

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***TOXOPLASMA GONDII* ANTİJENLERİNİN KARAKTERİZASYONU**

**Kerem YAMAN**

**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
PARAZİTOLOJİ YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Çiğdem GÜNGÖR**

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü 91 no'lu projesi tarafından desteklenmiştir.**

**2007- ANKARA**

## İÇİNDEKİLER

|                         |     |
|-------------------------|-----|
| Kabul ve Onay           |     |
| İçindekiler             | i   |
| Önsöz                   | iii |
| Simgeler ve Kısaltmalar | iv  |
| Şekiller                | v   |

### 1.GİRİŞ

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| 1.1. Amaç                                      | 1  |
| 1.2. Tarihçe                                   | 2  |
| 1.3 Sınıflandırma                              | 3  |
| 1.4 Biyolojik Yaşam Döngüsü                    | 4  |
| 1.5. Bulaşma Yolları                           | 7  |
| 1.6. Epidemiyoloji                             | 9  |
| 1.7. <i>Toxoplasma gondii</i> Antijenik Yapısı | 10 |
| 1.8. Patogenez ve Patoloji                     | 15 |
| 1.9. Tanı                                      | 19 |
| 1.10. Tedavi                                   | 20 |

### 2. MATERYAL VE METOD

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1. Çalışmada Kullanılan Suşlar                                       | 22 |
| 2.2. RH ve Ankara Suşu Takizoitlerinin Fare Peritonu İçinde Üretilmesi | 22 |
| 2.3. TS-4 Suşu Takizoitlerinin Hücre Kültüründe Üretilmesi             | 22 |
| 2.4. Takizoitlerin Parçalanması ve Antijenlerin Serbestlenmesi         | 23 |
| 2.5. Bradford Yöntemiyle Protein Konsantrasyon Tayini                  | 24 |
| 2.6. Antijenleri Yoğunlaştırmak için Liyofilizasyon                    | 24 |
| 2.7. SDS- PAGE ile Antijenlerin Yürütülmesi                            | 25 |
| 2.8. Jelin Polikromatik Gümüş Boyasıyla Boyanması                      | 25 |
| 2.9 Testlerde kullanılan çözelti ve reaktanlar                         | 26 |

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| <b>3. BULGULAR</b>          | 30 |
| <b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> | 32 |
| <b>ÖZET</b>                 | 37 |
| <b>SUMMARY</b>              | 38 |
| <b>KAYNAKÇA</b>             | 39 |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>             | 43 |

## ÖNSÖZ

İlk başta çalışmalarım boyunca bilgisinden ve desteğinden yararlandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Çiğdem Güngör'e ve tezimin deneysel aşamasında büyük yardımı dokunup, olanaklar sağlayan Sayın Prof. Dr. Haluk Ataoğlu'na çok teşekkür ediyorum. Çalışmamda yine yanımda olan ve manevi desteğini esirgemeyen Sayın Uzm. Dr. Gülay Aral Akarsu'ya da teşekkürü bir borç bilirim. Yüksek lisansımın ilk yılında engin bilgilerinden yararlandığım ve Parazitoloji Bilim Dalı'nın kurucusu olan emekli Sayın Prof. Dr. Kürşat Altıntaş'a da şükranlarımı iletiyorum.

Ayrıca Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.B.D 'nin tüm hocalarına, uzmanlarına, asistan arkadaşlara ve çalışanlarına teşekkür ediyorum. Laboratuvar çalışanlarımız Sayın Mustafa Kızılyar ve Sayın Meral Mert'e deneysel aşamadaki yardımlarından ötürü teşekkür ediyorum.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                |                                                           |
|----------------|-----------------------------------------------------------|
| g.....         | gram                                                      |
| kDa.....       | kilodalton                                                |
| l.....         | litre                                                     |
| ml.....        | mililitre                                                 |
| mg.....        | miligram                                                  |
| μ.....         | mikron                                                    |
| μl.....        | mikrolitre                                                |
| °C.....        | Santigrad derece                                          |
| s.....         | saniye                                                    |
| dk.....        | dakika                                                    |
| ELISA.....     | Enzyme Linked Immunosorbent Assay                         |
| EST.....       | Ekskretuar ve Sekretuar Antijenler                        |
| GRA.....       | Yoğun Granül Proteinleri                                  |
| IFA.....       | İndirekt Floresans Antikor                                |
| Ig.....        | Immunglobulin                                             |
| IHA.....       | İndirekt Hemaglutinasyon                                  |
| MIC.....       | Mikronem Proteinleri                                      |
| ROP.....       | Rhoptri Proteinleri                                       |
| SAG.....       | Yüzey antijenleri (Surface Antigens)                      |
| SDS- PAGE..... | Sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel<br>Elektroforezi |

## ŞEKİLLER

Şekil 1: *T.gondii*'nin üç biyolojik formunun birbirine dönüşmesi

Şekil 2: Giemsa ile boyalı *T.gondii* takizoitleri

Şekil 3: Floresans ile görülen takizoitler

Şekil 4: Doku kisti içinde bradizoitler

Şekil 5: Takizoit organel yerleşimi

Şekil 6: Hücreyi parçalayan takizoitler

Şekil 7: Ankara ve RH suşunun protein ladder ile karşılaştırılması

Şekil 8: TS-4 suşunun protein ladder ile karşılaştırılması

Şekil 9: S22 ve S23 verilen farelerin 12-13 günlük takipleri

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Amaç

*Toxoplasma gondii* dünyada yaygın olarak gözlenen ve zorunlu hücre içi yerleşim gösteren protozoon bir parazittir. Toksoplazmoz hastalığının etkenidir. İnsanlarda ve tüm sıcak kanlı hayvanlarda hastalığa yol açabilmektedir. İnsanlarda, özellikle immun sistemi baskılanmış olan kişilerde ciddi klinik belirtilere sebep olurken hayvanlarda da düşük ve ölü doğumlara yol açmakta ve ülke ekonomisine zarar vermektedir (Altıntaş K. 2002).

İnsanlar için diğer bir önemi *T. gondii*'nin konjenital bulaşmasıdır. Doğacak olan çocuğa bulaşan parazit önemli klinik belirtiler verecektir. Düşükle sonuçlanan olgular olacaktır. Gelecek kuşakların sağlığı için dikkat edilmesi gereken bir parazit hastalığıdır. Dünyadaki seroprevalansı, coğrafyaya göre farklılık gösterse de ortalama %30'dur. Bu oran ülkemizde %40'a çıkmaktadır. Bulaş yollarını düşünecek olursak hayvancılığın yaygın olduğu ve kişisel hijyen kurallarına pek uyulmadığı ülkemizde oranın daha yüksek çıkması anlaşılmaktadır (Altıntaş K. 2002).

*T. gondii* için aşı çalışmaları devam etmektedir. Hayvanlar için kullanılan ve attenüe S48 suşundan hazırlanmış bir aşı bulunmaktadır. Aşının virulans kazanıp, hastalık oluşturabilme potansiyeli olduğu için insanlarda uygulanmamaktadır. Toksoplazmoz tanısı koyulurken direkt olarak etkeni PCR ile göstermek pahalı ve deneyimli eleman gerektiren bir işlem olduğu için çoğu merkezde serolojik tanı yöntemleri tercih edilmektedir. Akut hastalık tanısında önem kazanan IgM antikorları 4 hafta içinde oluşmaya başlayıp en geç 2 yıl içinde kaybolmaktadır. IgG antikorları ise daha geç yükselip daha uzun süre pozitif kalmaktadırlar. Özellikle obstetrik durumda tanının hızlı ve kesin bir biçimde yapılması fetusun ve annenin sağlığı açısından önemlidir. Serolojik tanılarda emin olarak kullanılacak antijen yapılarına ihtiyaç vardır (Zenner ve ark. 1999).

Antijenik yapılar *T. gondii*'nin suşundan suşuna farklılık göstermektedir. Her suş virulan olarak kabul edilmemekte ve virulan olan suşlarda kendi aralarında değişiklikler içermektedir. Bu yüzden antijenik yapıların anlaşılması hem tanı hem aşı çalışmaları için değer taşıyan bir durumdur. *T. gondii*'nin antijen yapıları yüzeysel ve ekskretuar-sekretuar antijenler olarak ayrılmaktadır. Bazıları tanımlanmış ve işlevleri anlaşılmış olsa da konak canlıyla girdikleri ilişkiler ve oluşturacakları immun yanıtın niteliği hala tam olarak bilinmemektedir. Antijen yapıları arasında 30 kDa ağırlığındaki yüzey antijeni üstünde çok çalışılmış ve virulans üstüne etkisi saptanmış olan bir antijendir. Antijenik yapıların konakta oluşturacağı yanıtın koruyuculuk seviyesi aşı çalışmalarında ve tanı yöntemlerinde önem kazanmaktadır. Yüksek seviyede immun yanıt oluşturan antijenler saflaştırılıp incelendiği takdirde yeni enfeksiyonların önlenmesi ve tanı için daha kesin sonuca gidecek serolojik yöntemler geliştirilmesine yol açacaktır (Lekutis ve ark. 2001).

Suşlar yapılan çalışmalarda gruplandırılmış ve üstünde sık çalışılan RH suşu tip I suşları arasına girmiştir. 1941 yılında izole edilen RH suşu virulan bir suştur. Bu çalışmada antijenik yapıları üstüne çalışmalar yapılmış olan RH suşu ile 1973 yılında Altıntaş tarafından izole edilen virulan Ankara suşu ve avirulan olup hücre kültüründe seri pasajlarla devam ettirilen TS-4 suşunun antijenik yapıları belirlenmiş ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

## 1.2. Tarihçe

*T. gondii* ilk olarak 1908 yılında Nicolle ve Manceaux adında iki araştırmacı tarafından *Ctenodactylus gundii* adında bir kemirgenden izole edilmiş ve yeni bir tür olduğu anlaşılmıştır. Aynı yıl içerisinde Splendore tarafından tavşandan izole edilmiştir. 1910 yılında Mello köpeklerde hastalık yaptığını bulmuştur. 1923 yılında Janku insanda ilk defa tanımlamış ve göze yerleştiğini saptamıştır. 1937 yılında Wolf ve Cowen konjenital bulaşı tespit etmişlerdir; 1940 yılında yetişkinlerde meydana getirdiği hastalığın ölümcül olabileceği Pinkerton ve Weinman tarafından

anlaşılmıştır. Sabin 1942 yılında insanlardaki hastalığı tam olarak nitelemiş, 1948 yılında Sabin ile beraber Feldman günümüzde de hala kullanılan boyama testini bulup ilk olarak uygulamışlardır. 1952’ de Slim, insanda salgı bezlerine yerleşen olguları bildirmiştir. Weinman ve Chandler tarafından 1954 yılında etçiller arasındaki geçiş gösterilmiştir. Harvey ve Marshall 1957’de koyunlarda düşüğe yol açtığını tespit etmişler; 1959 yılında Beverley farelerde tekrarlayan konjenital bulaşı gözlemlemiştir. 1960’da Jacobs doku kistlerini tanımlamış; 1965’de Hutchison, fekal oral yolla bulaşabileceğini belirtmiştir. Frenkel 1970 yılında ara konak ve son konak olan canlıları belirlemiş; 1972 yılında Miller beş farklı *T. gondii* suşunu tanımlamıştır, aynı yıl içerisinde kedilerin etkenin dağılımındaki rolleri Munday tarafından açıklanmıştır (Dubey J.P. 1993).

Ülkemizde ilk olarak 1950 yılında Akçay, Pamukçu ve Baran tarafından bir köpekte tespit edilmiştir. 1953 yılında Unat, Alyanak ve Şahin tarafından ilk kez insanda gözlenmiştir. 1967 yılında ülkemizde toksoplazmoz için serolojik tanı yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Ekmen ve Altıntaş tarafından 1973 yılında köpekten izolasyon yapılmıştır ve bir yıl sonra Ekmen, Altıntaş ve Altay konjenital toksoplazmozlu bir bebekten *T. gondii*’yi izole etmişlerdir. Altıntaş 1977 ve 1981 yıllarında koyun, keçi ve sığırlarda toksoplazmoz araştırması yapmıştır (Altıntaş K. 2002).

### 1.3. Sınıflandırma

Bu etkenin günümüzde kullanılan sınıflandırması 1980 yılında Levine ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu sınıflandırma aşağıdaki şekildedir.

- Subregnum : Protozoa
- Phylum : Apicomplexa
- Subclass : Coccidia
- Order: Eucoccidia
- Suborder: Eimerina
- Genus: Toxoplasma

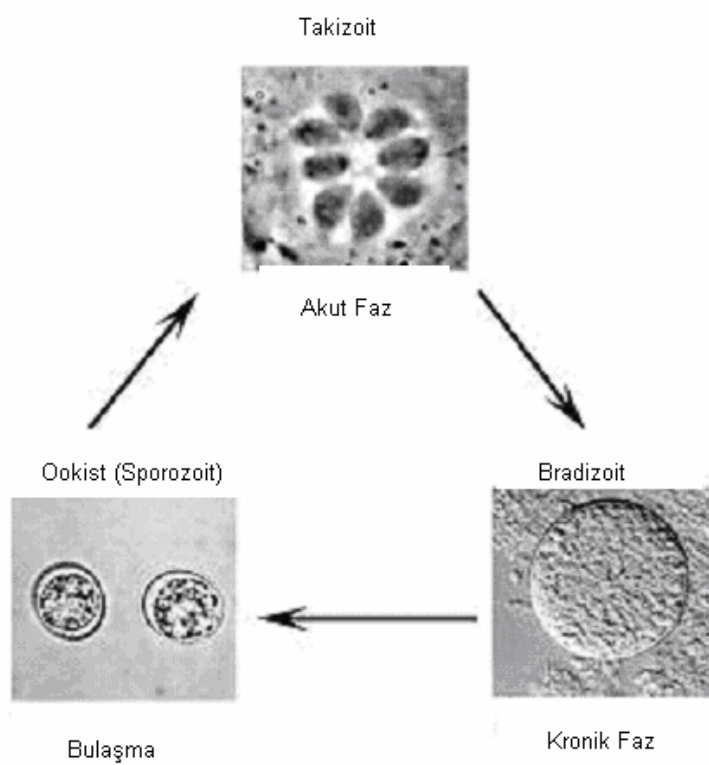
- Species: *Toxoplasma gondii*

#### 1.4. Biyolojik Yaşam Döngüsü

*Toxoplasma gondii*'nin yaşam döngüsünde üç biyolojik form bulunmaktadır. (Şekil 1)

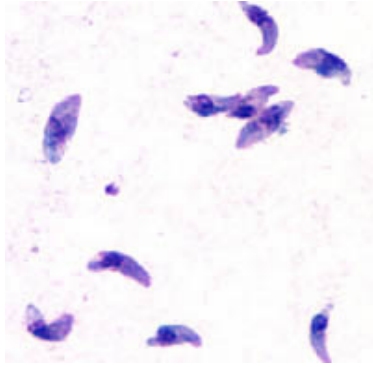
- Takizoit form
- Bradizoit form
- Ookist form

Bu formlar parazitin çeşitli yaşam dönemlerinde birbirlerine dönüşerek döngüyü tamamlamaktadırlar (Beaman M.H. 1995).

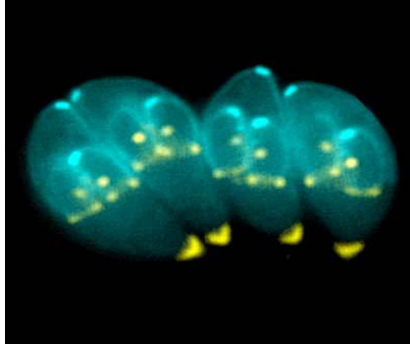


Şekil 1 : *T. gondii*'nin üç biyolojik formunun birbirine dönüşmesi ([www.toxomap.wustl.edu/life\\_cycle.html](http://www.toxomap.wustl.edu/life_cycle.html))

Takizoit form, parazitin hızlı çoğalma gösteren invaziv formudur (Şekil 2 ve Şekil 3). Boyu 4-8  $\mu$  ve eni 2-4  $\mu$  büyüklüğündedir. Direkt mikroskopide ve boyamalarda karakteristik muz yada portakal dilimi şeklinde görülmektedir. Hareketini kayma ve burkulma ile sağlamaktadır (Nichols B.A. 1987). Takizoit ara konakların hücrelerinde bulunan formdur ve endodiyogeni ile çoğalmaktadır. Endodiyogeni ile çoğalmada, etken hücreye girdikten sonra 90 s kadar hareketsiz kalmakta, ardından hücre çekirdeğine yakın bir noktaya yerleşmektedir. Parazitofor vakuol yapısı içinde önce sivrilğini kaybedip yuvarlaklaşmakta ve boyutları büyümektedir. Bir süre sonra orta hattan dikine ikiye bölünerek endodiyogeni tamamlanmaktadır. Takizoit çifti uzun bir süre karakteristik V şeklinde yapışık kalmakta ancak çekirdek bölünmesini takiben tamamen ayrılmaktadır. Tüm bu işlemler 45 dakika kadar sürmektedir. Bir hücreyi invaze eden birden fazla takizoit bölünerek hücre içinde yelpaze yada rozet formasyonu biçiminde dizilim göstermektedirler (Akisü Ç., Budak S. 1998).

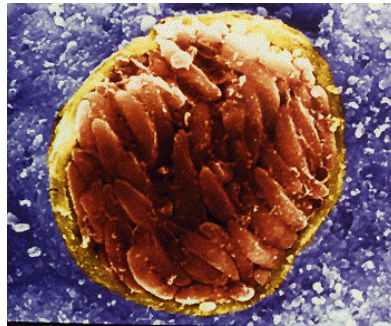


Şekil 2 : Giemsa ile boyalı *T. gondii* takizotleri (www.stanford.edu/toxoplasmosis/index.html)



Şekil 3 : Floresans ile görülen takizoitler ( [www.gutcsu.it](http://www.gutcsu.it))

Bradizoit form (Şekil 4) ara konakların çeşitli dokularında bulunan ve hücre vakuölü içerisinde doku kistlerini meydana getiren formdur. Bu yapı şekil olarak takizoitlere benzese de, çekirdek arka uca daha yakın yerleşimlidir ve daha fazla glikojen taneciği bulundurmaktadır. Ara konak dokularında oluşan bu kistler 120  $\mu$  çapa ulaşabilmekte ve içinde 3000 kadar bradizoit yapısı barındırabilmektedir. Bradizoit form daha yavaş çoğalmakta ancak belli nedenlerle doku kisti patladığında, kan yada lenf dolaşımı yoluyla diğer organlara yayılım göstermektedir. Bu formlar iç organlarda, özellikle çizgili kas, kalp kası, uterus ve beyinde salgılarıyla ikinci bir çeper oluşturup yapısını güçlendirmektedir. Bradizoit yapıları PAS ve Giemsa gibi boyalarla iyi boyanmaktadırlar. Özellikle hayvanlarda yapılan çalışmalarda, oluşan doku kistlerinin canlılığının yaşamı boyunca varlığını devam ettireceği, çoğu organa yerleşebildiği ancak beyin ve çizgili kas dokusunu tercih ettikleri ortaya konulmuştur (Altıntaş K. 2002) (McLeod R., Remington J.S. 1995).



Şekil 4: Doku kisti içinde bradizoitler (www.idmed.ubc.ca/assets/Toxoplaama225.j pg)

Ookist formu son konak olan kedigillerin barsaklarında epitel hücrelerine yerleşen ve parazitin seksüel (eşeyli) çoğalmasından sorumlu olan yapıdır. Kedigillerin barsaklarında epitel hücrelerinde önce şizogonik bir çoğalma, ardından gamegonik çoğalma görülmekte, makrogametosit ve mikrogametosit meydana gelmektedir. Bu yapılar olgunlaşarak döllenme sonrasında zigotu oluşturacak makrogamet ve mikrogamete dönüşürler. Zigot yapısının içinde ookistler bulunmaktadır. Epitel hücrenin parçalanmasıyla barsak lümenine dökülen ookistler, dışkılamayla dış ortama atılmaktadırlar. Ovalimsi, 10-14 µ büyüklükte olan bu yapılar, atıldıkları zaman enfektif özellikte değildirler. Uygun çevresel koşullarda kedi dışkısı içinde bulunan ookistler, sporlanma olarak adlandırılan bir süreçten geçerek bulaşıcı özellik kazanmaktadırlar. 24°C’de ve uygun nem koşullarında 2-3 gün içinde sporlanma işlemi tamamlanmaktadır. Yapılan gözlemlerde sporlanma için 15° C’de 8 gün, 10°C’de ise 21 gün kadar süre gerektiği saptanmıştır. Ookistler 4° C’de enfektif özelliklerini bir yıl kadar sürdürebilmektedir. 65°C ve üstündeki sıcaklıklarda canlılıklarını yitirmektedirler. Ookistlerin oral yolla diğer canlılar tarafından alınması ile biyolojik döngü tamamlanmaktadır ( Mcleod R., Remington J.S. 1995).

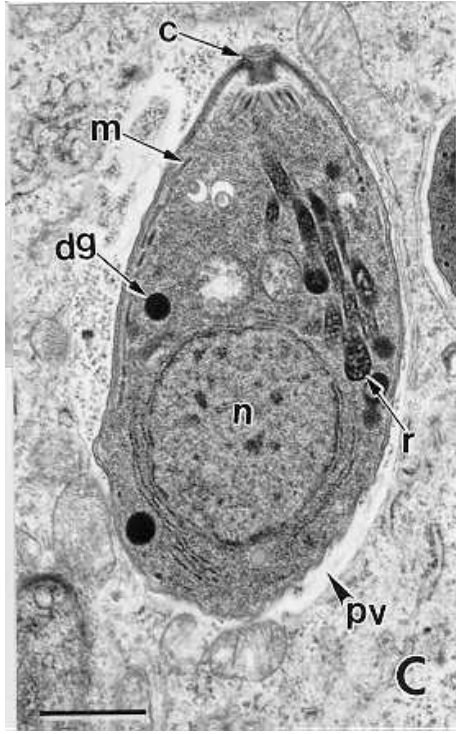
### **1.5. Bulaşma Yolları**

*Toxoplasma gondii*’ nin iki bulaş yolu vardır.

1. Edinsel bulaş
2. Konjenital bulaş

Edinsel bulaşdan *Toxoplasma gondii*'nin üç formu da sorumludur (Şekil 5) İnsanlara en sık ookistlerle kirlenmiş gıdaların yenilmesi yada suların içilmesiyle bulaşmaktadır. Ellere bulaşmış ookistlerin de oral yolla alınması mümkündür. İnsanların bundan korunabilmesi için, kedilerin bulunduğu yerlerde et kesilmemesi, kanalizasyon sularının ve kedi dışkılarının içme suyu kaynaklarıyla temas etmemesi ve temel hijyen kurallarına dikkat edilmesi gibi basit kurallara uyulması yeterli olmaktadır. Besi hayvanlarına bulaşan *T. gondii*'nin etlerde oluşturduğu doku kistleri de bulaşda rol oynamaktadır; bu etlerin çiğ yada az pişmiş olarak tüketilmesi bulaşa yol açmaktadır. Doku kistleri mide asidine dayanıklı olduklarından, canlılıklarını kaybetmeden barsaklara ulaşmaktadır. Bundan korunmak amacıyla etleri iyice pişirmek yada -15°C'de üç gün bekleterek bradizoitlerin canlılığını kaybetmelerini sağlamak gerekmektedir. Takizoitlerle bulaş oldukça seyrek görülen bir yoldur. Vücutta veya ağızda herhangi bir açık yara varsa yada bir kaza sonucu bulaşma olabilmektedir. Bu form mide asidine dayanıklı olmadığı için ağız yoluyla alındığı zaman bulaş olmamaktadır. Çok seyrek olarak kan transfüzyonu yada organ nakli sırasında takizoit formlarla bulaş meydana gelebilmektedir (Altıntaş K. 2002).

Takizoit formun esas olarak önem kazandığı nokta konjenital *T. gondii* bulaşıdır. Konjenital bulaşta annenin plasentasına yerleşmiş olan doku kistleri çeşitli fizyolojik, travmatik yada sekonder enfeksiyonlara bağlı olarak parçalandığı takdirde, içinde barındırdığı bradizoitler serbest kalmakta ve takizoit forma dönüşerek fetusu enfekte etmektedir (Altıntaş K. 2002)



Şekil 5:Takizoit organel yerleşimi , pv: parazitofor vakuol, n: çekirdek, r: rhoptri, dg: yoğun granüller, m:mikronemler, c: apikal bölgede konoid yapı (www.modares.ir /Proto/lectures/week10.html)

## 1.6. Epidemiyoloji

*T. gondii* dünyada sık görülen bir protozoon parazittir. Doğal ortamda ookistlerin kedigiller tarafından serbestçe yayılması tüm canlıları toksoplazmoz açısından risk altına sokmaktadır. Etkeni barındıran kedigil bunu dikey olarak yavrusuna da geçirebilmekte ve böylece *T.gondii*'yi yayma potansiyeli kuşaktan kuşağa aktarılabilir. Yapılan araştırmalarda dünyadaki kedigillerin yaklaşık %1'inin *T. gondii* ookisti saçımında rol oynadığı gösterilmiştir (Beaman ve ark., 1995). *T. gondii* prevalansı dünyanın farklı coğrafyalarında kişilerin yaşam tarzlarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Çiğ yada az pişmiş et ürünlerinin yenilebildiği yerlerde seropozitiflik %50'ler seviyesine ulaşmaktadır. Örneğin Alaska'da % 28 prevalans değeri elde edilirken, Panama' da % 57 oranında pozitiflik saptanmıştır (Smith J.L 1991). Fransa' da yapılan bir çalışmada, Paris'te yaşayan kadınlarda *T.*

*gondii*' ye karşı oluşmuş antikorlarda % 84 oranında pozitiflik olduğu ve bu değerin Londra' da bulunan % 32 değerinden daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bu yüksek değer Fransa' da az pişmiş et yeme alışkanlığı olduğuna bağlanmıştır (Dubey ve Beattie, 1988). Organ ve doku nakli sırasında meydana gelen bulaşmalarla ilgili olarak yapılmış çalışmalarda, bu bulaşın alıcının bağışıklık sistemi baskılandığı için klinik anlamda ortaya çıkacak belirtiler nedeniyle önemli olabileceği ancak epidemiyolojik olarak değerinin olmadığı belirtilmiştir .

## **1.7. *Toxoplasma gondii* Antijenik Yapısı**

### **1.7.1. *Toxoplasma gondii* Yüzey Antijenleri**

*Toxoplasma gondii*'nin yüzey antijenleri hücre membranı üstüne lokalize olmuş yapılardır. 1980 yılında Handman ve ark.'larının, 1982 yılında Kasper ve ark.'larının ve 1988 yılında Couevrur ve ark.'larının yaptıkları çalışmalarla *T. gondii*'nin yüzey antijenleri tanımlanmıştır. SDS-PAGE yönteminin kullanıldığı bu çalışmalarda, beş tane yüzey antijeni tanımlanmıştır. 22, 23, 30, 35 ve 43 kDa molekül ağırlığında olan bu yapılar surface antigen (SAG) olarak adlandırılmışlardır (Sibley ve ark. 1991). Etkenin yüzeyinde glikozil fosfatidilinositol dizisi bağlı olan yapılardır. Çoğu SAG1 ve SAG2'dir. Konak hücreyi invaze etmek, immun modülasyon ve virulansı sağlamak görevleridir (Lekutis ve ark. 2002).

30 kDa ağırlığında olan SAG1, toplam takizoit proteinlerinin %5'ini oluşturmaktadır (Kasper ve ark. 1983). *T. gondii*'nin en baskın olan yüzey antijeni olan bu yapı, RH suşu ile enfekte farelerde immun yanıt oluşmasında en güçlü uyaranı sağlayan etkenlerden birisidir. Aşı çalışmalarında en sık kullanılan proteindir. Bazı bakterilerde ve *Giardia lamblia* gibi başka protozoon parazitlerde rekombinant olarak üretilmektedir (Marti M. ve ark. 2001). Konak hücreye bağlantı faktörü olarak fonksiyon görmektedir. SAG1 güçlü bir immun uyaran olmasına karşılık, maternofetal geçişi engellememektedir. Yetişkinlerde liposomlar içinde veya IL-12 adjuvanı ile birlikte verildiğinde tip 1 immun yanıtı indüklemekte

ve edinilmiş hastalığa karşı koruma sağlamaktadır (Couper K.N. ve ark. 2003). İnsanda pek çok kemokinin salgılanmasına yol açmaktadır. En belirgin olanı kemokin ligand 2 (CCL2)'dir. Takizoitlerle bulaşma CCL2 düzeyini anlamlı şekilde arttırmaktadır (Pinchart- Brennier M. ve ark. 2006).

SAG2, SAG1 gibi hücreye tutunma ve invazyon aşamalarından sorumlu olan 22 kDa ağırlığında bir antijendir. SAG1 ve SAG2 açısından eksikliği olan mutant suşlar konak hücreyi invaze etmede yetersiz kalıp enfeksiyona yol açamamaktadırlar. SAG3 işlevi tam olarak bilinmese de, hücreye bağlanma ile ilgili olduğu düşünülen, 43 kDa ağırlığında bir antijendir. SAG3 eksik olan mutantlar yabanıl tip *T. gondii* suşlarından daha az virulandır (Lekutis C. 2001). SAG4 ve SAG5 ise fonksiyonları tam olarak anlaşılamamış, sırasıyla 36 kDa ve 23 kDa ağırlığında olan antijenlerdir.

#### **1.7.2. *T. gondii*'nin Ekskretuar-Sekretuar Antijenleri:**

*Toxoplasma gondii*'nin takizoit antijenleri etkene özgü olan organellerde depolanıp salgılanırlar. Hücresel yapısındaki endoplazmik retikulum ve Golgi aygıtı organellerinde protein yapılarını sentezleyen ve depolayan *T. gondii*, yoğun granüller, mikronemler ve rhoptriler adı verilen özelleşmiş organel yapılarına da sahiptir. Bu organeller hücre invazyonu için gerekli yapıları salgılamaktadırlar ve takizoitin apikal bölge olarak adlandırılan ön uç bölgesine yerleşmişlerdir (Carruthers V.B. 1999).

Yoğun granül proteinlerden ilk olarak tanımlananı 23 kDa ağırlığında olan GRA1'dir. GRA1 invazyon sırasında parazitofor vakuol içine salınmaktadır. Parazitofor vakuol ile konak membranı etkileşimiyle oluşan ağ sistemi içinde çözülmüş veya bağlı olarak kalmaktadır (Sibley ve ark. 1995). RH suşundan elde edilen ekskretuar-sekretuar antijenlerin (EST) %2'sini oluştursa da tam fonksiyonu bilinmemektedir (Cesbron- Delauw ve ark. 1989). GRA1 yüksek Ca bağlama kapasitesine sahiptir; Ca iyonunun invazyon işlemleri sırasında stabilize

sağlayıcı rolü olduğu için GRA1'in de parazitofor vakuol homeostazını sağlamakla görevli olabileceği düşünülmektedir (Endo ve ark. 1982).

GRA2 intravakuoler membran ağının oluşmasıyla görevli olan, 28 kDa ağırlığında bir antijendir (Mercier ve ark. 1998). *Toxoplasma gondii* EST antijenlerinin %1,3'ünü kapsamaktadır. GRA2 eksikliği olan mutant RH suşu verilen deney farelerinde klinik belirti ortaya çıkmamış ancak uzun süreli antikor yanıtı saptanmıştır. Bu GRA2'nin akut enfeksiyonla ilgisi olduğunu düşündürmektedir (Mercier ve ark. 1998). GRA3 30 kDa ağırlığında olup, parazitofor vakuol içinde oluşan hidrofobik etkileşimlerin düzenlenmesinden sorumludur ve multimerik kompleksler oluşturmaktadır. GRA5 ve GRA6 sırasıyla 21 kDa ve 32 kDa ağırlığında transmembran yerleşimli antijenler olup, yoğun granüllerdeki fonksiyonları tam olarak anlaşılamamıştır (Carruthers V.B.1999). GRA6, GRA2 ile birlikte heteromerik kompleksler oluşturmaktadır. GRA2'ye fonksiyonlarını yerine getirmede yardımcı yapılar oldukları düşünülmektedir. GRA7 29 kDa ağırlığında transmembran yerleşimli bir antijendir. Parazitofor vakuol yapısının düzenlenmesi ile ilgili işleve sahiptir. GRA7 *T. gondii*'nin sadece takizoit formunda değil, tüm dönemlerinde eksprese olan bir yapıdır. Son konakların enterik yerleşimli formlarında, nükleosid trifosfat hidrolazlarla birlikte eksprese olan tek EST antijendir. Parazitin yaşamı boyunca belli bir seviyede bulunduğu için konak canlıda her zaman immun yanıt oluşturmaktadır. GRA7 eksikliği olan mutant örneklerde virulansın önemli ölçüde kaybolduğu bilinmektedir. GRA ailesinin diğer üyeleri parazitofor vakuol içinde serbest olarak salınmış şekilde bulundukları halde, GRA7 membran bağlantılı biçimde tüm invazyon işlemi boyunca stabil kalmaktadır. Parazitofor vakuol konak hücreye girerken yerleştiği noktadan membran yüzeyine vesikül oluşum içinde yollandığı ve burada da tespit edildiği bilinmektedir (Neudeck ve ark. 2002).

Rhoptry proteinleri konak hücreyle apikal bölgenin teması sonrasında salınan ve parazit penetrasyonu tamamlanmadan önce işlev gören yapılardır. ROP1 60 kDa ağırlığında asimetrik yapıda bir proteindir, Schwartzman tarafından penetrasyon

arttırıcı faktör olarak tanımlansa da, fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. ROP1 eksikliği olan mutantlar deney farelerini enfekte edebilmektedirler (Kim ve ark. 1993). ROP1'in parazitin invazyonunu takiben birkaç saat içinde parçalanması, görevinin rhoptri organellerinin invazyon sırasındaki moleküler dizilimini düzenlemek gibi kısa süreli bir iş olduğunu düşündürmektedir (Carruthers V.B. 1999).

ROP2 54 kDa molekül ağırlığında olan bir antijendir. Transmembran yerleşimli olmasına rağmen, işlev gören kısmı parazitofor vakuol membranına bakan, proteolitik işlem geçirmiş olan bölümüdür (Beckers ve ark. 1994). Moleküler yapısı tam olarak anlaşılmayan ROP2, parazitofor vakuol membranı ile konak hücre organellerinin, özellikle mitokondrinin, membranlarıyla etkileşime girmesinde rol oynamaktadır. Bu etkileşim yetersiz kalırsa farelerde deneysel olarak oluşturulan enfeksiyonlarda virulans düşmekte ve parazitin invazyon yeteneği azalmaktadır. ROP2 ile etkileşime giren antikorların 59 kDa ağırlığında bir başka proteine de yanıt vermeleri, çapraz reaksiyon olabileceği düşüncesini uyandırmaktadır. ROP8, ROP2 ile ilişkili olan ve yüksek oranda homoloji gösteren 54 kDa ağırlığında bir proteindir. Proteolitik olarak işlem geçirmiş olan bu yapının yerleşim yeri tam olarak tespit edilememiştir. ROP8 de çapraz reaksiyon vermesi olası bir antijen yapısıdır (El Hajj ve ark. 2006). Antijenik yapı olarak tanımlanmış fakat işlevleri tam olarak anlaşılamamış ROP5, ROP6 ve ROP7 proteinleri de bulunmaktadır. Eksprese eden genlerin dizinlenmesi tam olarak yapılmamıştır. Rhoptri proteinlerinin molekül ağırlıkları 40- 60 kDa arasında değişmektedir. Bu kısıtlı aralık temel yapılarının aynı olduğunu ve küçük modifikasyonlarla birbirlerinden ayrıldıklarını göstermekte, aralarındaki homolojiyi de açıklamaktadır (Leriche ve ark. 1991). Bu yoğun granül proteinlerinde yada mikronem proteinlerinde gözlenen bir durum değildir.

Parazit konak hücreyle temas halinde değilken bile mikronem organellerinden bazal seviyede sekresyon olmaktadır. Konakla etkileşim meydana geldiğinde up-regülasyonla sentezde artış göstermektedir. Mikronem proteinleri konak hücreye bağlanma aşamasında görevli olan antijenlerdir (Carruthers V.B. 1999). Bağlanma

ile ilgili görevleri olduğu yapılarında bulunan adhesiv dizilerden anlaşılmaktadır. MIC1 60 kDa ağırlığındadır ve içerdigi iki adhesiv diziyle hücreye yapışma aşamasında görev almaktadır. Bu diziler thrombospondin yapısında olan ve tip I tekrarlar olarak adlandırılan dizilerle benzerlik göstermektedir (Fourmaux ve ark. 1996). Apicomplexa kök altındaki diğeri bir cins olan *Plasmodium* türleri tarafından eksprese edilen TRAP ile benzerlik göstermektedir. TRAP *Plasmodium*larda konak hücreye giriş esnasında rol alan bir proteindir. Aktin bağlayıcı proteinlerle etkileşime girdiği gösterilmiştir. MIC ailesinin de benzer görevlere sahip oldukları düşünülmektedir. MIC1, TRAP üstünde bulunan TSP-1 parçasıyla uzaktan bir homoloji göstermektedir (Lourenco ve ark. 2001). MIC2 115 kDa ağırlığındadır ve konak hücrede laminin ve kollajen gibi ekstrasellüler matriks elemanlarına tutunmakla görevlidir; tutunmayı integrin- like I parçası ve altı tane TSP-I- like tekrarıyla yapmaktadır. Bu yapılarla çoğu hücrede bol miktarda sentezlenen bir proteoglikan olan glikozaminoglikanlara bağlanmaktadır. *T. gondii*'nin geniş konak hücre yelpazesi böylece açıklanmaktadır (Wan ve ark. 1997). MIC2'nin ikinci özelliği hem transmembran parçaya hem sitoplazmik parçaya sahip olmasıdır. Konak hücre membranında bulunan aktinomyosin liflere bağlanarak tutunmayı ve hücre içine kayarak penetre olmayı sağlamaktadır (Sultan ve ark. 1997).

Mikronem proteinleri içinde üçüncü üye MIC3'dür. MIC3 90 kDa ağırlığında olup heterodimer yapısı vardır. Epidermal growth faktöre benzeyen EGF-like parçalara sahiptir. Bu yapılar konak hücreye tutunmakla görevlidirler. MIC2 gibi içeri kaymayı ve parazitofor vakuol yapısının invazyonunu sağlamaktadır. Tek bir kopya genden eksprese edilmektedir (Fourmaux ve ark. 1996). SDS-PAGE tekniğiyle yapılan analizlerde heterodimer yapısında disülfid bağlarıyla bağlı ve aralarındaki fark post- translasyonel modifikasyona bağlı olan 38 kDa ağırlığında iki izoform bulunmuştur (Achbarau ve ark. 1991). MIC3 için kitin bağlayıcı ligand parçası da mevcuttur. Kitin bağlayıcı ligand ilk olarak buğday kökenli bir proteinde bulunmuştur ve daha sonra pek çok bitkiden izole edilmiştir. *T. gondii*'de nasıl bir işlev gördüğü bilinmemektedir (Shen ve ark. 1999).

## 1.8. Patogenez ve Patoloji

*Toxoplasma gondii* zorunlu hücre içi yerleşimli bir parazittir. Apicomplexa kök altındaki tüm parazitlerde olduğu gibi yaşamsal döngüsünün bazı dönemlerini konak hücre içinde geçirmektedir. *Neospora caninum* ile birlikte epitel ve fibroblast hücre kültüründe üretildiğinde benzer mekanizmalarla ve benzer sürelerde hücreleri invaze ettikleri gözlenmiştir (Lei Y. ve ark. 2005). Takizoitler konak hücreleri invaze ederek hem etkenin yaşamsal döngüsünü tamamlamaktadırlar, hem de oluşan klinik belirtilerden sorumlu olmaktadır. Takizoit formu konak hücreye aktif penetrasyon adı verilen mekanizmayla girmektedir. Bu mekanizma konak hücreyle temas ile başlayan ve parazitofor vakuolün oluşumunu takiben meydana gelen bir olaydır. *T. gondii* penetrasyonu altı basamakta gerçekleşmektedir. Bu basamaklar:

- Hücreyi tanıma
- Pelikül altı tübüller yardımıyla konak hücreye doğru hareket etme
- Hücreye yapışma
- Rhoptri organellerinden Ca ve penetrasyon arttırıcı faktör salınması
- Konoid yapısının penetre olması
- Parazitofor vakuolün oluşumu ve takizoitin içeri girmesi

Konak hücreyle ilk temas sırasında parazitin yüzeyindeki proteinler hücreyi tanıma ve bağlanma olaylarında rol oynamaktadırlar. Yüzey antijenlerinden SAG1 ilk tutunmadan, SAG2 de invazyon öncesi oryantasyonundan sorumludur (Akısü Ç., Budak S. 1998). İnvazyon başladıktan sonra mikronem ve rhoptri proteinleri görev almaktadırlar. Penetrasyon arttırıcı faktör 60 kDa molekül ağırlığındaki ROP1'dir. Bu yapı parazitofor vakuolün şeklinin oluşmasında rol oynamaktadır. ROP1'e karşı oluşan antikorlar parazitofor vakuolün oluşumunu bozarak takizoitin konak hücreye penetre olmasını engellemektedir (Saffer L.D. 1992).

Penetrasyonun kayarak girme aşamasında konak hücre membranından köken alan parazitofor vakuol 15- 30 s içinde şekillenmektedir. Bu oluşumun ardından ilk on dakikalık sürede hem GRA proteinleriyle intraveziküler ağ oluşmakta, hem de

GRA3 proteini ile membran stabilizasyonu sağlanmaktadır. GRA proteinleri bu aşamada Ca iyonu ile regüle olmaktadır (Sibley L.D. 1995, Smith J.E. 1995).

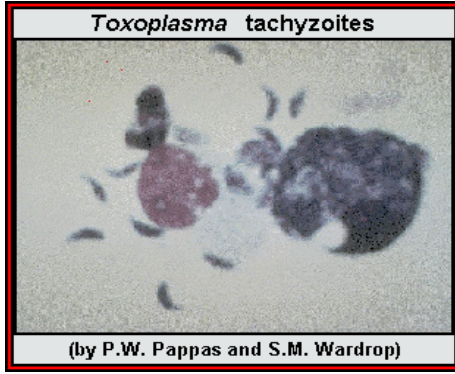
Konak hücrenin enfekte edilme hızı suşun virulansına bağlıdır. Hücre kültürü ile yapılan çalışmalarda RH suşu ile enfeksiyonun yirminci dakikasında hücrelerin % 40'ı etken tarafından yakalanırken, daha az virulan olan Bev suşunda ise beş saat sonra hücrelerin sadece % 28'i enfekte olmaktadır (Kaufman H.E. 1962). Aktif penetrasyon dışında klasik fagositoz yoluyla da *T. gondii* takizoitlerinin hücreye girebileceği gösterilmiştir; bu sırada parazitofor vakuol oluşmamaktadır. Fagositoz için oluşan vakuolün membran yapısıyla bütünleşmesi ve etkenin içeri girmesi 2- 4 dk daha uzun sürede meydana gelmektedir (Morisaki J.H. ve ark. 1995).

Endodiyogeni ile hücre içinde çoğalan takizoitler belli bir sayıya ulaştınca, konak hücre membranının elastikliğini kaybetmesiyle parçalanmasına yol açmaktadırlar (Doran D.J. 1973). Hücrelerin enfeksiyondan sonra parçalanmaları 24- 48 saat içinde olmaktadır fakat bu süre hücre tipine göre değişiklik göstermektedir. Vero hücreleri, HeLa ve L hücrelerinden daha dirençli membran yapısına sahip olduklarından daha geç sürede parçalanmaktadırlar (Lindsay D.S. 1993). *T. gondii* takizoitleri parçalanmış membranı takiben pasif olarak hücre dışına çıkmakta ve diğer hücreleri enfekte etmektedir. Takizoitlerin üretildiği hücre kültürü ortamında kullanılan besiyerine agar katılıp daha katı hale getirilince, hareketleri kısıtlanmış ve uzak noktadaki hücrelere ulaşamayıp bitişik hücrelerle yetinmek zorunda kalmışlardır (Fitzgerald P.R. 1970).

Hücreleri bu şekilde enfekte etmekte olan *T. gondii*'ye bağlı olarak ortaya çıkan klinik belirtiler, yerleştiği dokuya ve konak canlının immun sisteminin durumuna bağlı olarak farklılık göstermektedir (Şekil 6). İmmun sistemi sağlıklı olan kişilerde genellikle asemptomatik seyretmektedir. Hastalarda % 10 oranında genel enfeksiyon belirtileri görülebilmektedir. Klinik belirtiler 4 grup altında toplanmaktadır (Altıntaş K. 2002).

Bunlar:

- İmmun sistemi sağlam kişilerde edinsel toksoplazmoz
- İmmun sistemi sağlam olmayan kişilerde edinsel toksoplazmoz
- Oküler toksoplazmoz
- Konjenital toksoplazmoz



Şekil 6: Hücreyi parçalayan takizoitler ([www.monografias.com/trabajos16/toxoplasmosis](http://www.monografias.com/trabajos16/toxoplasmosis))

İmmun sistemi sağlıklı olanlarda klinik tablo üç farklı şekilde seyretnmektedir.

1. Enfeksiyöz mononükleoz benzeri yüksek ateşli şekilde genelde servikal yerleşimli lenfadenopati ve ateş olmaktadır. Tutulumla beraber makülo-papüler raş, baş ağrısı, miyalji ve genel kırgınlık oluşmaktadır. Lenfadenopati 1- 2 ay sürmektedir. Paul-Bunnell testinin negatif sonuç vermesi tanıyı enfeksiyöz mononükleozdan ayırmaktadır.
2. Lenfadenopatilerin daha yaygın olduğu fakat ateşin görülmediği poliadenopatili şekilde serolojik testlerin uygulanması tercih edilmektedir.
3. İmmun sağlıklı kişilerde ağır tablo seyrek görülmektedir. Yüksek ateş, makülo-papüler raş, miyokardit, perikardit, hepatit, ensefalit ve meningoensefalit tablolarından biri yada tamamı gözlenmektedir.

İmmun sistem yetmezliği olanlarda ciddi klinik tablolar meydana gelmektedir. İmmun yetmezlik kemoterapi, lenfoma, organ nakli, hematolojik neoplaziler ve AIDS gibi sekonder edinilmiş enfeksiyonlara bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu kişilerde klinik belirtiler daha çok merkezi sinir sistemi ile ilgilidir. Meningoensefalit gelişimi görülmektedir. Bilinç kaybı, yüksek ateş ve ense sertliği oluşmaktadır. Yerleşim yerine göre hepatit ve buna bağlı olarak hepatosplenomegali, perikardit, miyokardit ve tonsilit gözlenmektedir (Altıntaş K. 2002).

Oküler toksoplazmoz, üveit ve retinit tablosuyla kendini göstermektedir. Arka yerleşimli üveitlerin % 30- 50'sinden ve ön üveitlerin % 3,3 'ünden *Toxoplasma* sorumludur. Retinit durumunda lezyon oluşumunu takiben vitröz sıvıda inflamasyon olur ve immunkomplekslerin birikmesiyle bulanıklaşma başlar. Daha sonra korioretinit gelişir ve buna bağlı olarak retina içi kanamalar ortaya çıkar. İlerleyen durumlarda lezyonun optik sinire kadar ulaşmasıyla görme kaybı meydana gelmektedir. Bu tablo immün sistemi sağlıklı olmayan kişilerde daha uzun sürmektedir. İmmün sağlıklı kişilerde lezyonun iyileşmesini takiben sınırları belirgin bir nedbe dokusu oluşmaktadır. Oküler olgular çoğunlukla konjenital bulaş sonucu ortaya çıkar ve sıklıkla çift taraflı tutulum görülür. Bazı durumlarda doğumdan yıllar sonra göze yerleşmiş olan doku kistlerinin parçalanması ile bu tablo açığa çıkmaktadır (Altıntaş K. 2002, Dubey J.P.1993).

Toksoplazmozun konjenital bulaşı genelde gebelik esnasında primer bulaşma sonucunda ortaya çıkmaktadır. Gebelik oluşmadan önceki 6 ay içinde geçirilmiş olan enfeksiyon da konjenital toksoplazmoz ile sonuçlanabilmektedir. Gebeliğin ilk trimestresinde fetusa bulaş riski % 20'dir fakat oluşacak olan hasar fazla olmaktadır. Bu durumda çoğu kez abortus veya gelişim geriliği, hidrocefali, serebral kalsifikasyon, korioretinit ve konvülsiyonlarla doğum olmaktadır. Trimestre ilerledikçe risk artmakta fakat oluşacak klinik tablo hafiflemektedir. Son trimestrede bulaş olasılığı % 70'e kadar çıkmaktadır. Bu dönemden sonra doğacak bebekte toksoplazmoz olma olasılığı yüksektir fakat semptomlar genellikle ciddi değildir. Konjenital toksoplazmozun üç karakteristik belirtisi vardır. Bu belirtiler intrakranial kalsifikasyon, korioretinit ve mental retardasyondur. Konjenital geçiş sıklıkla

plasentaya yerleşmiş etkenin oluşan bir defektle fetusa geçmesi sonucunda olmaktadır. Defekt hormonal değişiklik, travma veya sekonder enfeksiyonlara bağlı olabilmektedir. Plasentaya yerleşmiş olan doku kistleri trofoblastların etkisiyle parçalanarak bradizoitleri fetusa geçirebilmektedir (Altıntaş K. 2002, Dubey J.P. 1993).

### 1.9. Tanı

Toksoplazmoz tanısı direkt ve dolaylı yöntemlerle yapılmaktadır. Olgunun durumuna göre bu yöntemlerden biri seçilmektedir. Direkt tanı *T. gondii*'ye ait DNA molekülünün PCR ile saptanmasıdır. Araştırma amaçlı hücre kültürüne ekim ve deney hayvanına enjeksiyon yapılabilir. *T. gondii* ekilecek hücreler olarak sıklıkla Vero, Hep-2 ( Akısü Ç., Budak S. 1998) ve HFF kullanılmaktadır.

PCR yapmak amacıyla farklı örnekler kullanılmaktadır. Kan, idrar ve beyin omurilik sıvısı örneklerinde SAG1 sentezleyen gen aranarak toksoplazmoz tanısı konulmaktadır (Nguyen T.D. 1996). Vücut sıvıları dışında diğer dokularda da PCR ile konjenital, oküler ve yaygın toksoplazmozun tanısını konulabilmektedir. Konjenital toksoplazmozda serolojik yöntemler öncelikli düşünülse de gebeliğin onsekizinci haftasından sonra amniyon sıvısından PCR çalışmak daha başarılı sonuç vermektedir. Amniyon sıvısında % 65-80, plasenta örneğinde % 60, beyin omurilik sıvısında %17-100 ve oküler toksoplazmoz olgularında % 100 oranında başarı sağlanmaktadır (Bastien P. 2002, Montaya J.G. 2002). PCR ile gebelik esnasında konjenital toksoplazmoz tanısı koymakla, fare peritonu içinde üretilen izolasyon edilmenin beraber kullanımı % 60 oranında başarı sağlamaktadır (Buffalano W. ve ark. 2005).

Dolaylı tanı yöntemlerinde serolojik teknikler kullanılmaktadır. Sabin-Feldman boyama testi serolojik bir yöntem olarak toksoplazmoz tanısında altın standart kabul edilmektedir. Düzenli aralıklarla yapılması hastalığın içinde bulunduğu dönem hakkında bilgi vermektedir. Akut enfeksiyon sırasında ilk önce IgM antikorları yükselmektedir. Bu antikorlar 4 hafta içinde en yüksek seviyeye

ulaştıktan sonra 6- 8 aylık bir süreçte gerilemektedirler. IgG antikorları daha geç oluşmaya başlayıp 1-2 ay içinde en yüksek seviyelerine ulaşmaktadırlar. Nüks olmayan durumlarda 2 yıl içinde gerilemektedirler. Sabin- Feldman boyama testi dışında indirekt hemaglütinasyon (IHA), indirekt floresans antikor (IFA) ve enzim linked immunosorbent assay (ELISA) da toksoplazmoz tanısında kullanılmaktadır. IHA ilk olarak Jacobs ve Lunde tarafından toksoplazmoz tanısı için uygulanmıştır. Sabin- Feldman dye testi ile paralellik göstermekte fakat yalancı pozitif sonuç alınabilmektedir. IFA yöntemi canlı parazite ihtiyaç duyulmaması nedeniyle avantajlıdır. Globulin fraksiyonlarının ayırımına gerek duyulmaksızın IgM antikorlarını saptayarak akut toksoplazmozunu belirlemektedir. Dezavantajı pahalı gereçlere ihtiyaç duyulmasıdır. ELISA toksoplazmozdaki fraksiyonları saptama olanağı ile akut- kronik toksoplazmoz ayırımı ve konjenital olguların takip edilmesinde tercih edilmektedir (Altıntaş K. 2002). Günümüzde toksoplazmoz tanısı için kullanılan ELISA’ nın IgG, IgA ve IgE için özelleşmiş alt türleri ve IgM için de “double sandwich” yöntemi kullanılmaktadır (Hökelek M. 1996). Konjenital toksoplazmoz şüphesi ile doğan bir bebekte çeşitli radyolojik tetkiklerle konjenital toksoplazmozun karakteristik belirtilerinden olan kafa içi kalsifikasyon ve göz tetkikleriyle korioretinit taraması yapılmaktadır.

### **1.10. Tedavi**

Toksoplazmozda immun sistemi sağlıklı kişilerde belirtiler görülmedikçe tedavi gerekmemektedir. İmmun sistemi baskılanmış olanlar mutlaka tedavi edilmelidir. Pyrimethamine ve sülfadiazin kombinasyonu etkin olarak kullanılmaktadır. Bu kombinasyon parazitin dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe etmekte; DNA, RNA ve proteinlerin sentezini durdurmaktadır. Pyrimethamine doza bağlı olarak kemik iliği kökenli hücrelerin üretilmesini baskılayabildiğinden dikkatle kullanılmalıdır. Teratojenik etkisi nedeniyle bu ilacın gebelerde kullanımı tehlikeli

durumlara yol açmaktadır buna bağlı olarak gebeliğin ilk üç ayı içinde kullanımı önerilmemektedir. Bu süreç içinde etkenin fetusa geğişini % 60 oranında engelleyen spiramisin tercih edilmektedir. Tedavi günde 3 g olacak şekilde 3 hafta devam etmektedir. Toksoplazmozda alternatif olarak klindamisin, azitromisin, atovaquone ve sülfadoksin gibi ilaçlar da kullanılabilir (Altıntaş K. 2002).

Oküler toksoplazmoz olgularında tedavi uygulamak için bazı şartların oluşması gerekmektedir. Toksoplazmoza bağlı lezyon, görmeyi tehdit eden makula veya papilla bölgesine, retinanın kanlanmasıya yol açan damarların yanına yerleşmiş olmalıdır. Belirgin olarak vitrit gözlenmelidir. Bu durumda hastaya ilk olarak pyrimethamine ve sülfadiazin kombinasyonu ile beraber haftalık kortikosteroid ve folat verilmesi gerekmektedir. Oküler toksoplazmozda klindamisin ve ko-trimoksazol alternatif olarak kullanılabilir (Altıntaş K. 2002).

## **2. MATERYAL VE METOD**

### **2.1. Çalışmada Kullanılan Suşlar**

Çalışmada kullanılan suşlar ATCC’ den elde edilen 40050 katalog numaralı ve 1576808 lot numaralı TS-4, 50174 katalog numaralı ve 2138567 lot numaralı RH ve 1973 yılında Altıntaş tarafından izole edilen, A.Ü.T.F. Parazitoloji laboratuvarında deney faresine sürekli pasajlarla devam ettirilen Ankara suşudur.

### **2.2. RH ve Ankara Suşu Takizoitlerinin Fare Peritonu İçersinde Üretilmesi**

RH ve Ankara suşu virulan suşlar olduklarından fare peritonu içinde üretildi. Üretim için Albino Swiss deney faresi kullanıldı. İki suş da insülin iğnesiyle üçer deney faresinin peritonlarına 1 ml miktarda enjekte edildi. Fareler +25° C’de sabit nem koşullarında, gece-gündüz döngüsü ayarlanmış etüvde bekletildi. 3 gün sonra klinik belirtiler görülmeye başladığında, boyunları kırılarak öldürüldü ve karın bölgesi derileri soyuldu. Fare peritonları içine insülin iğnesiyle 3 ml PBS verildi, işaret parmağıyla 15-20 saniye süreyle masaj yapıldıktan peritona verilen sıvı enjektörle tekrar toplandı. Tüp içine aktarılan takizoitli periton sıvıları, fare kaynaklı hücrelerin ve çeşitli kaba partiküllerin çökmesi için 5 dk 500 devirde santrifüj edildi. Ardından üst sıvı alındı ve 10 dk 2500 devirde santrifüj edildi. İkinci santrifüjden sonra üst sıvı atıldı. Dipteki takizoitler 5 ml PBS ile sulandırıldı. Çalışılana kadar +4°C’ de bekletildi.

### **2.3. TS-4 Suşu Takizoitlerinin Hücre Kültüründe Üretilmesi**

TS-4 suşunu üretmek için Vero hücresi kullanıldı (Lei Y.,Davey M. ve Ellis T. 2005). Hücreler 75 cm<sup>2</sup> yüzey alanına sahip plastik flasklar içinde DMEM besiyeri kullanılarak sürekli pasajla çoğaltıldı. Hücre pasajı laminar akımlı kabinde temiz ortamda yapıldı. Flask içine 22,5 ml DMEM besiyeri, 2,5 ml inaktive edilmiş ve süzülmüş “fetal calf serum” (FCS) eklendi. İlk pasajda, donmuş hücreler 37° C’lik su banyosunda 4-5 dk bekletilip çözüldükten sonra flaskta aktarıldı. Flask 37° C’lik, %5 CO<sub>2</sub> içeren etüve yerleştirildi. Düzenli olarak hücrelerin flask yüzeyini kaplama

seviyeleri kontrol edildi. 3 gün içinde hücreler flaskın yüzeyini tamamen kapladılar. Flaskdaki kullanılmış besiyeri dökülüp, hücreleri kaldırmak amacıyla 3 ml tripsin eklendi. Etüvde 37° C'lik ve %5 CO<sub>2</sub>'lik ortamda 5-6 dk bekletilen hücreler flask yüzeyinden ayrıldı. Tripsinle birlikte bir tüpe aktarılan hücreler 5 dk 1000 devirde santrifüj edildi. Üstteki tripsin atıldı ve dipteki hücreler 1 ml besiyeri ile sulandırılıp yeni hazırlanan flaska aktarıldı. Flask içine 22,5 ml DMEM besiyeri, 2,5 ml “fetal calf serum” eklendi. Hücreler 1 gün sonra flask yüzeyini % 60'a yakın oranda kapladıklarında dondurulmuş olan TS-4 suşu 37° C'lik su banyosunda 4-5 dk bekletilip çözüldükten sonra Vero hücrelerinin üstüne aktarıldı. TS-4 avirulan bir suş olduğu için yavaş üreme göstermektedir. 10 gün boyunca düzenli olarak kontrol edildi. 10 gün sonunda hücreler hem dökülmüş, hem de takizoitlerin içlerinde çoğalmalarından dolayı parçalanmışlardı; herhangi bir kontaminasyon yada bozulma meydana gelmeyen kültürlerdeki takizoitler alındı.. Takizoitler hücre artıklarından arındırmak için 500 devirde 5 dk çevrildi. Dipte biriken kaba partiküller ve hücre artıkları atıldı; alınan üst sıvı daha sonra 10 dk 2500 devirde santrifüj edildi. Bu aşamada takizoitler çöktü. İkinci santrifüjden sonra dipte biriken takizoitler 5 ml PBS ile sulandırıldı, çalışana kadar +4° C'de saklandı.

#### **2.4. Takizoitlerin Parçalanması ve Antijenlerin Serbestlenmesi**

Üç suşa ait takizoitleri parçalamak için önce dondur çöz ardından sonifikasyon işlemleri yapıldı. Buzdolabında bulunan takizoitler -80° C'lik derin dondurucuya kaldırıldı. 45 dk sonra tamamen dondular. Ardından 37° C'lik su banyosu içinde 7-8 dk bekletilerek çözüldüler. Bu dondur çöz döngüsü dört defa tekrarlandı. Son çözme işleminin ardından sonifikasyona geçildi. Branson marka ultra sonifikasyon aleti kullanılarak beş kez 15 sn 60 Hz frekansta dalga uygulandı. Lam lamel arası preparat yapılarak takizoitlerin parçalanıp parçalanmadığı kontrol edildi. Parçalanan örnek 1 ml miktarlarda ependorf tüplerine dağıtıldı.

Bu işlemler her suş için tekrarlandı. Hazırlanan karışımlar çalışana kadar -20° C'de saklandı.

## **2.5. Bradford Yöntemiyle Protein Konsantrasyon Tayini**

Önceden hazırlanan 1ml'sinde 1 mg sığır serum albumin (BSA) olan standarttan kalibratörler hazırlandı. Dokuz ependorf tüpünde sulandırım yapıldı. Standarttan 1 ml alındı ve 500µl'si ilk tüpe, diğer 500µl'si ikinci tüpe aktarıldı. İkinci tüp içine 500µl distile su eklendi. İyice vortekslenerek karıştırıldı. İkinci tüpten 500µl alınıp üçüncü tüpe aktarıldı ve içine 500 µl distile su daha eklendi. Vortekslendikten sonra 500 µl'si dördüncü tüpe aktarıldı. Bu işlem dokuzuncu tüpe kadar devam etti ve her defasında protein konsantrasyonu bir öncekinin yarısına düşmüş oldu. Bu aşama çift çalışılarak iki tane dokuzlu sulandırım hazırlandı.

Suşlar dolaptan çıkarıldı. Her suş için bir tüpten 100 µl alındı. Dokuz ependorf tüpünde sulandırım yapıldı. İlk tüpe 50µl' si , ikinci tüpe diğer 50µl' si aktarıldı. İkinci tüp üstüne 50 µl distile su eklendi. İyice karıştırılıp 50µl'si üçüncü tüpe aktarıldı. Bu şekilde yine dokuz ependorf tüpü boyunca protein konsantrasyonu her tüpte yarısına azalacak şekilde sulandırım uygulandı. Bu aşama tüm suşlar için uygulandı ve yine çift çalışıldı. Son olarak tüm hazırlananlardan 50 µl 96 kuyucuklu mikrotitre plağına konuldu. Üzerlerine 250 µl önceden hazırlanan Bradford ayırıcı eklendi. Thermo marka plak okuyucusunda, uygun bilgisayar programı kullanılarak okutuldu. Spektrofotometrik olarak okunan değerlere karşılık gelen protein miktarı otomatik olarak hesaplandı. Yeterli protein miktarı elde edilemediği için liyofilizasyon yapılmasına karar verildi.

## **2.6. Antijenleri Yoğunlaştırmak için Liyofilizasyon**

Suşları içeren tüpler -80° C'lik derin dondurucuda 20 dk bekletilip donduruldu. Kapakları kopartılıp ağızları parafilm ile kapatıldı. Parafilm üstüne delikler açıldıktan sonra liyofilizatöre yerleştirildi. Liyofilizatör içinde bir gece bekletilen antijenler çıkartılınca 500 µl distile suyla sulandırıldı ve tekrar protein konsantrasyon tayini yapıldı.

## 2.7. SDS- PAGE ile Antijenlerin Yürütülmesi

SDS-PAGE protein yapılarını moleküler büyüklüklerine göre ayıran bir ayırıştırma tekniğidir. Amersham Pharmacia marka mini elektroforez aleti kullanıldı. İki cam arasına 1 ml eninde spacer yerleştirildi. Hazırlanan ayırıştırıcı jel iki cam arasına 70 mm<sup>3</sup> hacminde döküldü. Üstüne hava kabarcığı kalmaması ve yüzeyin düzleşmesi için 1 ml butanol eklendi. Kuruması için 30- 40 dk beklendi. Üstteki butanol döküldü ve 1- 2 defa distile suyla durulandı. Camların en üst seviyesine kadar yükleme jeli döküldü. Jel içine kuyucuk açıcı 8'li tarak yerleştirildi. Yükleme jelinin kuruması için de 30- 40 dk beklendi. Tarak dikkatlice çıkartıldı. Jeller elektroforez tankına yerleştirildi. Antijenlerden 20 µl alındı ve 10 µl örnek tamponu ile karıştırıldı. Birinci kuyucuğa 10 µl Fermantas marka boyanmamış protein ladder ve 10 µl örnek tamponu karışımı yüklendi. İkinci kuyucuğa Ankara suşu antijenleri, üçüncü kuyucuğa RH suşu antijenleri ve dördüncü kuyucuğa TS-4 suşu antijenleri yüklendi. Yürütme tamponu tankın içine döküldü. Koruyucu kapak kapatıldı ve alet güç kaynağına bağlandı. Jel başına 20 mA akım sabit kalmak üzere elektrik verildi ve işlem başlatıldı. Antijenlerin yürümesi 2 saat 30 dakika sürdü. Yürüme tamamlanınca güç kaynağı kapatıldı. Koruyucu kapak çıkartıldı ve jeller tankın içinden söküldü.

## 2.8. Jelin Polikromatik Gümüş Boyasıyla Boyanması

İki cam arasından dikkatlice çıkartılan jel hacim oranı 1/ 5,5 olacak şekilde fiksatif çözelti içine konuldu . Boyama ile ilgili tüm işlemler yıkanabilir cam kap içinde ve çalkalayıcı üstünde yapıldı. Bir gece boyunca fiksatif içinde kaldı. Fiksatif çözelti döküldükten sonra üç defa birer saatten distile suyla yıkandı. Gümüş boyası hacim oranı 1/ 3 olacak şekilde tatbik edildi. Boya içinde bir saat inkübe edildi. 10- 15 sn distile suyla durulandı. Durulamayla gümüş boyasının üst tabakada birikmesi önlenildi. Formaldehidi taze eklenen indirgeme çözeltisi konuldu. Bu işlem 10 dk sürdü. İndirgeme çözeltisi döküldü. Son olarak arttırıcı çözelti hacim oranı 1/ 5,5 olacak şekilde eklendi. Bir saat inkübe edildi. Arttırıcı çözelti yenilendi ve bir gece bekletildi. Jel boyama işlemleri tamamlandıktan sonra durulanıp distile su içinde ışıık

görmeyen ortamda 3 gün saklandı. Kodak marka dijital görüntüleme cihazında fotoğrafı çekildi.

## **2.9. Testlerde Kullanılan Çözelti ve Reaktanlar**

### **2.9.1. Hücre Kültürü Malzemeleri:**

DMEM besiyeri Sigma- Aldrich ( Kat. No: D1152- IL) Hepes modifikasyonlu ve yüksek glikozlu 18,7 g hazır toz besiyeri 1 l distile su içinde çözöldü. İçine pH indikatörü olarak 3,7 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklendi. Antimikrobiyal madde olarak 1 l' ye 10 ml gelecek şekilde penisilin-streptomisin eklendi. İyice çözöldükten sonra motor pompa yardımıyla Sigma filtrasyon setinden, arasına 2µ por çaplı selüloz ester membran filtrede konulmak suretiyle filtre edildi. Steril şişelere doldurulup kullanılıncaya kadar buzdolabında saklandı. Her kullanımdan önce 2µ por çaplı membran filtreden enjektörle süzölerek kullanıldı.

Biological Industries marka “fetal calf serum” 37°C' lik su banyosunda çözöldü. Ardından 56°C' lik su banyosunda yarım saat bekletilerek inaktive edildi. Kullanılıncaya kadar +4°C' de saklandı. Her kullanımdan önce 2µ por çaplı membran filtreden enjektörle süzölerek kullanıldı.

### **2.9.2. Bradford Protein Tayini için Gereken Malzemeler:**

Bradford ayıracı :

-Brillant blue 100 mg

-Etil alkol 50 ml

-Fosforik asit 100 ml

-Distile suyla 1 l' ye tamamlandı.

-1 no'lu Whatman kağıdından süzölerek filtre edildi. Işık görmeyen şişede ve buzdolabında 1 ay kullanım ömrü vardır.

Protein standart:

Sığır serum albumin 10 ml' ye 10 mg gelecek şekilde çözüldü ve buzdolabında saklandı.

### **2.9.3. SDS- PAGE için Gereken Kimyasal Maddeler:**

Stok akrilamid- bisakrilamid çözelti:

-Akrilamid 30 g

-Bisakrilamid 0,8 g

-100 ml distile su içinde çözüldü.

Ayrıştırıcı jel için tris tampon (1,5 M):

-Tris 18,16 g

-100 ml distile su içinde çözüldü. pH ayarlaması HCl ile 8,8' e ayarlandı

Yükleme jeli için tris tampon (0,5 M):

-Tris 6 g

-100 ml distile su içinde çözüldü. pH ayarlaması HCl ile 6,8' e ayarlandı.

%10 SDS:

-SDS 10 g

-100 ml distile su içinde çözüldü.

Yürütme tamponu :

-Glisin 14,4 g

-Tris 3,02 g

-SDS 1 g

-1 l distile su içinde çözüldü.

Örnek tamponu :

-Stacking gel tris tampondan 1,2 ml

-%10 SDS 2 ml

|                  |        |
|------------------|--------|
| -Gliserol        | 1ml    |
| -Bromphenol blue | 2 mg   |
| -Distile su      | 4,8 ml |

Hazırlandıktan sonra 2µ por çaplı filtreden geçirildi ve derin dondurucuda saklandı.

%10'luk amonyum persülfat :

-50 mg amonyum persülfat tartılıp 500 µl distile su ile çözüldü. Jel dökülmeden hemen önce hazırlandı ve kullanıldı.

Ayrıştırıcı jel 1 (%5) :

|                                 |                          |
|---------------------------------|--------------------------|
| -Akrilamid-bisakrilamid         | 0,84 ml                  |
| -Ayrıştırıcı jel tris tampondan | 1,25 ml                  |
| -%10 SDS                        | 0,05 ml                  |
| -Distile su                     | 2,85 ml                  |
| -Amonyum persülfat              | 45µl (taze katılacak)    |
| -Temed                          | 1,7 µl ( taze katılacak) |

Ayrıştırıcı jel 2 (%20):

|                                 |                          |
|---------------------------------|--------------------------|
| -Akrilamid- bisakrilamid        | 3,3 ml                   |
| -Ayrıştırıcı jel tris tampondan | 1,25 ml                  |
| -%10 SDS                        | 0,05 ml                  |
| -Distile su                     |                          |
| -Amonyum persülfat              | 10µl (taze katılacak)    |
| -Temed                          | 1,7 µl ( taze katılacak) |

İki ayrı yüzdedeki seperating jeli gradient aletinde karıştırıldıktan sonra dökülmeye hazır hale geldi.

Yükleme jeli:

|                              |                       |
|------------------------------|-----------------------|
| -Akrilamid- bisakrilamid:    | 1,33 ml               |
| -Yükleme jeli tris tampondan | 2,5 ml                |
| -%10 SDS                     | 0,1 ml                |
| -Distile su                  | 6 ml                  |
| -Amonyum persülfat           | 50µl (taze katılacak) |

-Temed 10µl ( taze katılacak)

#### **2.9.4. Polikromatik Gümüş Boyama için Gereken Malzemeler:**

Gümüş boyası:

-1,9 g AgNO<sub>3</sub>

-1 l distile suyla tamamlandı.

İndirgeme çözeltisi :

-NaOH 30 g

-1 l distile suyla tamamlanır.

-Kullanılacağı zaman 7,5 ml formaldehid eklenir.

Arttırıcı çözelti :

-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,05 g

-1 l distile suyla tamamlanır.

Fiksatif çözeltisi:

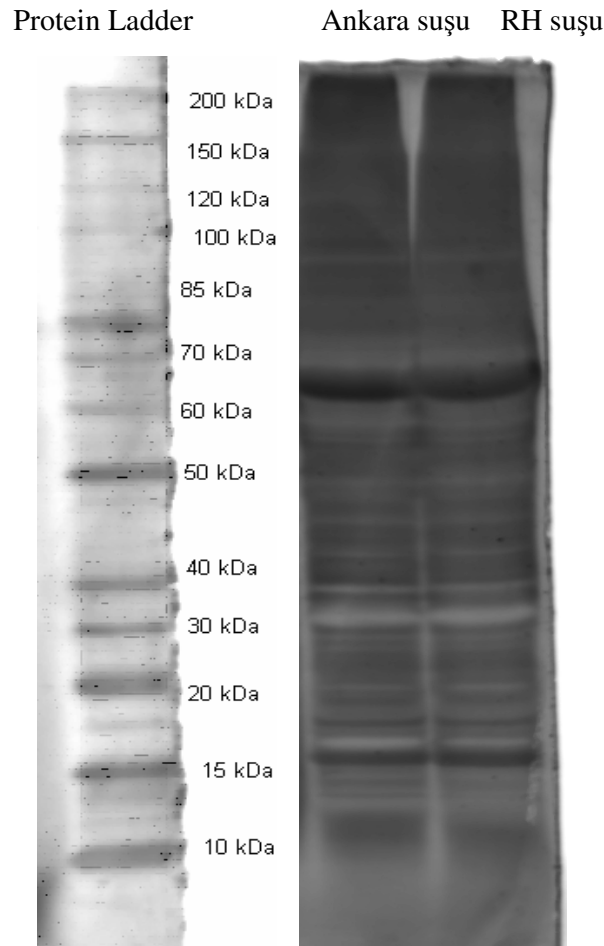
-Etil alkol 50 ml

-Asetik asit 5 ml

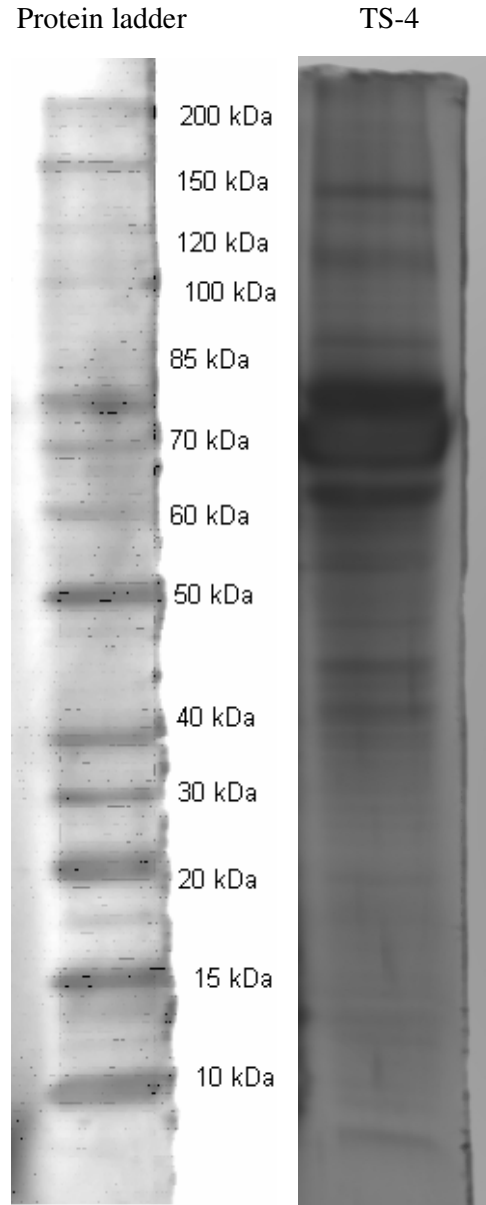
Distile su 45 ml

### 3. BULGULAR

Jel boyandıktan sonra oluşan bantlar protein ladder ile karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonucu Ankara, RH ve TS-4 suşlarında meydana gelen bantların protein büyüklükleri ve hangi antijen oldukları tespit edildi. Ankara suşunun RH suşuyla aynı antijenik yapıları içerdiği anlaşıldı. Avirulan olan TS-4 suşunda farklı antijenler bulundu. Ankara ve RH suşunda en belirgin yoğunlaşma 60-70 kDa arasında ve 15 kDa seviyesinde gözlemlendi. Diğer gözlenen bantlar 35, 40 ve 55 kDa hizasında görüldü. TS-4 suşunda daha az bant görüldü. Bantlardan 60 ve 115 kDa ağırlığında olanlar anlamlı bulundu. Ayrıca 80 ve 150 kDa seviyesinde bantlar gözlemlendi. (Şekil 7 ve Şekil 8)



Şekil 7: Ankara ve RH suşu antijenlerinin protein ladder ile karşılaştırılması



Şekil 8: TS-4 suşunun protein ladder ile karşılaştırılması

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Toksoplazmoz hem ülkemizde hem de dünyada yaygın olarak gözlenen bir parazit hastalığıdır. Ülkeye göre farklılık göstermekle birlikte özellikle tropikal bölgelerde % 94'lere varan prevalans gözlenmektedir. Tanısının geç konulması ve klinik anlamda özgül olmayan belirtiler vermesi, diğer hastalıklarla karışmasına ve tedavinin geç başlamasına yol açmaktadır. Özellikle konjenital bulaşma durumunda meydana gelebilecek düşük veya konjenital toksoplazmozla doğum gibi ciddi sonuçlara neden olmaktadır (Tanyüksel M. 1993). Tanısının doğru zamanda ve doğru yöntemle konulması önemlidir. Tanı için referans yöntem olarak Sabin-Feldman dye testi kullanılmaktadır. Bu testin yapılması için canlı parazitlere ihtiyaç duyulmaktadır. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi parazitoloji laboratuvarında rutin hasta tanısı koymak amacıyla Ankara suşuna ait parazitler fare peritonu içinde üretilmektedir. Toksoplazmoz tanısı için serolojik testler de kullanılmaktadır. İnsanlarda oluşan antikorların titreleri ölçülmekte ve takipleri yapılmaktadır.

İmmun yanıtı oluşturacak ve tanıyı sağlayacak olan takizoit formu antijenlerinin iyi irdelenmesi gerekmektedir. *T. gondii* suşlarının virulansı farelerde yapılan çalışmalarda farelerin yarısını öldüren doz (LD<sub>50</sub>) miktarına bağlı olarak belirlenmektedir. Bu dozun insanlara yansıtılması hakkında Boothroyd ve ark. tarafından yapılan çalışmalar vardır. *T. gondii* suşlarının genotipleri geniş yelpazeye sahip markerler tarafından belirlendiği için ayrımda bir sınıf içine pek çok suş girmektedir. Virulans farkı etkenin hastalık yapacağı organı, yerleşeceği hücreyi ve konak canlı seçimini etkilemektedir. *T. gondii*'nin üç temel suş grubu tip I suşlar RH ve GT-1, tip II suşu ME49 ve tip III suşları CEP ve VEG'dir (Saeij ve ark. 2005).

A.B.D' de yapılan bir araştırmada insanları etkileyen toksoplazmoz olgularının çoğundan tip II suşunun sorumlu olduğu bulunmuştur (Darde M.L. 2004). Aynı ülkede yapılan başka bir araştırmada oküler yerleşimli toksoplazmoz olgularından ve immün sistemi sağlıklı kişilerde meydana gelen ciddi belirtiler veren toksoplazmoz

olgularından tip I suşlar sorumlu tutulmaktadır. Tip II suşlar daha sık gözlenmekte ve immun sistemi baskılı olanlar dahil çok kişide hastalık yapmakta, ancak tip I suşlar virulansları daha yüksek olduğu için belirli durumlarda hastalığa yol açmaktadır (Grigg ve ark. 2001). Avrupa kıtasında ise tip I suşları ciddi konjenital toksoplazmoz olgularına neden olmaktadır (Howe ve ark. 1997, Fuentes ve ark. 2001). Burada virulansı sağlayan faktörleri sentezleyen genlerin ekspresyon seviyeleri de önemlidir. SAG3, GRA2, karbomoil fosfat sentetaz II, MIC1 ve MIC3 proteinlerinde eksilmeler virulansı düşürerek farede meydana getirilen enfeksiyonun seviyesini azaltmaktadır (Saeij ve ark. 2005). 2006 yılında Djakovic ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada konjenital toksoplazmozdan sorumlu olan tip I ve tip II suşlarından tip II suşu, toksoplazmozlu bir fetusun kordon kanından izole edilmiş ve verildiği farede ciddi ensefalit meydana getirmiştir.

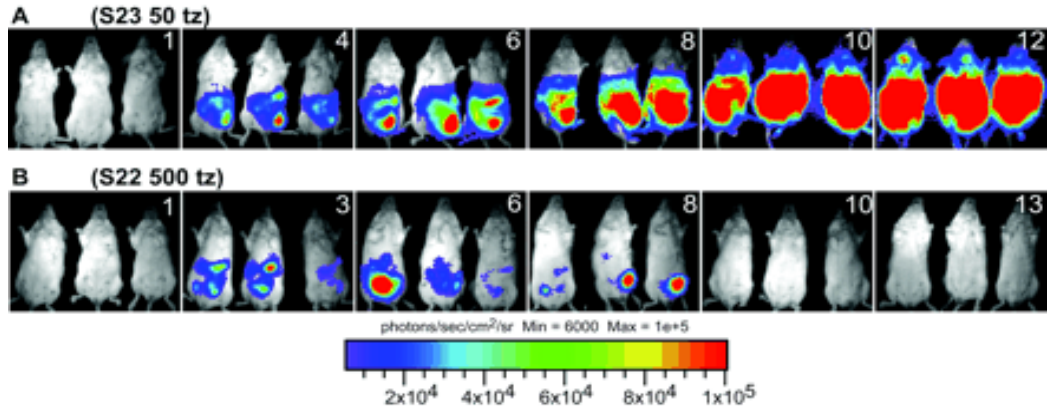
Antijen yapıları konak canlıdaki doğal savunma bariyerlerini de geçerken görev alan yapılardır. Bu bariyer yerleşim yerine göre kan-beyin bariyeri veya plasenta olabilmektedir. Bu açıdan suşların dağılım kapasitesi de önemlidir. Barragan ve Sibley 2002’de yaptıkları bir araştırmada in vitro ortamda tip I suşların tip II ve tip III’e oranla daha iyi dağılım gösterdiklerini ve daha fazla hücreyi enfekte ettiklerini göstermiştir.

Uzak dokulara dağılımdan, uzak mesafe yayılım fenotipi (LDM) sorumludur. Barragan ve ark. 2003’de yaptıkları bir çalışmada bu fenotipe sahip olan suşların MDCK hücre kültüründe ekstrasellüler matrikse geçtikleri ve ex vivo ortamda lamina propria ve submukoza tabakasını aştıkları gözlenmiştir (Barragan ve ark. 2003).

2005 yılında Döşkaya ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, tip I suşlar içinde yer alan RH Ankara suşunun farklı hücre kültürlerine ekimi ve büyüme değerlendirmesi yapılmıştır. Myeloma hücre kültüründe 1 ay sonunda 5 milyon, Vero hücre kültüründe 500 bin, Hep-2 hücre kültüründe 1 milyon ve HeLa hücre kültüründe 1 milyon üreme olduğu tespit edilmiştir.

Üreme hızı suşun virulansı ile korelasyon göstermektedir. Tip I suşu bir flaskı kaplamış hücreleri, tip II ve tip III'e oranla daha hızlı parçalamaktadır fakat sayısal olarak aralarında fark olmamaktadır. Bu tip I suşunun yavaş çoğaldığını ancak hücreleri daha hızlı enfekte ettiğini göstermektedir. Tip I suşlarına ait takizoitler daha uzun süre enfektif kalmakta ve bir hücreyi parçaladıktan sonra diğerini daha çabuk invaze etmektedir (Saeij ve ark. 2005).

Saeij ve ark. 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada, CEG suşu ve ME49 suşu S23 olarak ve bunların daha az virulan olan türevlerini S22 olarak adlandırmışlardır. Virulansı göstermek için ateş böceklerindeki lusiferaz enzimini eksprese eden gen takizoit genomu içine rekombine edilmiştir. Deney farelerine verilen takizoitler 12-13 gün boyunca görüntüleme sistemleriyle takip edilmişlerdir. Virulansı yüksek olan S23 belirgin biçimde farede yayılım göstermiştir (Şekil 9) (Saeij ve ark. 2005).



Şekil 9: S22 ve S23 verilen suşların 12- 13 günlük takipleri (Saeij ve ark.2005)

Suşlarda oluşan farklılıklar antijenik yapıya yansımaktadır. Farklı moleküler yöntemlerle suşlardaki genetik varyasyonlar araştırılmıştır. Virulan ve avirulan suşlarda belli gen dizilerinin varlığının etkenin patojenitesini hangi yönde etkilediği saptanmıştır. Suşlar virulan ve avirulan olarak ayrımlanmasına rağmen Guo ve ark.

orta seviyede virulanstan bahsetmişlerdir. Yaptıkları çalışmada K1/94 suşu virulan suş olarak bilinmesine rağmen fareye 100 takizoit verildiğinde klinik belirtilere yol açmamaktadır fakat 10 000 takizoit verildiğinde ölümcül olmaktadır (Guo ve ark. 1996). Virulan ve avirulan olan *T. gondii* suşları arasında doğadaki döngüleri açısından da fark vardır. Virulan olan suşlar daha seyrek ookist veya doku kisti oluşturmaktadırlar (Sluys R. 1991).

Ware ve Kasper 1986 yılında yaptıkları çalışmada, *T. gondii* için suşa özgü antijenleri belirtmişlerdir. Bu çalışmada 1941 yılında izole edilmiş ve farelerde seri pasajlarla devam ettirilen RH, P ve C suşları kullanılmıştır. RH suşu virulan, P ve C suşları avirulandır. Tavşan antiserumu ile inkübe edilip duyarlı hale getirildikten ve SDS- PAGE ile yürütüldükten sonra nitroselüloz membrana aktarılmışlardır. Oluşan antikorların RH suşuna ait takizoitleri daha fazla elimine ettiği sonucuna ulaşılmıştır. RH suşunda açığa çıkan 22 ve 30 kDa ağırlığındaki antijenler konak immun sistemini daha iyi uyarmaktadırlar. Az virulan olan P ve C suşu antijenleri daha çok IgM' lere bağlanırlarken, RH suşu antijenlerinin IgG bağlanma potansiyelinin yüksek olduğu gösterilmiştir (Ware P., Kasper L.H. 1986).

Sonuç olarak yaptığımız çalışmada virulan ve avirulan suşlar arasındaki antijenik farklılıklar araştırılmıştır. Ankara ve RH suşu ortaya çıkan bantlar bakımından birbirinin aynısıdır. En belirgin bant 60-70 kDa arasına denk gelen banttır. Bu bantın konak hücreye yapışma aşamasıyla görevli olan ve adhesiv diziler içeren MIC1 olması olasıdır. Deneysel olarak MIC1 eksikliği oluşturulmuş takizoitler hücre kültürüne ekildiğinde, hücreleri enfekte etme hızı yabanıl tipe oranla % 50'ye varan seviyede azalma göstermiştir. Replikasyon oranında ise herhangi bir azalma olmamıştır (Cerede ve ark. 2005). Virulan tip I suşlarında yavaş üreme fakat hızlı hücre invazyonu gözlenen bir olaydır. *T.gondii*'nin en baskın yüzey antijeni olan SAG1 30 kDa seviyesinde ince bir bant olarak gözlenmiştir. SAG3 40 kDa hizasının biraz üstünde belirmiştir. Virulan olan suşlarda bulunan bu antijenin işlevi tam olarak bilinmese de, hücreye bağlanma aşamasında görev aldığı düşünülmektedir. Görevi anlaşılamamış diğer bir yüzey antijeni olan SAG4 35 kDa

civarında SAG3'ün altında yer almaktadır (Lekutis ve ark. 2001). Yaklaşık 55 kDa ağırlığında bulunan kalın fakat soluk bant ROP2 ve homoloğu ROP8 olabilir. Hücre invazyonu sırasında başta mitokondri olmak üzere konak hücre organellerinin membranlarıyla etkileşim kurmak ROP2'nin görevidir. ROP2 eksikliği olan suşlar farelerde deneysel olarak oluşturulan enfeksiyonlarda invazyonda yetersiz kalmaktadırlar (El Hajj ve ark. 2006). Belirgin bir başka bant da 15 kDa seviyesinde gözlenmiştir. Daha önceki yayınlarda saptanmış olan önemli antijenik yapılar 20 kDa üzerinde yer almaktadır. Bizim çalışmamızda 15 kDa seviyesinde elde edilen yoğunlaşmanın küçük miktarlardaki antijenlerin alt kısmında birikmesi olarak yorumlanmıştır.

Avirulan olan TS-4 suşuna ait bantlar daha az sayıda gözlenmiştir. En belirgin olarak gözlenen bant 80 kDa hizasına denk gelmektedir. Altında 60 kDa seviyesindeki bantın ROP1 olması olasıdır. ROP1 penetrasyon arttırıcı faktör olarak adlandırılrsa da virulansla direk ilgisi olmadığı belirtilmiş, ROP1 eksik mutantların da enfeksiyona yol açabildikleri gösterilmiştir (Kim ve ark. 1993). 100 kDa seviyesini geçen bantlar sadece TS-4 suşunda görülmüştür. Soluk olarak gözüken bantlar 115 kDa ve 150 kDa hizasındadır. MIC2 115 kDa ağırlığında olup, parazitin konak hücredeki ekstrasellüler matriks elemanlarıyla etkileşmesini sağlamaktadır. Laminin ve kollajen proteinleriyle etkileşime girer. *T.gondii*'nin geniş konak yelpazesinden sorumludur. Virulansla direkt ilgisi olmayan bir proteindir (Wan ve ark. 1997).

Yapılan bu çalışmada RH ve Ankara suşlarının aynı olduğu ve virulan karakterdeki suşlarda bulunan bantları taşıdıkları, avirulan olan TS-4 suşunun ise farklı bant patterni gösterdiği ortaya konmuştur. Saptanan antijenik bantlar daha sonraki çalışmalarda virulans özelliklerinin saptanması ve tanı yöntemlerinde uygun antijenlerin kullanılması amacıyla kullanılabilir.

## ÖZET

### **Toxoplasma gondii Antijenlerinin Karakterizasyonu**

*Toxoplasma gondii* dünyada yaygın olarak görülen ve toksoplamozaya yol açan parazittir. *T. gondii* zorunlu hücre içi yerleşim göstermektedir ve insanlar dahil tüm sıcak kanlıları enfekte etmektedir. İnsanlarda özellikle immun yetmezliği olanlarda ciddi klinik belirtiler meydana getirmektedir. Konjenital bulaş sonucunda oluşabilecek hidrosefali, intrakranial kalsifikasyon ve korioretinit gibi önemli klinik tablolarla gelecek nesli tehdit etmektedir. Hayvanlarda meydana getirdiği düşüklerle de hayvancılığın yaygın olduğu ülkelerde ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Tanısı direkt olarak PCR ile yapılırken, dolaylı tanı referans test olan Sabin-Feldman boya testi, IHA, ELISA ve IFA gibi serolojik testlerle konmaktadır. Serolojik testlerde saptanan antikorların titresi, sentezlenmelerine yol açan antijen yapısıyla ilişkilidir, bu yüzden farklı suşlardaki antijen yapılarının incelenmesi önem taşımaktadır.

Bu çalışmada *T. gondii*'nin üç suşu kullanılmıştır ve aralarındaki farklılıklar incelenmiştir. Çalışmada kullanılan suşlar RH, Ankara ve TS-4 suşlarıdır. RH ve Ankara suşu virulan olup fare peritonu içine inoküle edilerek üretilmişlerdir. TS-4 suşu avirulan olup, Vero hücre kültüründe üretilmiştir. Yeterli miktarda üreme olduktan sonra takizoitler alınmış ve parçalanmıştır. Parçalanmış takizoitlerin protein içerikleri Bradford yöntemiyle saptanmıştır. Yoğunlaştırmak amacıyla liyofilize edilen suşlar ardından SDS- PAGE ile yürütülmüşlerdir. Yürütülen antijenler gümüşleme ile boyanmış ve ortaya çıkan bantlar standart protein ladder ile karşılaştırılmıştır.

Karşılaştırma sonucunda RH ve Ankara suşlarının aynı antijenik yapıları içerdiği gözlenmiştir. Avirulan TS-4 suşu ise daha farklı ve genel olarak diğer iki virulan suşa oranla daha az miktarda antijen yapısına sahiptir.

Anahtar Kelimeler: *Toxoplasma gondii*, Antijen

## SUMMARY

### Characterization of *Toxoplasma gondii* Antigens

*Toxoplasma gondii* is a worldwide parasite causing toxoplasmosis. *T. gondii* is an intracellular protozoon that infects all warm blooded animals including humans. It may cause severe clinical disorders especially in immunosuppressed humans. Congenital transmission of *T. gondii* may result in severe clinical symptoms like hydrocephalus, intracranial calcification and chorioretinitis threatening new generations. Economical losses in stockbreeding countries may be seen because of abortus in animals. Direct diagnostic method is PCR and indirect methods are serological tests such as IHA, IFA, ELISA and a known reference test Sabin-Feldman dye test. As detected antibody titers in serological tests are correlated with antigens that cause synthesis of antibodies, it is important to know antigenic structure of different strains.

In this study three strains of *T. gondii* were used and differences were examined. RH, Ankara and TS-4 strains were used. RH and Ankara strains which are virulent were inoculated to peritoneal cavity of mice. TS-4 strain is avirulent and produced in Vero cell culture. After enhanced growth tachyzoites were taken and broken down. Protein concentration was detected by Bradford method. After concentration by lyophilisation they were run on SDS-PAGE gel. After polychromatic silver stain antigens were compared by using a standard protein ladder.

After comparison RH and Ankara strains were seen to have the same antigenic structure. Avirulent TS-4 strain is different from the others and has much less quantity of antigens.

Key Words: *Toxoplasma gondii*, Antigen

## KAYNAKÇA

- 1) ACHBARAU, A., MERCEREAU-PUJALON, O., AUTHERMAN, J.M., FORTIER, B., CAMUS, D., DUBREMETZ, J.F. (1991). Characterization of microneme proteins of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 47: 223- 233.
- 2) AKISÜ, Ç., BUDAK, S. (1998). *Toxoplasma Gondii*'nin aktif penetrasyonu ve endodiyogenezi. *Türkiye Parazitol. Derg.* 22: 371- 374
- 3) ALTINTAŞ, K. (2002). Tıbbi Parazitoloji. Nobel Tıp Yayınları, Ankara 142-162.
- 4) BARRAGAN, A., SIBLEY, L.D. (2003). Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.* 11, 426-430.
- 5) BASTIEN, P. (2002). Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans. R. Soc.Trop. Med. Hyg.* 205-15.
- 6) BEAMAN, M. H., MC CABE, R. E., WONG, S., REMINGTON, J. S. (1995). *Toxoplasma gondii* Mandell, Douglas and Bennett's, Principles and practice of Infectious Diseases. 4.Edit. Churchill, Livingstone, New York. 2455-2475.
- 7) BECKERS, C. J., DUBREMETZ, J. F., MERCEAU-PUJALON, O., JOINER, K. A. (1994).The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP2 is inserted into parasitophorus vacuole membrane surrounding the intracellular parasite is exposed to the host cell cytoplasm. *J.Cell Biol.* 127: 947- 961.
- 8) BUFFALANO, W., BEGHETTO, E., DEL PEZZO, M., SPADONI, A., CRISTINA, M., PETERSEN, E., GARGANO, N. Use of recombinant antigens for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 43:5916-5924.
- 9) CARRUTHERS, V. B. (1999). Armed and Dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitol. Int.* 48:1- 10.
- 10) CEREDE, O., DUBREMETZ, J.F., SOETE, M., DESLEE, D., VIAL, H., BOUT, D., LEBRUN, M. (2005). Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. *J. Exp. Med.* 201: 453-463.
- 11) CESBRON- DELAUW, M.F., GUY, B., PIERCE, R.J., TORPIER, G., LENZEN, G., CESBRON, J.Y., CHARIF, H., LEPAGE, P., DARCY, F., LECOCQ, J.P., CAPRON, A. (1989). Molecular characterization of a 23 kDa major antigen secrets by *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7537- 7541.
- 12) COUPER, K.N., NIELSEN, H.V., PETERSEN, E., ROBERTS, F., ROBERTS, C.W., ALAEXANDER, J. (2003). DNA Vaccination with immunodominant tachyzoite surface antigen (SAG1) protects against adult acquired *Toxoplasma gondii* infection but does not prevent maternofetal transmission. *Vaccine* 21: 2813-2820.
- 13) DARDE, M.L. (2004). Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann 1st Super Sanita* 40:57- 63.
- 14) DJAKOVIĆ, O.D., KLUN, I., KHAN, A., NIKOLIC, A., KNEZEVIC USAJ, S., BOBIC, B., SIBLEY, L.D.(2006). A human origin type II strain of *Toxoplasma gondii* causing severe encephalitis in mice. *Microbes Infect.* 8: 2206- 2212.
- 15) DORAN, D.J. (1973). Cultivation of coccidia in avian embryos and cell culture. Hammond D.M., Long P.L.eds. The coccidia, *Eimeria*, *Isospora*, *Toxoplasma*, and related genera. Baltimore university Park Press 183- 252.

- 16) DÖŞKAYA, M., DEĞİRMENCİ, A., ÇİÇEK, C., KORKMAZ, M., GÜRÜZ, Y. (2005). Behaviour of *Toxoplasma gondii* RH strain tachyzoites during continuous production in various cell lines. *Parasitology*. 10:1-5.
- 17) DUBEY, J.P. (1993). *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis* and other tissue cyst forming coccidia of man and animals. Parasitic Protozoa 2nd edi. Kreier JP. Academic Press, New York.
- 18) DUBEY, J.P., BEATTIE, C.P. (1988). Toxoplasmosis of animals and man. CRC Pres, Boca Raton.
- 19) EL HAJJ, H., DEMEY, E., PONCET, J., LEBRUN, M., WU, B., GALEOTTI, N., FOURMAUX, M.N., MERCEREAU PUIJALON, O., VIEL, H., LABESSE, G., DUBREMETZ, J.F.(2006). The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: Proteomic and genomic characterization and molecular modeling. *Proteomics* 6:5773- 5784.
- 20) ENDO, T., SETHI, K.K., PIEKARSKI, G. (1982). *Toxoplasma gondii* calcium ionophore A23187-meidated exit of trophozoites from infected murine macrophages. *Exp Parasitol* 53:179-188.
- 21) FITZGERALD, P.R. (1970). Development of *Eimeria stiae* in avian embryos. *J. Parasitol.* 56: 1251- 1253.
- 22) FOURMAUX, M.N., ACHBAROU, A., MERCEREAU-PUJALON, O., BIDERRE, C., BRICHE, I., LOYENS, A., ODBERG-FERREGUT, C., CAMUS, D., DUBREMETZ, J.F.(1996). The MIC1 microneme prtein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor like domain and binds to host cell surface. *Mol Biochem Parasitol* 83:201-210.
- 23) FUENTES, I., RUBIO, J.M., RAMIREZ, C., ALVAR, J. (2001). Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplamosis in Spain: Direct analysis from clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 39:1566-1570.
- 24) GRIGG, M.E., GANATRA, J., BOOTHROYD, J.C., MARGOLIS, T.P.(2001). Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 184:633-639.
- 25) GUO, Z.G., JOHNSON, A.M. (1996). DNA polymorphisims associated with murine virulence of *Toxoplasma gondii* identified by RAPD-PCR. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 219: 17-26.
- 26) HOWE, D.K., HONORE, S., DEROUIN, F., SIBLEY, L.D.(1997) Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 35:1411- 1414.
- 27) HÖKELEK, M. (1996). Deneysel toksoplazmozda azitromisin ve trimetoprim-sülfametoksazol'ün sağaltımdaki etkinliğin karşılaştırılması ve patolojik olarak değerlendirilmesi. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.
- 28) KASPER, L.H., CRABB, J.H., PFEFFERKORN, E.R. (1983). Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. *J. Immunol.* 130:2407- 2412.
- 29) KAUFMAN, H.E., MANOLEY, E.D. (1962). Multiplication of *Toxoplasma gondii* in tissue culture. *J. Parasitol.* 48:358- 361.
- 30) KIM, K., BOOTHROYD, J.C. (1993). Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. *Science* 262:911-914.

- 31) LEI, Y., DAVEY, M., ELLIS, J.T. (2005). Attachment and invasion of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* to epithelial and fibroblast cell lines in vitro. *Parasitology* 131:1-8.
- 32) LEKUTIS, C., FERGUSON D.J.P., GRIGG, M. E., CAMPS, M., BOOTHROYD, J.C. (2001). Surface antigens of *Toxoplasma gondii* : variations on a theme. *Int. J. Parasitol.* 31:1285- 1292.
- 33) LERICHE, M.A., DUBREMETZ, J.F. (1991). Characterization of protein contents of rhoptries and dense granule proteins of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Mol Biochem Parasitol* 45:249-260.
- 34) LINDSAY, D.S., TOLVÍO, M.A.K., BLAGBURN, B.L. (1993). Ultrastructural determination of cystogenesis by various *Toxoplasma gondii* isolates in cell culture. *J. Parasitol.* 79:289- 292.
- 35) LOURENCO, E.V., PEREIRA, V.M., FACA, A.A., COELHO, J.R., MINEO, M.C., ROQUE, L.J., CASTELO, A.P. (2001). *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose binding protein. *Glycobiology* 11:541-547.
- 36) MARTI, M., LI, Y., KOHLER, P., HEHL, A.B. (2001). Conformationally correct expression of membrane anchored *Toxoplasma gondii* SAG1 in the primitive protozoan *Giardia duodenalis*. *Infect Immun.* 70:1014- 1016.
- 37) MC LEOD, R., REMINGTON, J.S., DESMONTS, G. *Toxoplasmosis Infectious diseases of fetus and newborn infant*, 4th edi. Remington JS, Klein JO, Saunders Philadelphia 140-267.
- 38) MERCIER, C. HOWE, D.K., MORDUE, D. LINGNAU, M., SIBLEY, L.D. (1998). Targeted disruption of the GRA2 locus in *Toxoplasma gondii* decreases acute virulence in mice. *Inf Immunity* 66:4176-4182.
- 39) MONTAYA, J.G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J. Inf. Dis.* 185:73- 82.
- 40) MORISAKI, H.J., HEUSER J.E., SIBLEY D.L. (1995). Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of host cell. *J. Cell Sci.* 108:2457-2464.
- 41) NEUDECK, A., STACHELHAUS, S., NISCHIK, N., STRIEPEN, B., REICHMANN, C., FISCHER, H.G. (2002). Expression variance , biochemical and immunological properties of *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7. *Microbes Infect.* 4:581-590.
- 42) NGUYEN, T.D., DE KESEL, M., BIGAIGNON, G., HOET, P., PAZZAGLIA, G., LAMMENS, N., DELMEE, M. (1996). Detection of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in blood, urine and brain of infected mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3:635-639.
- 43) NICHOLS, B.A., CHIAPINNO, M.L (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* 34: 217-226.
- 44) PINCHART- BRENIER, M.P., VILENA, I., MERCIER, C., DURAND, F., SIMON, J., CESBRON- DELAUW, M.F., PELLOUX H. (2006). The *Toxoplasma* surface protein SAG1 triggers efficient in vitro secretion of chemokine ligand from human fibroblasts. *Microbes Infect.* 2: 54-61.
- 45) SAEIJ, J.P.J., BOYLE, J.P., BOOTHROYD, J.C. (2005). Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with infected host. *Trends Parasitol.* 21: 476-481.

- 46) SAFFER, L.D., MERCEREAU-PUÏLAJON, O., DUBREMETZ, J.F., SCHWATRZMAN, J.D. (1992). Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *J. Protozool.* 39: 526- 530.
- 47) SHEN, Z., LORENA, M.J. (1999). Evolution of chitin binding proteins in invertebrates. *J. Mol. Evol.* 48:341-347.
- 48) SIBLEY, L.D., PFEFFERKORN, E.R., BOOTHROYD, J.C. (1991). Proposed nomenclature for *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today* 7:327- 328.
- 49) SIBLEY, L.D., NIESMAN, I.R., PARMLEY, S.F., CESBRON-DELAUW, M.F. (1995). Regulated secretion of multi lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J cell Sci* 108:1669-1677.
- 50) SLUYS, R. (1991). Species concepts, process analysis and the hierarchy of nature. *Experientia* 47: 1162- 1170.
- 51) SMITH, J.E. (1995). A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. *Int J of Parasitol.* 25: 1301- 1309.
- 52) SMITH, J.L. (1991). Foodborne toxoplasmosis. *J of Food Safety* 12:17-57.
- 53) SULTAN, A.A., THATHY, V., FREVERT, U., ROBSON, K.J., CRISANTI, A., NUSSENZWEIG, W., NUSSENZWEIG, R.S., MENARD, R.(1997). TRAP is a necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites. *Cell* 90:511-522.
- 54) TANYÜKSEL, M. (1993). *Toxoplasma gondii* antikorlarının saptanmasında değişik serolojik yöntemlerin karşılaştırılması. T.C. GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D. Uzmanlık Tezi, Ankara.
- 55) WAN, K.L., CARRUTHERS, V.B., SIBLEY, D.L., AJIOKA J.W. (1996). Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding micronemal protein MIC2. *Mol Biochem Parasitol* 84:203-214.
- 56) WARE, P.L., KASPER, L.H. (1986). Strain specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 55:778-783.
- 57) ZENNER, L., ESTAQUIER, J., DARCY, F., MAES, P., CAPRON, A., CESBRON- DELAUW, M.F. (1999). Protective immunity in the rat model of congenital toxoplasmosis and potential of excreted secreted antigens as vaccine components. *Parasite Immunol.* 2:61-72.

## ÖZGEÇMİŞ

Ad, Soyad: Kerem Yaman

Doğum Tarihi ve yeri: 1981, Ankara

Öğrenim durumu: 1987-1992 Seyranbağları İlkokulu

1992-1999 Ankara Atatürk Lisesi

1999-2004 İstanbul Üni. Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Biyolojik  
Bilimler Bölümü

Katıldığı kongreler ve sempozyumlar:

- 4. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (25-28 Nisan 2006 Ankara)
- Günümüzde Elektroforez Uygulamaları ve Klinik Önemi Sempozyumu (6-7 Nisan 2006 Ankara)
- Uluslar arası katılımlı 3. Ulusal Hidatidoloji Kongresi (6-9 Eylül 2006 Samsun)

Üye olduğu dernekler:

Tıbbi Biyologlar Derneği

Türkiye Parazitoloji Derneği

İlgi alanları:

Parazitoloji

Genel Mikrobiyoloji

Epidemiyoloji