yöntemleri incelendiğinde, deri leishmaniasis'inde sağlam deri ile lezyonun birleştiği bölgeden iğne aspirasyonu ile alınan materyalin, visceral *leishmaniasis* (VL) hastalarında ise dalak veya kemik iliği aspirasyon materyalinden yapılan yayma preparatlarının, Wright veya Giemsa boyama yöntemi ile boyanarak amastigotların görülmesi veya bu materyallerin NNN besiyerine ekilerek promastigotların üretilmesiyle tanı konulması altın standarttır^(1,7). Sıtmada ise altın standart parmak ucundan alınan kandan ince yayma ve kalın damla preparatları hazırlanarak parazitin mikroskopta görülmesidir. Toksoplazmoz için seroloji en çok tercih edilen tanı yöntemidir. Bununla birlikte, özellikle serolojik sonuçların şüpheli olarak saptandığı gebelerde amniyon sıvısından yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) güvenle kullanılmaktadır⁽⁸⁻¹¹⁾.

Parazitler hastalıklarının tanısında mikroskopik incelemeden serolojiye, kültürden PZR'ye çok sayıda farklı yöntem kullanılmaktadır⁽¹²⁾. Son yıllarda mikrobiyolojinin çoğu alanında olduğu gibi parazitolojide de PZR

gibi moleküler tanı yöntemleri yaygın olarak tercih edilmeye başlanmıştır. Bunun başlıca nedenleri arasında PZR'nin yüksek duyarlılık ve özgüllüğü, hastalara hızlı sonuç verilebilmesi ve az miktarda örneklerle dahi iyi sonuç alınabilmesi sayılabilir. Bununla birlikte, gelişmekte olan ülkeler için PZR halen diğer yöntemlerden daha pahalıdır. Ayrıca PZR'nin özel bir laboratuvar, cihazlar ve özel eğitilmiş personel gerektirmesi gibi dezavantajları da bulunmaktadır.

Bu çalışmada, *Plasmodium spp.*, *Leishmania spp.* ve *T. gondii*'nin gerçek zamanlı PZR (GZ-PZR) tepkimesi ile klinik örneğin mikrolitresinde belirlenebilecek en düşük parazit sayısının belirlenmesi, test validasyonlarının yapılması ve GZ-PZR testinin rutin laboratuvarlara dâhil edilmesi sırasında yardımcı olması amaçlanmıştır. Bu çalışmayla oluşturulacak standartlar ile gelecekte patentli bir tanı kiti geliştirilmesi hedeflenmektedir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Parazit süspansiyonlarının hazırlanması: Çalışmada, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Ana Bilim Dalı'nda, sıvı azot içinde saklanmakta olan parazit suşları kullanılmıştır. *Leishmania tropica* (promastigot ve amastigot), *Leishmania infantum* (promastigot ve amastigot), *Toxoplasma gondii* Thoma lamı ile mikroskop altında sayılarak *Plasmodium falciparum* ve *Plasmodium vivax* ise yayma preparatları hazırlanıp Giemsa ile boyandıktan sonra mikroskop altında incelenerek parazitemi yoğunluğu saptanmıştır. Daha sonra bu parazitler PBS çözümü ile mikrolitrede 1, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1.000, 2.500, 5.000 ve 10.000 parazit olacak şekilde dilüsyonları yapılmıştır. Pozitif çıkan son dilüsyon ile ondan sonraki ilk negatif çıkan dilüsyon arası yine dilüsyon yapılarak çalışılmıştır. Tüm çalışmalar 3 kez tekrarlanmış ve çıkan sonuçların ortalaması alınmıştır.

DNA izolasyonu: Hazırlanan her bir parazit süspansiyonundan DNA izolasyonu ticari kit (High Pure PCR template preparation kit, Roche) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapılmıştır.

GZ-PZR: Her bir parazit için kullanılan primer ve probalar Tablo 1’de verilmiştir. GZ-PZR analizinde her bir parazit için “PCR grade” su, ileri ve geri yönlü primerler, probalar ve QuantiTect Probe PCR Master kit (Qiagen) içeren reaksiyon karışımından 20 µl ve 5 µl genomik DNA kullanılmıştır. PZR karışımları 0.2 ml’lik ependorf tüpleri içerisinde hazırlandıktan sonra GZ-PZR cihazında çalışılmıştır.

Tablo 1. GZ-PZR için kullanılan primer ve probalar.

Parazit	Primer-Prob	Kaynak
<i>L. tropica</i> <i>L. infantum</i>	FP: 5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3' RP: 5'-GAAGCCAAGTCATCCATCGC-3' P1: 5'-CCGTTTATACAAAAATATACGGCGTT TCGGTTT-Fluo-3' P2: 5'-LCRed-640-GCGGGTGGGTGCGTGT GTG-Pho-3'	13
	FP: 5'-GTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGA-3' RP: 5'-AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA-3' P: 5'-6FAM-AGCAATCTAAAAGTCACCTCGAA AGATGACT-TMR (Pf) P: 5'-6FAM-AGCAATCTAAGAATAAACTCCGA AGAGAAAATTCT-TMR (Pv)	14
<i>P. falciparum</i> <i>P. vivax</i>	FP: 5'-CTCGCCTGTGCTTGGAGC-3' RP: 5'-CCTGCCTTCATCTACAGTCT-3' P: 5'-6FAM-TCTGTAGTCCCTTCGACTTCTG TCCC-BHQ1	15

FP: Forwardprimer, RP: Reverseprimer, P: Prob, ITS: Internal transcribed spacer-1, Pf: *P. falciparum*, Pv: *P. vivax*

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2015-090 numaralı proje ile desteklenmiştir.

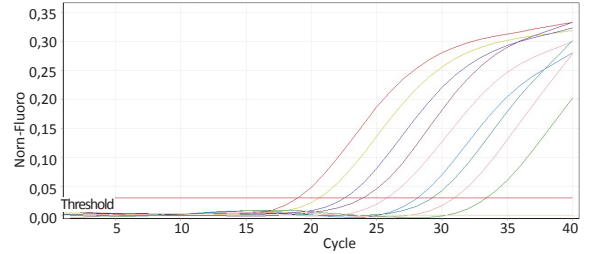
BULGULAR

Yapılan GZ-PZR testinde *P. falciparum*, *L. tropica* (promastigot), *L. infantum* (promastigot), *L. tropica* (amastigot), *L. infantum* (amastigot) parazitlerinde en düşük parazit sayısı mililitrede 10 olarak bulunur-

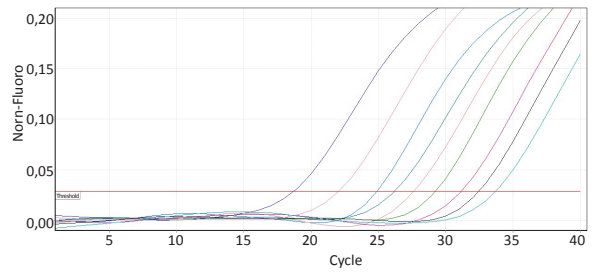
Tablo 2. Parazit türlerine göre GZ-PZR saptanan en düşük parazit sayısı.

Parazit Türü	GZ-PZR Saptanan En Düşük Parazit Sayısı (parazit/ml)
<i>Plasmodium falciparum</i>	10
<i>Plasmodium vivax</i>	12
<i>Leishmania tropica</i> (promastigot)	10
<i>Leishmania infantum</i> (promastigot)	10
<i>Leishmania tropica</i> (amastigot)	10
<i>Leishmania infantum</i> (amastigot)	10
<i>Toxoplasma gondii</i>	12

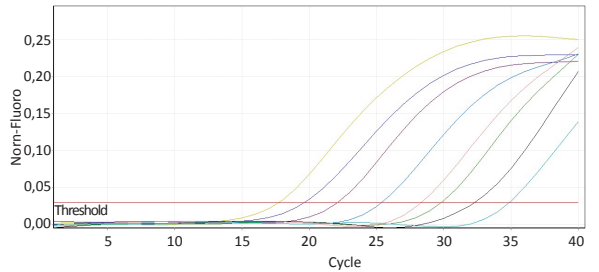
ken, *P. vivax* ve *T. gondii* içinse 12 olarak saptanmıştır (Tablo 2) (Şekil 1-3).



Şekil 1. Leishmania tropica GZ-PRZ analizi.



Şekil 2. Plasmodium falciparum GZ-PRZ analizi.



Şekil 3. Toxoplasma gondii GZ-PRZ analizi.

TARTIŞMA

Paraziter hastalıkların tanısında farklı duyarlılığa ve özgüllüğe sahip birçok yöntem kullanılmakta, her biri için tanıda altın standart farklılık gösterebilmektedir. Çoğu bakteri ve virüs enfeksiyonunda PZR rutin tanıda kullanılmaktayken, paraziter hastalıklara yönelik PZR uygulamaları daha geç başlamıştır. Yapılan çalışmalarda, PZR'nin tanısal duyarlılığının hafif enfeksiyonlu olguların tanısında çok etkili olduğu, diğer yöntemlerle saptanamayan birçok etkenin PZR ile saptandığı bilinmektedir. Buna en iyi örneklerden biri *Dientamoeba fragilis* isimli bağırsak protozoonudur. Trikom boyalı preparatlar ile kültür yönteminin kullanıldığı özel bir çalışmada, insidansı %5'in altında saptanan bu protozoonun PZR ile üstelik Danimarka

gibi genel olarak intestinal parazitlerin insidansının düşük olduğu bir ülkede dahi %43 olarak saptanması dikkat çekici bulunmuştur⁽¹⁶⁾.

Leishmaniasis olgularını tanımlamada PZR protokolleri uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bu protokoller arasında kinetoplast DNA'sı (kDNA), ribozomal RNA'nın küçük alt ünitesi (ssRNA) ve ITS-1 bölgesine yönelik olanlar en sık kullanılanlardır⁽¹⁷⁾. Özellikle öldürücü olabilen VL olgularında, hızlı ve etkin tanı olanağı sunan, hatta semptomsuz olguların bile saptanmasına olanak sağlayan bu yöntemler ile düşük parazit sayısına sahip olgularda dahi tanı konulabildiği bildirilmektedir⁽¹⁸⁾. VL'nin yaygın görüldüğü bir Afrika ülkesi olan Etiyopya'da yapılan bir çalışmada, VL'nin tanısı için en duyarlı yöntemin kDNA'ya yönelik GZ-PZR protokolü olduğu ve testin saptama eşiğinin mililitrede 10 parazit olduğu bildirilmiştir⁽¹⁷⁾. Bu sonuçlarla karşılaştırıldığında, *Leishmania* belirleme sınırının uyguladığımız PZR protokolü ile paralellik gösterdiği görülmektedir. Yapılan farklı bir çalışmada Ceccarelli ve ark.⁽¹⁹⁾ kDNA'yı hedef alarak uyguladıkları kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu yönteminde, *L. amazonensis* DNA'sını 1 ile 1×10^{-4} aralığında dilüe ederek belirlenebilir en düşük DNA miktarını 0.1 pg olarak bulmuş ve bu miktarın 1.3 parazite eşit olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşılık, Eberhardt ve ark.⁽²⁰⁾ yaptıkları bir çalışmada, *L. infantum* ile enfekte edilmiş hamster organlarındaki amastigot belirleme sınırlarını, yeni geliştirdikleri RNA tabanlı ve Spliced-leader RNA saptama metodu olarak adlandırılan yöntem ile araştırmışlardır. Bu çalışmada araştırmacılar, hamster karaciğer ve dalaklarındaki amastigot miktarlarını sırasıyla 0.005 ve 0.002 parazit/mg olarak saptamışlar ve bu yöntemin 18sRNA ve kDNA bölgelerini hedefleyen yöntemlerden daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir⁽²⁰⁾.

Sıtmanın tanısında tüm dünyada en yaygın kullanılan yöntem mikroskopidir. Son yıllarda moleküler yöntemlerin sıtma tanısında da yaygın olarak kullanıma girmesiyle sıtma tanısında daha etkili tanı yöntemleri uygulandığı görülmektedir. Sonuç olarak, yakın zamana kadar insanı enfekte eden dört *Plasmodium spp.*

olduğu bildirilirken *P. knowlesi*'nin de insanları enfekte ettiği son yıllarda gerçekleştirilen DNA dizi analizi çalışmalarıyla ortaya konulmuştur^(21,22). Sıtmanın PZR ile tanısında, diğer enfeksiyonlarda olduğu gibi parazitin DNA'sı araştırıldığından canlı/ölü parazit ayrımı yapılamamaktadır ki bu durum, PZR'nin en önemli dezavantajlarından biri kabul edilir. Bununla birlikte, Jarra ve Snounou⁽²³⁾ 1998 yılında yayımlanan çalışmalarında, yalnızca canlı parazitleri saptayan bir PZR protokolü tanımlamışlardır. Aynı anda tüm sıtma türlerinin birlikte araştırılabildiği bir GZ-PZR panelinde birden fazla etkenin yol açtığı sıtma enfeksiyonları da belirlenebilmektedir. Sonuç olarak, deneysel çalışmalarla sıtma tanısında PZR duyarlılığındaki alt limitin 5-10 yeni izole edilmiş sporozoit olduğu bildirilmektedir⁽²⁴⁾. Imwong ve ark.⁽²⁵⁾ yaptığı bir çalışmada, sıtma tanısında kullanılan PZR'nin μ l'de en az 22 parazit olduğunda pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir. Çalışmamızda saptadığımız alt limit olan en az 12 parazit bu bakımdan başarılı bir sonuç olarak kabul edilebilir. Hızla gelişen teknoloji ve parazit genomunda daha duyarlı yeni hedef bölgelerin saptanması ile belirleme limitleri oldukça aşağı çekilmiştir. Raju ve ark.⁽²⁶⁾ sıtmanın moleküler tanısında "identical multiple repeat sequences" (IMRSs) olarak adlandırılan bir dizi özdeş hedef bölgenin primer potansiyelini araştırmış ve bu bölgeye özgü primerlerin 18sRNA gen bölgesine göre tasarlanan primerlerden 100 kat daha düşük miktarda paraziti saptayabildiğini göstermişlerdir. Yine Almeida-de-Oliveira ve ark.⁽²⁷⁾ tarafından yapılan bir çalışmada, SYBRTM ve TaqManTM prob sistemleri kullanılarak uygulanan GZ-PZR yönteminde *P. vivax* için limit saptama performansı 0.01 parazit/ μ l olarak bulunmuştur.

Toksoplazmoz için uygulanan diğer tanı seçeneklerine kıyasla çok daha etkin, hızlı ve kontaminasyon riski düşük bir yöntem olan GZ-PZR ile yalnızca kandan değil, her türlü vücut sıvısı ve doku örneğinde de *T. gondii* DNA'sı aranabilmektedir. Yapılan çalışmalarda, incelenen örnekte az sayıda *T. gondii* takizoti bulunduğunda dahi sonuç alınabildiği gösterilmektedir. Günümüzde özellikle gebelerde toksoplazmoz kuşkusu duyulduğunda amniyon sıvı örneğinden

yapılan GZ-PZR, yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü ile güvenle kullanılmaktadır^(28,29). Parazit yükünün az olduğu olgularda erken dönemde tanı koymak özellikle gebelerde önemli olduğundan, geliştirilen testlerde olabildiği kadar az sayıda parazitin varlığında pozitif sonuç veren protokoller değer kazanmıştır. Özellikle Fransa'da yapılan çok sayıda çalışma ile bugün amniyon sıvısından alınan örnekte tek bir *T. gondii* takizoiti olsa bile pozitif sonuç veren ve bu sayede doğru tanı koyduran PZR ve GZ-PZR protokolleri bulunmaktadır^(28,29). Ayrıca, deneysel olarak dokulardan alınan örneklerde *T. gondii* varlığını saptayan PZR protokolleri de geliştirilmiştir⁽³⁰⁾. Ender görülsede ciddi sorunlar doğuran organ nakliyle bulaşan toksoplazmoz gibi olgularda bu tip testler büyük yarar sağlayacaktır. Çalışmamızda, 12 parazit/ml PZR protokolümüzün alt sınırı olarak belirlendi. Yapılan az sayıdaki benzer çalışmalardan birinde, Japon araştırmacı Asai⁽³¹⁾, Toksoplazma ensefaliti tanısında PZR'nin etkinliğini araştırmış ve 1×10^{-8} ng/ul olduğunu belirtmiştir. Kedi dışısındaki ookistleri saptayabilmek için geliştirilmiş ticari tanı kitlerinin karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada ise, en duyarlı kitin 1 gram dışkıda 50 ookist olduğunda tanı koyabildiği belirlenmiştir⁽³²⁾. Farklı bir çalışmada ise, Escotte Binet ve ark.⁽³³⁾ toplam örneklerinde *T. gondii* ookistlerini PZR ile hızlı ve duyarlı bir yöntemle araştırmış ve minimum ookist saptama limitini 1 ookist/g olarak bildirmişlerdir. Sroka ve ark.⁽³⁴⁾ ise *T. gondii* ookistlerinin belirlenmesinde GZ-PZR ile çift türlü polimeraz zincir reaksiyonu (ÇT-PZR-nested PCR) yöntemlerini kıyaslayarak minimum ookist saptama limitini araştırmışlardır. Bu çalışmada, ookist içeren su ve kedi dışı örnekleri hem GZ-PZR ile hem de ÇT-PZR yöntemleri ile çalışılmıştır. Minimum ookist limitleri, su örneklerinde GZ-PZR ve ÇT-PZR için sırasıyla 1-50 ve 2-20 ookist olarak belirlenirken, dışkı örnekleri için ise 1-50 ve 50 ookist olarak bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada, Rahimi Esboei ve ark.⁽³⁵⁾ oküler toksoplazmozlu hastaların kan örneklerinde *T. gondii* belirlenmesi için RE ve B1 genlerini hedefleyerek minimum belirlenme limitini sırasıyla bir takizoit ve beş takizoit olarak saptamışlardır. Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin diğer çalışmaların verileri ile kıyaslanabilir olduğu düşünülmektedir.

Türkiye, coğrafi konumu gereği Asya, Afrika ve Avrupa arasında bir geçiş noktası olduğundan ülkemizdeki parazit suşlarının ileri derecede çeşitliliğe sahip olduğu tahmin edilmektedir. Bu çalışma ile *P. falciparum* dışında ülkemizden elde edilen yerli parazit suşlarından *L. tropica*, *L. infantum*, *T. gondii* ve *P. vivax* (ülkemizdeki sıtma eliminasyonundan önce elde edilmiş) ile PZR denemeleri yapıp uygun test koşulları için pozitiflik limitleri ilk kez ortaya konulmuştur. İçeriği ve sonuçları göz önüne alındığında bu çalışma özgündür ve ülkemizdeki çalışmalara katkı sağlayacağı ve rehber olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmanın verileri ile yapılacak sonraki ve ileri çalışmalar ülkemizde bu üç parazit hastalığının tanısı için uygulanacak PZR testlerinin duyarlılık ve özgünlüğünün geliştirilmesine katkı sağlayacak, ülkemize özgü izolatlar ile hazırlanacak tanı kitleriyle bu konudaki dışa bağımlılığı da azaltabilecektir. Bu bilgilerin ışığında daha fazla sayıda örnek ve ileri çalışmalar ile çalışmada araştırılan parazitlerin GZ-PZR ile saptanmasına yönelik yerli tanı kitlerinin geliştirilmesi ve patent alınması da planlanmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma Bio. Tuba Oyur'un Yüksek Lisans Tezinden üretilmiştir. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Parazit Bankası'na çalışmadaki suşların temin edilmesinde sağladığı katkılardan dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Özbel Y, Özensoy TS. Leishmaniasis. İçinde: Özcel MA, Özbel Y, Ak M (Eds). Tıbbi Parazit Hastalıkları. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, 2007;22:197-241.
2. WHO. Leishmaniasis. 2019. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en> [Erişim tarihi:10.10.2019]
3. Özcel MA. Sıtma Epidemiyolojisi. İçinde: Özcel MA (Eds). Tıbbi Parazit Hastalıkları. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, 2007;22:79-140.
4. WHO. World Malaria Report: WHO and UNICEF. 2005. <http://www.rbm.who.int/wmr> [Erişim tarihi:10.03.2011]
5. Özcel MA. Sıtma. İçinde: Özcel MA, Özbel Y, Ak M (Eds). Tıbbi Parazit Hastalıkları. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, 2007; No: 22;79-138.
6. Remington JS, McLeod R, Desmonts G. Toksoplazmozis. In: Infectious Diseases of the Fetus & Newborn Infant. 4th Ed. Remington&Klein. WB Saunders Company,

- 1992;5:140-267.
7. Novy FG, MacNeal WJ. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. J Infect Dis. 1904;1:1-30. <https://doi.org/10.1093/infdis/1.1.1>
 8. Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. Sıtma. Tıp Parazitolojisi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları. 1995:623-64.
 9. Gürüz Y, Korkmaz M. Özellikli tanı yöntemleri. İçinde: Özcel MA, Altıntaş N (Eds). Parazit Hastalıklarında Tanı. İzmir: Parazitoloji Derneği Yayını, No:15. 1997:293-318.
 10. Montaya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. J Infect Dis. 2002;185(Suppl 1):S873-82. <https://doi.org/10.1086/338827>
 11. Romand S, Chosson M, Franck J et al. Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*. Am J Obstet Gynecol. 2004;190(3):797-802. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2003.09.039>
 12. Daldal N, Özensoy S, Aksoy Ü, Akisü Ç. 1999. Besiyerleri ve Hayvan İnokülasyonları. İçinde: Özcel MA, Altıntaş N. (Eds). Parazit Hastalıklarında Tanı. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, No:15. 1999:149-82.
 13. Toz SO, Culha G, Zeyrek FY et al. A real-time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of *Leishmania* parasite from human and dog clinical samples in Turkey. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(5):e2205. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002205>
 14. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jaton K. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. J Clin Microbiol. 2004;42(12):5636-43. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5636-5643.2004>
 15. Selseleh M, Modarressi MH, Mohebbi M et al. Real-time RT-PCR on SAG1 and BAG1 gene expression during stage conversion in immunosuppressed mice infected with *Toxoplasma gondii* Tehran strain. Korean J Parasitol. 2012;50(3):199-205. <https://doi.org/10.3347/kjp.2012.50.3.199>
 16. Röser D, Simonsen J, Nielsen HV, Stensvold CR, Mølbak K. *Dientamoeba fragilis* in Denmark: epidemiological experience derived from four years of routine real-time PCR, Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013;32(10):1303-10. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1880-2>
 17. Abbasi I, Aramin S, Hailu A et al. Evaluation of PCR procedures for detecting and quantifying *Leishmania donovani* DNA in large numbers of dried human blood samples from a visceral leishmaniasis focus in Northern Ethiopia. BMC Infect Dis. 2013;27:13:153. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-153>.
 18. Mary C, Faraut F, Drogoul MP, et al. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. Am J Trop Med Hyg. 2006;75(5):858-63. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.75.858>
 19. Ceccarelli M, Galluzzi L, Diotallevi A, et al. The use of kDNA minicircle subclass relative abundance to differentiate between *Leishmania* (L.) *infantum* and *Leishmania* (L.) *amazonensis*. Parasit Vectors. 2017;10(1):239. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2181-x>
 20. Eberhardt E, Van den Kerkhof M, Bulté D, et al. Evaluation of a pan-*Leishmania* spliced-leader RNA detection method in human blood and experimentally infected Syrian golden hamsters. J Mol Diagn. 2018;20(2):253-63. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.12.003>
 21. White NJ. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. Clin Infect Dis. 2008;46(2):172-3. <https://doi.org/10.1086/524889>
 22. Özbilgin A, Çavuş İ, Yıldırım A, Gündüz C. Türkiye'deki ilk maymun sıtması: Bir *Plasmodium knowlesi* olgusu. Mikrobiyol Bul. 2016;50(3):484-90. <https://doi.org/10.5578/mb.27788>
 23. Jarra W, Snounou G. Only viable parasites are detected by PCR following clearance of rodent malarial infections by drug treatment or immune responses. Infect Immun. 1998;66(8):3783-7.
 24. Schussek S, Groves PL, Apte SH, Doolan DL. Highly sensitive quantitative real-time PCR for the detection of *Plasmodium* liver-stage parasite burden following low-dose sporozoite challenge. PLoS One. 2013;8(10):77811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077811>
 25. Imwong M, Stepniewska K, Tripura R et al. Numerical distributions of parasite densities during asymptomatic malaria. J Infect Dis. 2016;213(8):1322-9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv596>
 26. Raju LS, Kamath S, Shetty MC, et al. Genome mining-based identification of identical multirepeat sequences in *Plasmodium falciparum* genome for highly sensitive real-time quantitative PCR assay and its application in malaria diagnosis. J Mol Diagn. 2019;21(5):824-38. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2019.04.004>
 27. Almeida-de-Oliveira NK, Moreira OC, de Lavigne AR, et al. Analytical validation of real-time quantitative PCR assays for optimum diagnosis of vivax malaria. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2019;114:e180350. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180350>
 28. Jauregui LH, Higgins J, Zarlenga D, Dubey JP, Lunney JK. Development of a real-time PCR assay for detection of

- Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. J Clin Microbiol. 2001;39(6):2065-71.
<https://doi.org/10.1128/JCM.39.6.2065-2071.2001>
29. Kompalic-Cristo A, Frotta C, Suárez-Mutis M, Fernandes O, Britto C. Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. Parasitol Res. 2007;101(3):619-25.
<https://doi.org/10.1007/s00436-007-0524-9>
30. Flori P, Hafid J, Bourlet T, Raberin H, Genin C, Sung RT. Experimental model of congenital toxoplasmosis in guinea-pigs: use of quantitative and qualitative PCR for the study of maternofetal transmission. J Med Microbiol. 2002;51(10):871-8.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-10-871>
31. Asai T. The diagnosis of toxoplasmic encephalitis by polymerase chain reaction. Rinsho Shinkeigaku. 2013;23(11):1194-5.
<https://doi.org/10.5692/clinicalneuro.53.1194>
32. Herrmann DC, Maksimov A, Pantchev N, Vrhovec MG, Conraths FJ, Schares G. Comparison of different commercial DNA extraction kits to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in cat faeces. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2011;124(11-12):497-502.
33. Escotte-Binet S, Da Silva AM, Cancès B, et al. A rapid and sensitive method to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in soil samples. Vet Parasitol. 2019;274:108904.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.07.012>
34. Sroka J, Karamon J, Dutkiewicz J, Wójcik-Fatla A, Cencek T. Optimization of flotation, DNA extraction and PCR methods for detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in cat faeces. Ann Agric Environ Med. 2018;25(4):680-685.
<https://doi.org/10.26444/aaem/97402>
35. Rahimi Esboei B, Kazemi B, Zarei M, et al. Evaluation of RE and B1 genes as targets for detection of *Toxoplasma gondii* by nested PCR in blood samples of patients with ocular toxoplasmosis. Acta Parasitol. 2019;64(2):384-9.
<https://doi.org/10.2478/s11686-019-00056-6>