

# Suda *Toxoplasma gondii* Analizi ve Yeni Bir Yaklaşım: İlmiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon Tekniği

Banuçiçek YÜCESAN<sup>1</sup>, Özcan ÖZKAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Parazitoloji Laboratuvarı 06100, Ankara, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü 18100, Çankırı, TÜRKİYE

## ÖZET

*Toxoplasma gondii*, tüm dünyada yaygın olarak görülen ve bütün omurgalıları tutabilen, zorunlu hücre içi bir protozondur. Dünya nüfusunun yaklaşık en az üçte birinde bu etkene karşı gelişen antikörlerin varlığı tespit edilmiştir. Ülkemizde genel popülasyondaki ortalama *T. gondii* seroprevalansı %40 oranındadır. Etken çoğunlukla, doku kistleri ile enfekte pişmemiş etlerin tüketilmesi veya enfekte kedilerin dışkılarındaki ookistler ile kontamine az pişmiş yiyecek veya kontamine suyun tüketimi ile enfeksiyona neden olmaktadır. İnsanlarda ookist kaynaklı enfeksiyonların doku kisti kaynaklı enfeksiyonlardan daha ciddi seyrettiği belirlenmiştir. Buna karşılık, yakın geçmişe kadar *T. gondii*'nin sular vasıtasıyla iletiminin nadir olduğu kabul edilmiştir. Ancak, dünyada *T. gondii* ile oluşan salgınlar suyun tekrar gündeme gelmesini sağlamıştır. Bu nedenle, toxoplasmosis için gerekli önlemlerin alınması noktasında su analizleri de önemli bir konum edinmiş durumdadır. Suda *T. gondii* analizi daha çok moleküler yöntemlerle, özellikle Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (Loopmediated isothermal amplification; LAMP) ile yapılmaktadır. Bu derlemede toksoplasmosis bulaşında bugüne kadar ihmal

edilen suyun önemi, yapılması gerekenler ve ilgili moleküler teknikler üzerinde durulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** İlmiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon, Su, *Toxoplasma gondii*

# ***Toxoplasma gondii* Analysis in Water and A New Approach: Loopmediated Isothermal Amplification Technique**

**Banuçiçek YÜCESAN<sup>1</sup>, Özcan ÖZKAN<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Republic of Turkey, Ministry of Health, Directorate General of Public Health, Parasitology Laboratory, 06100, Ankara, TURKEY

<sup>2</sup> Department of Biology, Çankırı Karatekin University Faculty of Science 18200, Çankırı, TURKEY

## **ABSTRACT**

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular protozoan parasite. It is one of the most common disease seen worldwide and can affect all the vertebrates. Toxoplasmosis is a disease caused by *T. gondii* and least one-third of the world's population has detectable *T. gondii* antibodies. Seroprevalence of the disease is approximately 40% in Turkish population. Humans become infected with *T. gondii* mainly by ingesting uncooked meat containing viable tissue cysts or by ingesting food or water contaminated with oocysts from the feces of infected cats. Circumstantial evidence suggests that oocyst-induced infections in humans are clinically more severe than tissue cyst-acquired infections. Until recently, waterborne transmission of *T. gondii* was considered uncommon. But the epidemics of toxoplasmosis made the topic became an agenda of the World again. That's why it is a must to take the necessary precautions and analyses should be done for the disease which is epidemic throughout water. Nowadays water analysis for the agent is mostly conducted with molecular studies, especially Polymerase Chain Reaction (PCR) and Loopmediated isothermal amplification (LAMP). This review puts emphasis on the importance of disregarded *Toxoplasma* which can be plagued throughout water and also will highlight the necessary precautions that should be taken.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*, Water, Loopmediated isothermal amplification

## **GİRİŞ**

*Toxoplasma gondii* etkenin neden olduğu, tüm dünyada yaygın görülebilen ve tüm omurgalıları tutabilen, fakültatif, fırsatçı zorunlu hücre içi protozodur (33). *T. gondii* özellikle akut dönemde insan vücudundaki tüm hayati organları tutabilen kan, gözyaşı, beyin omurilik sıvısı (BOS), tükürük meni ve idrar gibi tüm sıvısal çıkartılarda bulunabilen, transplasental yol ile bulaşıp kalıcı fetal yıkımlara, düşüklere yol açabilen zoonoz bir etkidir. Hastalığın bu karakteri az pişmiş enfekte ya da çiğ et, süt, yumurta ve kabuğu soyulmamış veya iyi yıkanmamış kontamine meyve ve sebzenin yenmesi, su içilmesi, kan nakli, organ nakli ve transplasental geçiş gibi pek çok yolla bulaşın olması, tüm dünyada yaygın görülmesine yol açmaktadır (35).

Ayrıca toplumların gelenekleri ve beslenme alışkanlıkları da hastalığın boyutunu doğrudan etkileyen faktörler içerisinde (27). Bununla birlikte, hastalığın kontrolünü zorlaştıran ve tekrarlanmasından sorumlu tutulan, konak immün sisteminden korunmasına yarayan ve parazitin bradizoit formunu bulunduran doku kistlerdir. Bu nedenle enfeksiyon bağıışıklığı bastırılmış kişilerde yada bağıışıklığı bulunmayan bayanlarda, hamilelik döneminde geçirilirse ciddi bir hastalık tablosuna neden olabilir. Diğer taraftan, immün sistemi sağlam kişilerde %90 oranında selim seyirli olan bu hastalık, özellikle Edinilmiş Bağıışıklık Eksikliği Sendromu (Acquired Immune Deficiency Syndrome-AIDS), hematolojik kanserler, soliter organ ve kemik iliği nakli gibi T hücrelerine bağılı immünite hastalıklarında ağır seyretmekte, hatta kontrol altına alınmadığı takdirde de ölüme neticelenebilmektedir (34).

*Toxoplasma gondii* ilk olarak 1908 yılında Nicolle and Manceaux tarafından Tunus'da bulunan *Ctenodactylus gundi* adında bir kemirgende bulunmuş ve daha sonraki yıllarda da kesin konağın kediler olduğu ortaya konulmuştur. Türkiye'de ilk kez Akçay ve ark. (1) tarafından bir köpekte belirlenirken, Unat ve ark. (27) tarafından da histopatolojik olarak insanda gösterilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, hastalıkları önleme ve kontrol merkezi [Centre for Disease Control and Prevention (CDC)] *Toxoplasma* enfeksiyonunu ihmal edilmiş hastalıklar arasında tanımlamıştır (7).

Günümüzde, dünya nüfusunun % 25 ile %30'u *Toxoplasma* ile enfekte kabul edilmesine (25) karşın bu prevalans ülkelere göre %10 ile 80 arasında seyretmekte ve bölgeden bölgeye farklılık göstermektedir (29). Şöyle ki, Kuzey Amerika, Güneydoğu Asya, Kuzey Avrupa ve Afrika'nın Sahelian ülkelerinde düşük prevalansla seyrederken, Orta ve Güney Avrupa ülkelerinde %30-50 prevalansa sahip olduğu görülmüş. Latin Amerika ve tropikal Afrika ülkelerinde ise daha yüksek prevalanslar bildirilmiştir. Bununla birlikte *Toxoplasma* seropozitifliğinin, Türkiye'deki durumu hakkında değişen kayıtlar olmasına rağmen tüm ülkeyi temsil edebilecek güvenilir toplu bir sonuç bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalar genel olarak iller bazında yapılan seroprevalans çalışmalarıdır. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen seroprevalanslardan genel bir yaklaşım elde edilirken, çeşitli illerinde bildirilen çalışmalarda; Konya'da IgG %39, IgM %13,4, Diyarbakır'da IgG %32,9, IgM %8,16, Aydın'da IgG %30, IgM %2,6, Erzurum'da IgG %24, IgM %0,4, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde IgG %42,3 olarak rapor edilmiştir. Bu çalışmalar, Türkiye'de *Toxoplasma* enfeksiyonunun seropozitifliğinin sıcaklık, nem, kalkınmışlık ve beslenme kültürüne göre değişebileceğini göstermiştir. Sonuç olarak, bölgesel ve ulusal seroprevalansın bilinmesi bu hastalığa karşı gerekli önlemlerin alınabilmesi, mücadele ve toplumsal farkındalığın yükseltilmesi için son derece önemlidir (2, 13, 15).

Sporlanmış ookist içerisinde bulunan sporozoitler, akut dönemde seyreden enfekte hayvandaki trofozoitler ve kronik dönemdeki kist formunda bulunan bradizoitler, kedi, insan ve diğer konaklar için de enfeksiyözdür. *T. gondii* sporlanmış ookistleri toprakta 18 ay enfektif kalabilen, su ile de bulaş sözkonusu olan bir protozoondur (11).

Yakın geçmişe kadar su ve su kaynakları yoluyla bulaşın nadir olduğu kabul edilirken günümüzde dünyada *T. gondii* salgınlarının su kaynaklarıyla olabileceği tekrar gündeme gelmiştir. Günümüze kadar dünyada su kaynaklı bilinen en az dört büyük toxoplasmosis salgını bildirilmiştir (3). Bunlardan ilki 1979 yılında Panama'da ortaya çıkmıştır. Bu kapsamda da yapılan epidemiyolojik araştırmalar da, salgının kaynağı; enfekte vahşi kedilerin enfekte dışkılarıyla kontamine olan dere gibi su kaynaklarının olduğunu bildirmiştir (4, 24). Diğer bir su kaynaklı *toxoplasmosis* salgını, 1995'de Kanada'da (British Colombia) 110 kişinin enfekte olduğu görülmüş, kaynağın, puma veya evcil kedilerin enfekte dışkısının bulaştığı belediye içme suyunun olduğu tespit edilmiştir (5, 24). Brezilya'da filtre edilmeden tüketilen su ile enfekte olan 290 vaka rapor edilmiştir (17, 24). Sonuncu salgın ise Hindistan'da yine filtre edilmeyen belediye suları ile gelişen oküler *toxoplasmosis* vakaları olarak bildirilmiştir (24, 30).

Türkiye'de ise su kaynaklarına yönelik *T. gondii* analizi Ordu ilinde 56 adet şebeke ve ırmak suyunda PZR ve LAMP yöntemiyle Kolören ve ark. (19) tarafından yapılmıştır. Çalışmada, ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (Loopmediated Isothermal Amplification; [LAMP]) yöntemi ile analize alınan örneklerin %35,7'i pozitif bulunmuştur. Aynı yıl yapılan diğer bir çalışmada, 120 yüzeysel su örneğinde, nested PZR ile yapılan analizde 48 örnekte *T. gondii* pozitif bulunmuştur (20). Demirel ve ark. (9) Giresun ilinde 76 çevresel su kaynağı ve 20 içme suyu örneklerinden PZR ve LAMP yöntemleri ile *T. gondii* analizi sonucunda, çevresel örneklerin %13,2'sinde pozitiflik bulunurken, içme sularının tamamında negatif sonuç elde edilmiştir.

Diğer taraftan geleneksel yöntemlerle suda protozoonları tespit etmek, yüksek hacimli suyun flitasyonu veya santrifüjlenmesi, immünomanyetik ayırma (Immunomagnetic Separation- IMS) veya diğer teknikler ile partiküllerin ayrılması ve immünofloresans mikroskopi, hayvan deneyleri ve moleküler teknikler ya da bunların kombinasyonları ile mümkün olabilmektedir (32, 38).

*Toxoplasma gondii* ookistleri için rutinde kullanılan IMS teknikleri, standart kültür protokolleri bulunmazken çevresel örneklerde, ookistler diferansiyel flotasyon veya fare inokulasyonu ile tanımlanabilmektedir. Son zamanlarda

sularda *T. gondii* ookist ve sporokistlerinin ayırt edilebilmesi için IMS teknikleri geliştirilmektedir. Ancak, sudaki ookist ve sporokistleri belirlemede kullanılan IMS analiz yöntemlerinde, antikolar, sudaki atıklar veya *Hammondia hammondi*, *H. heydorni* ve *Neospora caninum* gibi protozoonların sporokist duvarları ile çapraz reaksiyon verebildiğinden özgülüğü oldukça düşüktür (12).

Klinik örneklerde *T. gondii* tespitinde PZR sıklıkla kullanılmasına rağmen, çevresel örneklerde protozoon sayısının oldukça az olması ya da örnekte reaksiyonu etkileyebilecek inhibitörlerin bulunabilmesinden dolayı kullanımı oldukça zahmetlidir (36, 37). Bugün suda *T. gondii* ookistlerinin PZR ile tespitinde, çözüm bekleyen birkaç sorun olmasına karşın DNA izolasyonundan önce flokülasyon veya sükröz gradiyent yöntemi kullanılarak olası handikapların önüne geçilmeye çalışılmaktadır. Bu yaklaşımlarla ookistlerin bir kısmının kaybedilmesi olasılığı yöntemin zayıf yönüdür (21, 22). PZR ile *T. gondii*'nin tespitinde rDNA, SAG-1, B1 ve B30 genleri kullanılmaktadır. Jones ve Dubey (11), su kaynaklarında *T. gondii*'nin saptanmasında PZR testinin yüksek özgülüğe sahip olduğunu belirtmişlerdir. Son yıllarda, su örneklerinde *T. gondii* ookist tanısında PZR, konvansiyonel yöntemlere göre daha sık kullanılmaktadır.

*Toxoplasma gondii* ookistleri klasik dezenfeksiyon işlemlerine karşı dayanıklıdır (9, 36). Özellikle su kaynaklı *Toxoplasma* salgınlarının artışı önleyebilmek için, çevresel sulardaki ookistlerin tespit edilmesini sağlayan deneysel yöntemler gerekmektedir. Ancak, günümüzde *T. gondii*'nin su veya diğer çevresel kaynaklarda tespitini sağlayan hızlı tanı yöntemleri mevcut değildir (36). Bu yazıda protozoal hastalıkları tespit etmek içinde kullanılan moleküler yöntemlerden biri olan LAMP yöntemi (9) hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

### **İlmiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon (Loopmediated Isothermal Amplification - LAMP) Yöntemi**

LAMP yöntemi pek çok fungal, protozoal, viral ve bakteriyel hastalıkları tespit etmek için kullanılan moleküler yöntemlerden biridir (23). LAMP hızlı, düşük maliyetli ve basit bir yöntemdir (11). LAMP prosedürü sabit sıcaklıkta (60-70°C) bir saatte tek bir kopyadan

10 kopya çoğaltabilmesi, dört primer kullanıldığından birkaç DNA kopyasının, bir saat içinde milyarlarca kopya halinde çoğaltabilmesi, "loop primerlerin" reaksiyonu hızlandırabilmesi ve uygulanmasının oldukça basit olması ve yüksek teknik becerilere gerek olmaması yönüyle oldukça avantajlı bir yöntemdir (16). Bu yöntem, PZR'ın aksine sabit bir sıcaklıkta gerçekleşmekte ve termal döngü gerektirmemektedir. Ayrıca, karmaşık ve pahalı ekipmanlara ihtiyaç duyulmadan sadece ısı bloğu ve su banyosu ile yürütülen alternatif bir tanı yöntemidir. Esas olarak, uygun sıcaklık şartlarında dört primer kullanarak DNA hedef alanlarında altı bölge belirleyebilen tek DNA amplifikasyonunun sağlandığı yöntemdir (26, 32, 38). LAMP yönteminde kullanılan primerler:

- I. FIP : İç İleri Primer (Forward Inner Primer),
- II. BIP : İç Geri Primer (Backward Inner Primer),
- III. F3:FOP : Dış İleri Primer (Forward Outer Primer),
- IV. B3:BOP : Dış Geri Primer (Backward Outer Primer)dir

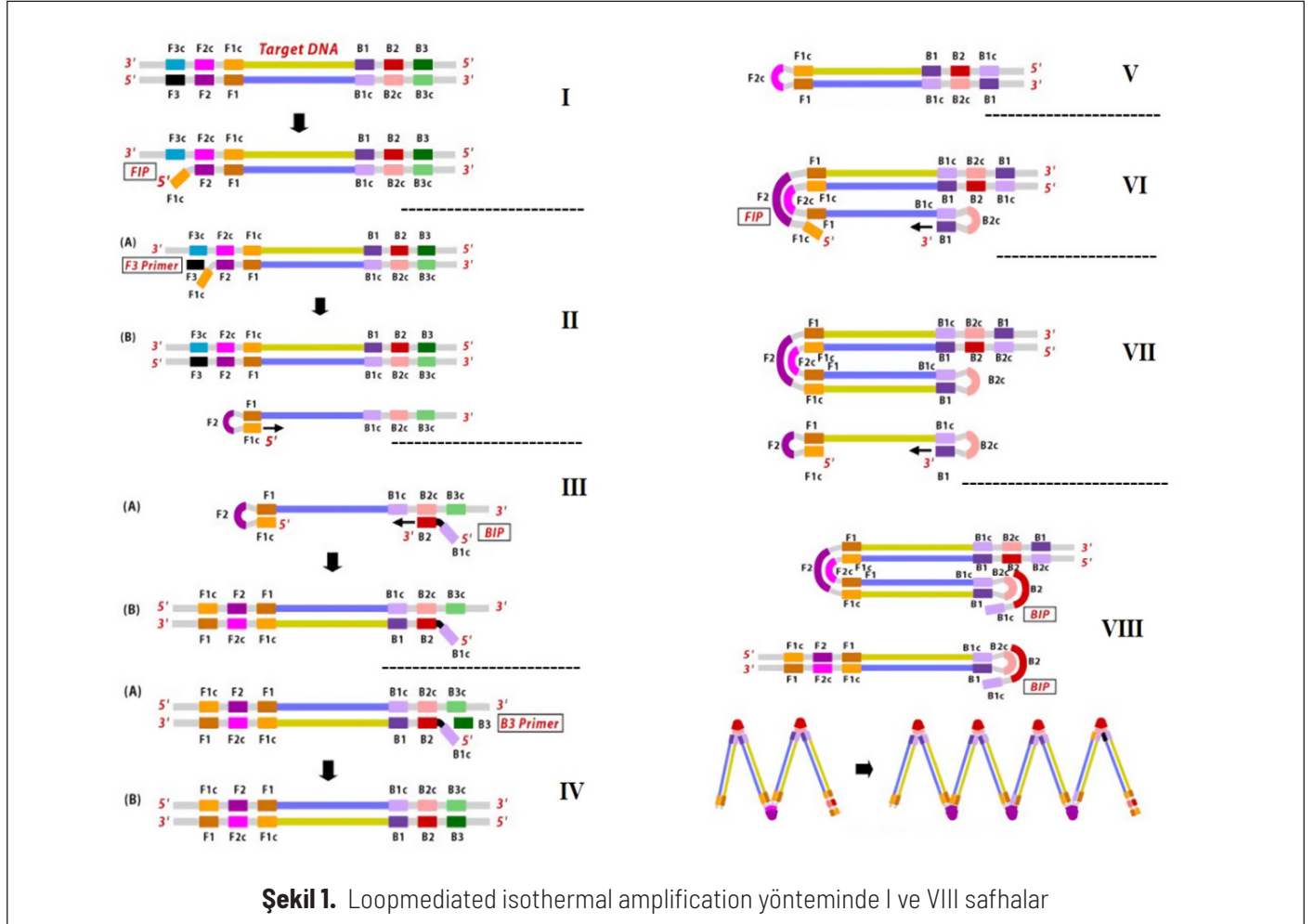
### **LAMP yönteminin safhaları**

1. Hedef DNA bölgesi denatüre olduktan sonra FIP, F2 bölgesinden 3' ucundan 5'ucuna doğru sentezi başlatır (Şekil 1-I).
2. Dış ileri primer (F3), DNA'nın F2c bölgesinden 3' ucundan 5'ucuna doğru sentezi başlatır. İç ileri primerin (FIP) bağlandığı iplikçığı ayırarak yerine geçer ve uzar. Ayrılan iplikçik 5' ucunda bir halka oluşturur(Şekil 1-II).
3. 5' ucunda bir halka olan tekli DNA, İç geri primer (BIP) için şablon görevi görür. BIP'in 5' ucundaki B2 bu DNA'dan 3' den 5' ucuna doğru sentez başlatır. Sonunda 5' ucundaki halkanın açılmasına neden olur(Şekil 1-III).
4. Dış geri primeri (B3), DNA'nın B2c bölgesinden 3' ucundan 5'ucuna doğru sentezi başlatır. BIP'in bağlandığı iplikçığı ayırarak yerine geçer ve uzar. Ayrılan iplikçik 5' ucunda bir halka oluşturur. Her iki uç da halka haline gelerek dambıl şeklini alır(Şekil 1-IV).
5. Dambıl şeklindeki DNA bir kökilmek yapısına dönüştürülür.

Bu yapı LAMP reaksiyonunun ikinci aşaması olan LAMP çevrimi için başlatıcı görevi görür(Şekil 1-V).

6. LAMP çevrimini başlatmak için FIP kök döngü DNA yapısına adapte olur. Stand sentezi buradan başlatılır. F1 ipliği yer değiştirir ve 3' ucunda yeni bir halka yapısı oluşur(Şekil 1-VI).
7. Nükleotidlerin B1'in 3' ucuna eklenmesiyle yeni bir dambıl şeklinde DNA oluşur (Şekil 1-VII).

8. Daha sonraki reaksiyonda BIP yer değiştirme reaksiyonu için şablon olarak görev alır. Böylece bir LAMP hedef sekansı her yarım turda 13 kat büyür. Elde edilen nihai ürünler çeşitli kök uzunluklarına sahip DNA'lar ve çoklu döngülere sahip karnabahar benzeri yapılarıdır(Şekil 1-VIII).



Bu primerlerin doğal yapıları nedeniyle LAMP'da üretilen DNA miktarı PZR tabanlı amplifikasyondan önemli ölçüde daha yüksektir. LAMP ürünleri etidium bromide ile boyanıp agaroz jelde yürütülerek gözlenebildiği gibi, pozitif örnekler floresan boya konmuş tüplerde yeşil refle verdiği için gözle de görülebilir. Ayrıca türbidite yöntemiyle örnek tüplerine magnezyum fosfat konduğunda da beyaz çökelti şeklinde görülebilir (18). LAMP yöntemi çıplak gözle dahi kolayca

görülebilir (Şekil 2) reaksiyonlar vermesi nedeniyle de önemsenmektedir (8).





Bu yöntem konvansiyonel PZR'dan daha özgül ve duyarlıdır. LAMP ile veteriner, hasta ve su örneklerinde *T. gondii* SAG1, 529-bp repeat element, B1, SAG2, GRA1, ookist duvar proteini (OWP) geni ve 18S rRNA'ları tanımlamak mümkün olmaktadır. Enfeksiyondan 2 gün sonra (yani erken dönemde), enfekte domuz kanında; SAG1'e dayalı LAMP metodu ile tanımlama gerçekleştirilir ki bu da hastalığın erken fazda tanımlanması adına önemlidir. İnsanlarda kan örneklerinde LAMP ile *T. gondii* SAG1, B1 ve SAG2 genleri tespit edilebilmektedir (22, 28). Ayrıca su örneklerinde de bu hedef alanlar tespit için kullanılabilir (26).

Son 20 yılda moleküler biyolojide izlenen gelişmeler, birçok bilim alanında olduğu gibi parazitoloji de yeni kullanım ve uygulama alanları oluşturmuştur. Böylece paraziter hastalıkların tanımlanması ve kontrolüne yönelik yeni yaklaşımların ortaya çıkmasına imkan sağlamıştır (14). Özellikle nükleik asit esaslı moleküler gelişmeler, parazitoloji bilimine, duyarlılığı ve özgüllüğü artıran alternatif tanı yöntemlerinin kullanımına olanak sağlamıştır. Bu teknikler parazitolojide tanı, tedavi, genetik tiplendirme, sistematik (taksonomi ve filogeni) populasyon genetiği, ekoloji, epidemiyoloji, antiparazitik ilaç ve aşı geliştirilmesi, ilaç direncinin anlaşılması ve parazit genom çalışmaları gibi konularda uygulama alanı bulmuştur (6).

## SONUÇ ve ÖNERİLER

Sularda tespiti dünyada da ihmal edilen etkenlerden olan protozoonlar, salgınlar yapmaya başlamasıyla dikkat çekici hale gelmiştir. Bugün moleküler yöntemlerdeki hızlı yenilenme ve gelişmeler sularda protozoonların tespitini kolaylaştırmaktadır. Ülkemizde ve dünyada içme suları, ırmak, göl, şebeke, doğal kaynak gibi farklı kalite ve kökündeki sularda *T. gondii* araştırmasına dair birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların büyük çoğunluğu moleküler esaslara dayanmaktadır. İlgili

metotlar arasında en sık kullanılanları PCR ve LAMP yöntemleridir. Bu çalışmalarla, yöntemler arasındaki özgüllük ve duyarlılık farklılıkları da ortaya konmuş, teknikler arasındaki avantaj ve dezavantajlar belirlenmiştir (19, 20, 22, 23, 31, 32, 38). *T. gondii* - su ilişkisi ve ülkemizde çevresel suların halk arasında rahatlıkla kullanılıyor olması durumu düşünüldüğünde, *T. gondii*'nin ihmal edilmemesi gereken bir protozoon olduğu görülmektedir. Klorlama ve flitrasyon işlemlerinin yetersiz olması birçok protozoon olduğu gibi, *T. gondii* için de önem taşımaktadır. Özellikle gebelerde ve immün sistemi baskılanmış kişilerde ciddi hastalıklara neden olabilen *T. gondii* için, rutin kullanımdaki suların analizinde moleküler çalışmalar ile taramalar yapılması konusunun üzerinde hassasiyetle durulması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. **Akçay, S, Pamukçu M, Baran S,** (1950). First observation of toxoplasmosis in dogs (in Turkey).Türk Veteriner Hekimleri Derneği Dergisi 20, 245-254.
2. **Altıntaş N,** (2008). Parasitic zoonotic diseases in Turkey. Vet Ital 44 (4), 633-646.
3. **Baldursson S, Karanis P,** (2011). Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. Water Res 45 (20), 6603-14. Doi: 10.1016/j.watres.2011.10.013.
4. **Benenson MW, Takafuji ET, Lemon SM, Greenup RL, Sulzer AJ,** (1982). Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. N Engl J Med. 307 (11), 666-9. DOI: 10.1056/NEJM198209093071107.
5. **Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac-Renton JL, Bell A, Eng SB, et al,** (1997). Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC *Toxoplasma* Investigation Team. Lancet 350(9072), 173-7.
6. **Bişkin Z, Yıldırım A, İnci A, Düzlü Ö,** (2011). Parazitolojide teşhis amaçlı kullanılan moleküler biyolojik teknikler. Erciyes Üniv. Vet Fak Der 8(1), 43-51.
7. **CDC** (Center for Disease Control and Prevention) Toxoplasmosis. 2016. <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>. Erişim tarihi: 27.03.2016
8. **Çavuşoğlu C,** (2016). Erişim adresi: [http://www.ankaramikrobiyoloji.org.tr/docs/8kongre/Cengiz\\_Cavusoglu.pdf](http://www.ankaramikrobiyoloji.org.tr/docs/8kongre/Cengiz_Cavusoglu.pdf). Erişim tarihi:23.11.2016.
9. **Demirel E, Kolören Z, Karaman Ü, Ayaz E,** (2014). Giresun'da su örneklerinde *Toxoplasma gondii*'nin polimeraz zincir reaksiyonu ve ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon yöntemiyle araştırılması. Mikrobiyol Bul 48(4):661-668.
10. **Dubey JP,** (2008). The History of *Toxoplasma gondii*—The First 100 Years. J. Eukaryot. Microbiol 55(6), 467-475. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2008.00345.x.
11. **Dubey JP, Lindsay SD, Speer CA,** (1998). Structures of *T.gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. Clinical Microbiology Reviews 11(2), 267-299.
12. **Dumètre A, Dardé ML,** (2007). Detection of *Toxoplasma gondii* in water by an immunomagnetic separation method targeting the sporocysts. Parasitol Res101(4), 989-96. DOI: 10.1007/s00436-007-0573-0.
13. **Durdu B,** (2008). **Sağlıklı gebelerde *Toxoplasma* IgG avidite değerlerinin incelenmesi ve seropozitifliğe etki eden çeşitli faktörlerin araştırılması.** Uzmanlık tezi. TC. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği. İstanbul.
14. **Gasser RB,** (2006). Molecular tools—advances, opportunities and prospects. Vet Parasitol 136(2), 69-89. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.12.002.
15. **İnci M, Yağmur G, Aksebzeci T, Kaya E, Yazar S,** (2009). **Kayseri'de kadınlarda *Toxoplasma gondii* seropozitifliğinin araştırılması.** Türkiye Parazitolojisi Derg 33 (3), 191 - 194.
16. **Jones JL, Dubey JP,** (2010). Waterborne toxoplasmosis—recent developments. Exp Parasitol 124(1), 10-25. DOI: 10.1016/j.exppara.2009.03.013.
17. **Keenihan SH, Schettters T, Taverne J,** (2002). In brief. Trends in Parasitology 18(5), 203-204.
18. **Koloren Z, Avşar C, Şekeroğlu ZA,** (2010). Protozoonların tanısında ilmiğe dayalı izotermal çoğaltma yöntemi. Türkiye Parazitolojisi Derg 34, 207-11. DOI: 10.5152/tpd.2010.16.
19. **Koloren Z, Demirel E,** (2013). Detection of *Toxoplasma gondii* in Turkish river and drinking water samples by different PCR and LAMP Methods. Clean Soil Air Water 41(10), 963-8. DOI: 10.1002/clen.201200468.
20. **Koloren Z, Demirel E,** (2013). Investigation on *Toxoplasma gondii* in surface and drinking water samples from Amasya by nested polymerase chain reaction. Journal of Applied Biological Sciences 7(2), 10-3.
21. **Kourenti, C, Karanis P,** (2004). Development of a sensitive polymerase chain reaction method for the

- detection of *Toxoplasma gondii* in water. Water Sci Technol 50, 287-29.
22. **Kourenti C, Karanis P**, (2006). Evaluation and applicability of a purification method coupled with nested PCR for the detection of *Toxoplasma* oocysts in water. Lett Appl Microbiol 43(5), 475-81. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2006.02008.x.
  23. **Mahmoudi MR, Kazemi B, Haghghi A, Karanis P**, (2015). Detection of Acanthamoeba and *Toxoplasma* in river water samples by molecular methods in Iran. Iran J Parasitol 10(2), 250-257.
  24. **Meireles LG, Ekman CCJ, Andrade HF, Luna EJA**, (2015). Human toxoplasmosis outbreaks and the agent infecting form. Findings from a systematic review. Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo. 57(5):369-376. DOI: 10.1590/S0036-46652015000500001.
  25. **Montoya JG, Liesenfeld O**, (2004). Toxoplasmosis. Lancet 363, 1965-1976. DOI: 10.1086/338827.
  26. **Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N**, (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res 28, 63E.
  27. **Özcel M**, (2007). Toxoplasmosis. 141-189. In: Özcel MA, Özbel Y, Ak M.(Eds) Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. 1. Baskı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir.
  28. **Paris DH, Blacksell SD, Newton PN, Day NP**, (2008). Simple, rapid and sensitive detection of *Orientia tsutsugamushi* by loop-isothermal DNA amplification. Trans R Soc Trop Med Hyg 102(12), 1239-46. DOI: 10.1016/j.trstmh.2008.04.040.
  29. **Pappas G, Roussos N, Falagas ME**, (2009). Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. Int. J. Parasitol 39, 1385-1394. DOI: 10.1016/j.ijpara.2009.04.003.
  30. **Palanisamy M, Phill M, Madhavan B, Balasundaram MB, Andavar R, Venkatapathy N**, (2006). **Outbreak of ocular toxoplasmosis in Coimbatore, India.** Indian J Ophthalmol 54, 129-131.
  31. **Sroka J, Wójcik-Fatla A, Dutkiewicz J**, (2006). Occurrence of *Toxoplasma gondii* in water from wells located on farms. Ann Agric Environ Med 13(1), 169-75.
  32. **Sotiriadou I, Karanis P**, (2008). Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Toxoplasma gondii* in water samples and comparative findings by polymerase chain reaction and immunofluorescence test (IFT). Diagn Microbiol Infect Dis 62(4), 357-65. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.07.009.
  33. **Tlamçani Z, Lemkhenete Z, Lmimouni BE**, (2013). **Toxoplasmosis: the value of molecular methods in diagnosis compared to conventional methods.** JMID 3 (2), 93-99. DOI: 10.1016/j.cimid.2012.10.006.
  34. **Unat EK, Yücel A, Atlaş K, Samasti M**, (1991). Unat'ın Tıp Parazitolojisi. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi yayınları, İstanbul. 601-622.
  35. **Vanwormer E, Fritz H, Sharipo K, Mazet JAK, Conrad PA**, (2013). Molecule stomodelling: *Toxoplasma gondii* oocysts at the human animal environment interface. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 36(3), 217- 231. DOI: 10.5799/ahinjs.02.2013.02.0089
  36. **Illena I, Aubert D, Gomis P, Ferte H, Ingland JC, Bisiaux HD, et al**, (2004). Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. Applied and Environmental microbiology 70 (7), 4035-4039. DOI: 10.1128/AEM.70.7.4035-4039.2004.
  37. **Yang W, Lindquist HDA, Cama V, Schaefer FW, Villegas E, Fayer R, et al**, (2009). Detection of *Toxoplasma gondii* Oocysts in Water Sample Concentrates by Real-Time PCR. Appl. Environ. Microbiol 75(11), 3477-3483. DOI: 10.1128/AEM.00285-09.
  38. **Zhang H, Thekiso OM, Aboje GO, Kyan H, Yamagishi J, Inoue N, et al**, (2009). *Toxoplasma gondii*: sensitive and rapid detection of infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. Exp Parasitol 122(1), 47-50. DOI: 10.1016/j.exppara.2009.01.012.