



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TOXOCARA CANİS İLE DENEYSEL ENFEKTE FARELERDE VİSCERAL LARVA MİGRANS'IN PCR İLE TEŞHİSİ

Gökben ÖZBAKIŞ

**PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet DOĞANAY**

**ANKARA
2015**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TOXOCARA CANİS İLE DENEYSEL ENFEKTE FARELERDE
VİSCERAL LARVA MİGRANS'IN PCR İLE TEŞHİSİ**

Gökben ÖZBAKIŞ

**PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet DOĞANAY**

**ANKARA
2015**

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Toxocara canis* ile Deneysel Enfekte Farelerde Visceral Larva Migrants’ın PCR ile Teşhisi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Gökben ÖZBAKİŞ

Tarih: 11.12.2015

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalında
Gökben ÖZBAKIŞ tarafından hazırlanan “*Toxocara canis* ile Deneysel Enfekte
Farelerde Visceral Larva Migrans’ın PCR ile Teşhisi” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/~~OY ÇOKLUĞU~~ ile
kabul/~~ret~~ edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11.12.2015



Prof.Dr. Ahmet DOĞANAY
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof.Dr. Semih ÖGE
Ankara Üniversitesi



Prof.Dr. Aykut ÖZKUL
Ankara Üniversitesi



Prof.Dr. Sibel ERGÜVEN
Hacettepe Üniversitesi



Prof.Dr. Kader YILDIZ
Kırıkkale Üniversitesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof.Dr. K. Zafer KARAER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi

1. GİRİŞ

1.1. <i>Toxocara canis</i> Hakkında Genel Bilgi	1
1.1.1. <i>Toxocara canis</i> 'in Sistematikteki Yeri ve Sinonimleri	1
1.1.2. <i>Toxocara canis</i> 'in Vücut Yapısı	1
1.1.3. <i>Toxocara canis</i> 'in Yumurtası	2
1.1.4. <i>Toxocara canis</i> 'in Enfektif Dönem Larvası	2
1.1.5. <i>Toxocara canis</i> 'in Biyolojisi	3
1.1.6. <i>Toxocara canis</i> 'in Yaygınlığı	8
1.1.6.1. Dünyadaki Yaygınlığı	8
1.1.6.2. Türkiye'deki Yaygınlığı	9
1.2. İnsanlarda Toxocarosis	10
1.2.1. Visceral Larva Migrans	10
1.2.2. Visceral Larva Migrans'ın Yaygınlığı	11
1.2.2.1. Dünyadaki Yaygınlığı	12
1.2.2.2. Türkiye'deki Yaygınlığı	13
1.2.2.3. İnsan Toxocarosisinde Toprak, Tüy ve Çiğ Sebze-Meyvelerin Önemi	14
1.2.3. İnsanlardaki Toxocarosisde Klinik Bulgular ve Patogenez	17
1.2.4. Ocular Larva Migrans (Ocular Toxocarosis)	18
1.2.5. Nörolojik Toxocarosis	20
1.2.6. Covert Toxocarosis	21
1.2.7. VLM Teşhisi	21
1.2.7.1. Non-Spesifik Testler	22
1.2.7.2. Direkt Teşhis	23
1.2.7.3. Görüntüleme Yöntemleri	23
1.2.7.4. Serolojik Teşhis	24
1.2.7.5. Moleküler Teşhis	26

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç	32
2.1.1. Örneklenen hayvanlar	32
2.1.2. <i>Toxocara canis</i> , <i>Toxocara cati</i> ve <i>Toxascaris leonina</i> Örneklerinin Elde Edilmesi	32
2.1.3. Kedi, Köpek ve İnsan Örneklerinin Elde Edilmesi	32
2.1.4. Çalışmada Kullanılan Kitler	33
2.1.4.1. DNA ekstraksiyon kiti	33

2.2.	Yöntem	33
2.2.1.	<i>Toxocara canis</i> Yumurtalarının Toplanması ve Enfektif Döneme Getirilmesi	33
2.2.2.	Deney Hayvanlarında Visceral Larva Migrans Oluşturulması	34
2.2.3.	Nekropsi Zamanları	34
2.2.4.	Çalışmada Kullanılan Organların İşlenmesi-Larvaların Sayımı	35
2.2.5.	Moleküler Teşhis ve Karakterizasyon	35
2.2.5.1.	DNA Ekstraksiyonu	36
2.2.5.1.1.	BALB/c Fare Dokusundan DNA Ekstraksiyonu	36
2.2.5.1.2.	<i>Toxocara canis</i> , <i>Toxocara cati</i> ve <i>Toxascaris leonina</i> 'nın DNA Ekstraksiyonu	36
2.2.5.1.3.	Deteksiyon Sınırının Belirlenmesi Amacıyla <i>T. canis</i> Yumurtasının DNA Ekstraksiyonu	37
2.2.5.2.	Polymerase Chain Reaction (PCR)	38
2.2.5.3.	PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi ile Görüntülenmesi	39
2.2.5.4.	Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analizi	40
2.2.5.5.	İstatistiksel Analizler	41
3. BULGULAR		
3.1.	Parazitolojik Sonuçlar	42
3.2.	PCR Sonuçları	45
3.3.	RFLP Sonuçları	49
3.4.	İstatistiksel Değerlendirme	50
4. TARTIŞMA		57
5. SONUÇ ve ÖNERİLER		64
ÖZET		67
SUMMARY		68
KAYNAKLAR		69
EKLER		
Ek-1	Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığından alınan etik kurul kararı	83
Ek-2	Revize edilen etik kurul kararı ve revize gerekçesi	84
Ek-3	Fare dokularındaki ekstraksiyon sonucu ölçülen nükleik asit konsantrasyonları (ng/μl) ve 260/280 dalga boyu ölçümleri	87
Ek-4	Hazırlanan larva/morulalı yumurtaların ekstraksiyonu sonrası nükleik asit konsantrasyonları (ng/μl) ve 260/280 dalga boyu ölçümleri	89
ÖZGEÇMİŞ		90

ÖNSÖZ

Toxocara canis köpeklerde yaygın olarak görülen zoonoz karakterde bir helminttir. Ülkemizde yaygın olarak görülmesine rağmen insanlarda oluşturduğu sendromlardan Visceral Larva Migrants'ın az sayıda kaydının bulunması, rutinde yapılan teşhis yöntemlerinin yetersiz olduğunu düşündürmektedir. Bu durum yeni teşhis yöntemlerinin kullanılmasına teşvik etmektedir. Bu amaçla BALB/c farelerde deneysel olarak VLM oluşturulmuş ve PCR-RFLP tekniği ile moleküler teşhisi yapılmıştır. Çalışma sonucu sensivite, spesifite ve doğruluk oranları çıkartılmış ve deteksiyon limiti de saptanmıştır.

Destegini hiçbir zaman esirgemeyen, gecenin 11-12'sinde bölüme gelip, uzayan laboratuvar aşamaları sırasında beni yalnız bırakmayan, tezimin finansal kaynakları annem ve babam Nergiz-Naci ÖZBAKIŞ'a, tez istatistiklerimi yapan abim Y. Gökhan ÖZBAKIŞ'a; doktora sürecini her daim merak eden dedem Ali TOPÇU'ya minnet ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma süresince yardımlarını esirgemeyen tez izleme komitesi üyeleri, danışman hocam Prof.Dr. Ahmet DOĞANAY ve Prof.Dr. Semih ÖGE'ye, çalışmada kullandığım yöntemleri oturtmamı sağlayan ve bu konuda yol gösteren Prof.Dr. Aykut ÖZKUL'a, Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim üyeleri; Prof.Dr. Hatice ÖGE, Prof.Dr. H. Oğuz SARIMEHMETOĞLU ve Prof.Dr. Bahadır GÖNENÇ'e, Parazitoloji Anabilim Dalı eski başkanı, emekli öğretim üyesi Prof.Dr. Ayşe BURGU'ya, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı laboratuvarını kullanmama izin veren, Anabilim Dalı eski başkanı emekli öğretim üyesi Prof.Dr. İbrahim BURGU ve Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Yılmaz AKÇA'ya, Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. T. Çiğdem OĞUZOĞLU'na, istatistik analizlerimin kontrollerini yapan Prof.Dr. Safa GÜRCAN'a, beraber çalıştığım araştırma görevlisi arkadaşlarım Araş.Gör. Ceren AŞTI ve Araş.Gör. Görkem CENGİZ'e, Viroloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi ve Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin
ATP6	ATP sentetaz alt ünite 6-ATP synthase subunit 6
<i>A. suum</i>	<i>Ascaris suum</i>
<i>B. procyonis</i>	<i>Balyascaris procyonis</i>
bp	Base pair
C	Sitozin
°C	Celsius
C.A.	Canlı ağırlık
CCD kamera	Charge-Coupled Device kamera
cm	Santimetre
cox1	Cytochrome c oxidase subunit 1
cox3	Cytochrome c oxidase subunit 3
CT	Computed Tomography
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
ECP	Eosinophil Cationic Protein
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
g	Gram
G	Guanin
GTγ	G-protein transducin gama
HCl	Hidroklorik Asit
IEP	Immunoelectrophoresis
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IHAT	Indirect Hemagglutinin Test
ITS-1	Internal Transcribed Spacers 1
ITS-2	Internal Transcribed Spacers 2

kIU/L=IU/L	Internasyonel Unite/litre
L2	Larva 2
L3	Larva 3
L4	Larva 4
L5	Genç parazit
MgCl₂	Magnezyum Klorür
M	Molar
mg/ml	Miligram/mililitre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
µm	Mikrometre
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
mtDNA	Mitokondrial DNA
NaCl	Sodyum Klorür
nad1	NADH dehydrogenase subunit 1
nad6	NADH dehydrogenase subunit 6
NT	Nörolojik Toxocarosis
OLM	Ocular Larva Migrans
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polimerase Chain Reaction
<i>P. equorum</i>	<i>Parascaris equorum</i>
pmol/µl	pikomol/mikrolitre
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
rDNA	Nükleer ribozomal DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
sn	Saniye
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
T	Timin

<i>T. canis</i>	<i>Toxocara canis</i>
<i>T. cati</i>	<i>Toxocara cati</i>
<i>T. leonina</i>	<i>Toxascaris leonina</i>
TAE	Tris-Asetik Asit- EDTA
TES ELISA	<i>Toxocara</i> Excretory/Secretory antijen Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
TES WB	<i>Toxocara</i> Excretory/Secretory antijen Western Blot
USG	Ultrasonography
UV	Ultraviolet
VLM	Visceral Larva Migrans
WB	Western Blot

ŞEKİLLER

Şekil 3.1.	Farelerde VLM Oluşturulması Amacıyla Toplanan ve Enfektif Döneme Getirilen <i>T. canis</i> Örnekleri	42
Şekil 3.2.	Fare dokularında Teşhis Edilen <i>T. canis</i> Larvaları	43
Şekil 3.3.	Primerlerin Köpek, Kedi ve İnsan gDNA'sındaki Reaksiyonu	45
Şekil 3.4.	<i>T. canis</i> Yumurtalarının Deteksiyon Sınırı PCR Sonuçları Agaroz Jel Görüntüleri	46
Şekil 3.5.	Nekropsi 2. Gün D2 Grubu PCR Sonuçları Agaroz Jel Görüntüleri	47
Şekil 3.6.	Nekropsi 4. Gün K1 Grubu PCR Sonuçları Agaroz Jel Görüntüleri	48
Şekil 3.7.	Nekropsi 14. Gün D4 Grubu PCR Sonuçları Agaroz Jel Görüntüleri	49
Şekil 3.8.	Nekropsi 14. Gün D4 Grubu Bbs-I Enzim Kesimi Agaroz Jel Görüntüleri	50
Şekil 3.9.	Pozitif Kontrol Gruplarında Dokulardaki Larva Sayılarına Göre Günler Arası Fark (Kruskal-Wallis Testi) Sonuçları	55
Şekil 3.10.	Dokularda Farklı Nekropsi Günlerinde Saptanan Larva Sayılarının Kruskal-Wallis Testi ile Analizi	56

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	PCR’da Kullanılan Primer Dizinleri ve Elde Edilen Ürün Büyüklüğü	38
Çizelge 2.2.	PCR’da Çoğaltılan Bölgenin Dizini	38
Çizelge 2.3.	Çalışmada Kullanılan PCR Karışım Bileşenleri ve Miktarları	39
Çizelge 2.4.	PCR Karışımına Uygulanan Isı Döngüleri	39
Çizelge 2.5.	PCR Ürününün Bbs-I Restriksiyon Endonükleaz Enzimi Kesimi Sonucu Oluşan İki Fragmenti	40
Çizelge 3.1.	Nekropsi 2. Gün Pepsin-HCl ile Digesyona Tabi Tutulan Doku Miktarı ve Toplanan Larva Sayıları	43
Çizelge 3.2.	Nekropsi 4. Gün Pepsin-HCl ile Digesyona Tabi Tutulan Doku Miktarı ve Toplanan Larva Sayıları	44
Çizelge 3.3.	Nekropsi 7. Gün Pepsin-HCl ile Digesyona Tabi Tutulan Doku Miktarı ve Toplanan Larva Sayıları	44
Çizelge 3.4.	Nekropsi 14. Gün Pepsin-HCl ile Digesyona Tabi Tutulan Doku Miktarı ve Toplanan Larva Sayıları	45
Çizelge 3.5.	Nekropsi 2. Gün PCR Sonuçları	46-47
Çizelge 3.6.	Nekropsi 4. Gün PCR Sonuçları	47
Çizelge 3.7.	Nekropsi 7. Gün PCR Sonuçları	48
Çizelge 3.8.	Nekropsi 14. Gün PCR Sonuçları	49
Çizelge 3.9.	Negatif ve Pozitif Kontrol Gruplarında Farklı Dokularda ve Farklı Nekropsi Günlerinde Saptanan Larva Sayılarının (adet/gram) Tanımlayıcı İstatistikleri	51
Çizelge 3.10.	Negatif ve Pozitif Kontrol Gruplarında Farklı Dokularda Saptanan PCR Sonuçlarının Larva Sayıları (adet/gram) ile İlgili İstatistikleri	52
Çizelge 3.11.	Dokulara Ait Ki-Kare Testi Sonuçları	53
Çizelge 3.12.	Dokulara Göre PCR Sonuçlarının Sensitivite, Spesifite ve Doğruluk Oranı Analizi	54

1. GİRİŞ

1.1. *Toxocara canis* Hakkında Genel Bilgi

1.1.1. *Toxocara canis*'in Sistematikteki Yeri ve Sinonimleri

Toxocara canis'in sistematikteki yeri;

Kök: Nematelminthes

Sınıf: Nematoda

Takım: Ascaridida

Alt Takım: Ascaridata

Üst Aile: Ascaridoidea

Familya: Toxocaridae

Cins: *Toxocara*

Tür: *Toxocara canis* (Werner, 1782) (Kassai, 1999).

Sinonimleri; *Lumbricus canis*, *Ascaris weneri* (Rudolphi, 1793), *Ascaris marginata* (Rudolphi, 1802), *Belascaris marginata* (Levine, 1968 ve Yamaguti, 1961).

1.1.2. *Toxocara canis*'in Vücut Yapısı

Toxocara canis (Werner, 1782) beyazımtırak renkli, ön ucunda üç adet dudak bulunan, mızrak ucu şeklinde servikal kanatlara sahip ön kısmı kıvrımlı bir nematottur. Parazitin uzunluğunca 16-22 µm aralıklarla paralel çizgiler ve özefagusunda bulbu bulunur (Lapage, 1968; Levine, 1968; Roberts ve Janovy, 2006 ve Soulsby, 1982).

Erkekleri; 4-10 cm uzunluğunda, 2-2,5 mm genişliğindedir. 20-30 adet küçük preanal, beş adet postanal papili ve kaudal kanatları bulunur. Arka kısmı daralarak

sonlanır. 750-950 μm uzunlukta spikülömleri mevcuttur. Spikülömler nadiren eşit uzunlukta değildir (Levine, 1968; Soulsby, 1982 ve Taylor ve ark., 2007).

Dişileri; 5-18 cm uzunluğunda, 2,5-3 mm genişliğindedir. Vulva vücudun ön üçte birinin sonunda yer alır. Dişi genital organları vulval bölgenin anterioruna ve posterioruna yayılır biçimdedir (Güralp, 1981; Levine, 1968 ve Soulsby, 1982).

1.1.3. *Toxocara canis*'in Yumurtası

Koyu renkli, yuvarlak-ovoid şekilde, 75x90 μm büyüklüğündedir. Subglobular yapıda, kalın kabuklu olup, kabuk yüzeyi pürüzlüdür (Kassai, 1999; Levine, 1968; Soulsby, 1982 ve Webster, 1958).

Yumurtanın dış yüzeyinde bulunan pürüzlü yapı, protein tabakasından kaynaklanır ve yumurtaların opak görünmesini sağlar (Webster, 1958). Yüzeydeki her bir çukur çok köşelidir. Çukurun iç çapının büyüklüğü, albümin katının kalınlığından iki kat daha büyüktür (Uga ve ark., 2000). Yüzeydeki çukurluklar ve yükseltiler düzensiz yerleşmiştir. Aynı cins parazit olan *Toxocara cati*'ye göre çukurlukları daha büyük ve krater formunda, sayıları da daha azdır (Ubalaker ve Allison, 1975).

Yumurtalar konaktan dışarı atıldığında embriyosuzdur (Roberts ve Janovy, 2006).

1.1.4. *Toxocara canis*'in Enfektif Dönem Larvası

Larva; köpek dokularında 257-460 μm uzunlukta (ortalama: 393 μm), 18-23 μm (ortalama: 19 μm) genişlikte (Sinha, 1966), fare dokularında; 357-445 μm uzunlukta, 18-20 μm genişlikte bulunmuştur. Larvaların ön ucunda fincan şeklinde

ağız kapsülü mevcuttur. Bir dorsal, iki subventral (subterminal) olmak üzere üç adet dudağı vardır. Dudağın anterioru keskin, ağız kapsülünün ventral kenarı da diken şeklinde kalınlaşmaya sahiptir. Işık mikroskobunda düşük büyütme seviyesi olan objektiflerle yapılan incelemelerde larvalar iki bölümden oluşur gibi görülür. Özefagal bölge, vücudun ön 1/3'ünden daha küçüktür. Daha opak olan intestinal bölge, kuyruk ucunun 60 µm anterioruna kadar yerleşmiş globullerden oluşur. Özefagus, larva uzunluğunun 1/3'ü (153 µm) kadar olup, dört bölgeden oluşur. Dar olan procorpus; 20 µm uzunlukta, kalın olan metacarpus; 35 µm uzunlukta ve 5 µm genişliktedir. Dar ve uzun isthmus; procorpus ve metacarpusun uzunluğu kadar, terminal bulb ise 20-25 µm uzunlukta, 6-10 µm genişliktedir. Dorsal özefagal bezlerin yapısı iyi görülürken, iki adet olan subventral bezler net değildir. Sinir halkası özefagusun orta bölgesinde yer alır. Bağırsakların görünür bir lümeni yoktur. Anal delik alt orta çizgide kuyruk ucu ile bağırsakların sonuna aynı uzaklıkta yer alır. İki kütikular kalınlık olan lateral kanatları bulunur (Nichols, 1956).

Önceleri *T. canis*'te enfektif dönemin Larva 2 (L2) olduğu belirtilmekteydi (Anderson, 2000; Nichols, 1956; Schacher, 1957 ve Webster, 1958). Ancak ilk defa Arajuo (1972) ışık mikroskobu ile yaptığı araştırmada yumurta içinde iki gömlek değiştirme olduğunu kaydetmiş, bunu takiben Brunaska ve ark. (1995) yaptıkları ultrastruktural çalışmada yumurta gelişiminin 11. ve 15. günlerinde yumurta içerisinde iki gömlek değiştirme görüldüğünü ve oluşan enfektif özellikteki larvanın Larva 3 (L3) olduğunu saptamıştır. Son zamanlarda yapılan yayınlarda da enfektif dönem larvanın L3 olduğu bildirilmektedir (Kassai, 1999; Macpherson, 2013; Roberts ve Janovy, 2006; Schnieder ve ark., 2011 ve Taylor ve ark., 2007).

1.1.5. *Toxocara canis*'in Biyolojisi

Toxocara canis köpek ve tilkilerin ince bağırsaklarında yerleşim gösteren ve köpeklerde görülen en önemli gastrointestinal helmintlerdendir (Kassai, 1999 ve Schnieder ve ark., 2011).

Konaklara bulaşma dört farklı yol ile şekillenmektedir.

a) Larvalı yumurtaların oral yolla alınması, b) Prenatal ya da intrauterin bulaşma, c) Transmammarial ya da laktojen (galaktojen) bulaşma (sütün geldiği birinci günden doğum sonrası beş haftalık süreyi içerir), d) Paratenik konakların yenmesi şeklindedir (Kassai, 1999 ve Soulsby, 1982).

Prepatent periyodlar bulaşma yoluna göre farklılık taşır. Prenatal bulaşmada 16 gün, enfektif dönem yumurtaların oral olarak alınmasıyla 28 gün ya da daha fazla, paratenik konaklarla 19 gün, galaktojen yol bulaşmada ise 27-35 gün sonra konakların dışkısında yumurtalara rastlanır (Deplazes ve ark., 2011; Eckert ve ark., 2008 ve Kassai, 1999).

a) *Toxocara canis* yumurtaları ile oral bulaşma

Yumurtalar dışkı ile atıldığında embriyosuzdur. Optimal koşullarda, 25-30 °C arasında ve % 85-95 nemde 15 günde enfektif larval aşamaya gelmektedir. Toprak yapısı, iklim koşulları gibi etkenlere bağlı olarak gelişim 3-6 haftadan birkaç aya kadar sürebilir. Enfektif yumurtalar doğada en az bir sene kadar canlılığını koruyabilmektedir. Konak tarafından sindirim yoluyla alınan yumurtalar duodenumda 2-4 saat içerisinde açılır ve serbest kalan enfektif larvalar bağırsak mukozasına girerler. Buradan lenf damarına girerek mezenterik lenf nodülüne göç ederler. Sonrasında, venöz kapillar damarlar ile karaciğere gelirler. Larvaların çoğu karaciğere enfeksiyondan sonra 24 saat içinde ulaşır. Takiben 12 saat içinde çoğu larva karaciğerden göç eder. Karaciğerde kalan ve göçe devam etmeyen larvalar kapsüle olurlar. Karaciğeri vena cava ile terk edip kalbe geçen larvalar, buradan da pulmoner arter ile enfeksiyondan sonra 24-36 saat içinde akciğere ulaşırlar, 96. saate kadar sayıları artar (Schnieder ve ark., 2011).

Akciğerden sonra larvalar; yaşa, beslenmeye, konağın immun sistemine ve enfeksiyonun dozuna bağlı olarak bağırsaklara göç edebilir ve patent enfeksiyon şekillendirebilir ya da larva migrans oluşturup somatik dokulara yerleşebilirler (Schnieder ve ark., 2011).

Patent enfeksiyonu tamamlamak için larvalar alveol duvarına girip, bronşiyol ve trakeadan farinkse kadar göç ederler. Yaklaşık 7-9 gün sonra trakea ve özefagusta görülen larvalar, enfeksiyondan 1-2 hafta sonra gastrointestinal sisteme ulaşır. Genç parazit (L5) ince bağırsaklarda erişkin hale geçer. Enfeksiyondan 4-5 hafta sonra dışkıda ilk yumurtalar görülür (Schnieder ve ark., 2011).

Yavru köpeklerde yaşla birlikte trakeal göç ve patent enfeksiyon şekillenme oranı azalır. Çoğu larvalar kapillar duvarlarına girip, vasküler sisteme tekrar giriş yaparak somatik göç yaparlar. Bu göç genellikle üç aylıktan büyük köpeklerde görülür. Bunlarda erişkin parazit gelişimi düşüktür. Somatik göçteki *T. canis* larvaları genellikle karaciğerde, akciğere yakın olan organlarda, merkezi sinir sisteminde (MSS) ve plöral boşlukta görülür. Ayrıca iskelet kaslarına ve böbreklere de yerleşim gösterir (Schnieder ve ark., 2011).

b) Prenatal bulaşma

Toxocara canis'in biyolojisindeki en önemli bulaşma yolu prenatal enfeksiyondur. Transplasental ya da intrauterin bulaşma olarak da adlandırılır (Schnieder ve ark., 2011). Anneler somatik dokularındaki larvalarını ardışık üç gebelik dönemi boyunca yavrularına aktarırlar (Soulsby, 1982). Yapılan bir araştırmada göbek kordonunda iki adet larva bulunmuş, bu durum yavru uterustayken anneden yavruya larval bulaşmada göbek kordonunun merkez nokta olduğunu düşündürmüştür (Koutz ve ark., 1966).

Genel olarak, gebeliğin 42. gününden itibaren (hormonal değişikliklerin etkisiyle) annede aktive olan somatik larvaların intrauterin bulaşmasıyla yavruların neredeyse tamamı enfekte olmaktadır (Deplazes ve ark., 2011; Kassai, 1999 ve Overgaauw ve van Knapen, 2013). Ancak bu konuda yapılan araştırmalarda birkaç farklılık dikkati çekmiştir. İlgili çalışmalara atfen aktive olan larvaların doğum öncesi ancak 43. günde görülmeye başlandığı, 47. günden itibaren de deneysel enfekte edilen yavruların hepsinde görüldüğü kaydedilmiştir. Ayrıca, Scothorn ve ark. (1965)'na atfen Schnieder ve ark. (2011) gebeliğin 35. gününe kadar yavrularda

larvalara rastlanmadığını, gebeliğin 56. gününde görüldüğünü kaydetmiştir. Larvaların gebeliğin farklı günlerinde tespit edilmesi, konağın immun sistemine, genetik faktörlerine, beslenmesine bağlı olarak değişebileceğini düşündürmektedir. Alınan larvalar yavruların karaciğerine göç etmekte, buna ek olarak % 0,4 oranda larvanın da kas dokusu, beyin, böbrek vs. bulunduğu bildirilmektedir. Doğum öncesi yavrunun karaciğerinde bulunan larvalar, doğumla birlikte bir an önce (doğumdan yarım saat sonra) akciğere ulaşır. Trakeal göç gerçekleşir (Schnieder ve ark., 2011).

c) Galaktojen bulaşma

Prenatal bulaşmaya göre daha az görülen galaktojen bulaşmada, anneden süt emme esnasında yavru köpeklere geçen larvalar, ince bağırsaklarda direkt olarak erişkin hale gelirler (Overgaaauw ve van Knapen, 2013; Roberts ve Janovy, 2006 ve Soulsby, 1982).

Doğumdan sonra birinci günde sütte larvalara rastlanır. Sütteki larvaların sayısı giderek artar ve doğumdan sonraki 7-14. günler arasında en üst seviyeye ulaşır. Bu yolla bulaşma, en çok postpartumun ilk 2-3 haftalık sürecinde görülür (Schnieder ve ark., 2011). Sütle larva atılımı doğumdan sonra 38. güne kadar devam eder (Overgaaauw ve van Knapen, 2013). Meme dokusundaki larvalar uzamış şekilde (uzamış=i şeklinde) bulunurken, interstisyumda ise ya uzamış ya da yarım ay şeklinde bulunur. Periglandular konjuktif dokuda granülomlar içerisinde kapsüle olan larvalar bez dokunun tüm bölgelerinde bulunmakla beraber, çoğunlukla alveolar kısımda görülür. Meme damarlarında görülmemesi, larvaların çoğunlukla kan dolaşımıyla mı yoksa somatik olarak mı göç ettiğini aydınlatamamaktadır (Schnieder ve ark., 2011).

Periparturient dönemdeki annelerde *T. canis* ile farklı yollarla patent enfeksiyon görülebilir. Bu durum birkaç şekilde açıklanmaya çalışılmıştır:

1. Anneler, enfekte yavrularının dışkılarındaki genç intestinal Larva 4'leri alarak enfekte olabilir. Yavruları emzirirken ve temizlerken oral yolla alınan bu

larvalar bağırsaklarda direkt erişkin hale gelir. Daha önce enfekte olan annelerde gelişen immunité, spesifik ve sadece L3'lere karşı geliştiği için patent enfeksiyon oluşabilmektedir (Roberts ve Janovy, 2006 ve Schnieder ve ark., 2011).

2. Sahte enfeksiyon, emzirme esnasında annenin yanlışlıkla yavrunun dışkıdaki yumurtaları alması ile gerçekleşir. Yumurtalar annenin sindirim sisteminden direkt geçer ve dışkısında görülür (Schnieder ve ark., 2011).

3. Periparturient dönemde oluşan immunsupresyonlar gebelik ve laktasyonda immunolojik cevapların azalmasına neden olur. Bu dönemdeki immunsupresyon, anne dokularında varolan inhibe larvaların gelişmesine izin verir ve aktive olan larvalar trakeal göç geçirerek, intestinal kanalda erişkin hale gelir (Kassai, 1999 ve Schnieder ve ark., 2011).

d) Paratenik konakla bulaşma

Toxocara canis'te kuşlar, rodentler (fare, rat vs.), memeli hayvanlar (tavşan, domuz, tilki vs.), omurgasızlar (yer solucanı, sinekler vs.) ve insanlar paratenik konak olarak rol oynarlar. Paratenik konaklar, enfektif dönem yumurtaların oral olarak alınması ile enfeksiyona yakalanır. Ancak bu konaklarda son konaktaki gibi bir gelişme görülmez. Sadece konak dokularında göç geçirir ve hipobiyotik larva olarak kapsül içine alınır. Non-spesifik ya da paratenik konaklarda hipobiyozdaki larvalar uzun süre canlı kalabilir. Larvaların fare, rat, kobay ve tavşanlarda en az iki yıl, tavuk ve güvercinlerde en az üç ay canlılığını sürdürdüğü, deneysel enfeksiyon ile makak maymununda dokuz sene ve küçük memeli hayvanların hayatları boyunca canlı kaldığı belirtilmiştir. Larvalar, gelişme ya da büyüme olmaksızın kanibalizm ya da karnivorizm ile paratenik konaklar arası geçiş yapabilirler. Ayrıca paratenik konaklar, ayaklarıyla ya da gagalarıyla yumurtaları bir yerden başka bir yere taşıyabilirler. *Toxocara* sp. ile enfekte paratenik konakların köpek ve kediler tarafından alınmasıyla larvalar açığa çıkmakta ve intestinal kanalda direkt olarak erişkin parazite dönüşmektedir (Despommier, 2003; Kassai, 1999; Overgaauw ve

van Knapen, 2013; Schnieder ve ark., 2011 ve The Center for Food Security&Public Health, 2005).

1.1.6. *Toxocara canis*'in Yaygınlığı

Toxocara canis'in yaygınlığı nekropsi ile erişkin parazitlerin görülmesi ya da dışkı muayeneleri ile yumurtaların aranması şeklinde araştırılmaktadır.

1.1.6.1. Dünyadaki Yaygınlığı

Nekropsi çalışmaları

Köpeklerde yapılan çalışmalarda, Çin Halk Cumhuriyeti'nde % 45,2 (Dai ve ark., 2009), Kore'de % 0,9 (Kim ve Huh, 2005), Bangladeş'te % 23,33 (Das ve ark., 2012), Etiyopya'da % 45 (Yacop ve ark., 2007), Güney Afrika'da % 19 (Minnaar ve ark., 2002), İran'da % 37 ve % 60 oranlarında (Daryani ve ark., 2009 ve Razmi ve ark., 2006) ve Mısır'da % 53,4 (Radwan ve ark., 2009) oranında *Toxocara canis*'e rastlanmıştır.

Belçika'da 134 tilki nekropsisinde % 18 (Brochier ve ark., 2007), Kırgızistan'da 151 kırmızı tilkide (*Vulpes vulpes*) % 30,4 (Ziadinov ve ark., 2010), Tunus'ta çakal ve tilkilerde yapılan çalışmada, çakalların % 16'sında (Lahmar ve ark., 2014), Mısır'da kırmızı tilkilerde % 48,8 ve gri kurtlarda (*Canis lupus*) % 59,5 (Radwan ve ark., 2009) ve Avusturalya'da 147 kırmızı tilkide % 14,9 oranında (Dybing ve ark., 2013) *T. canis* teşhis edilmiştir.

Dışkı muayenesi

Amerika Birleşik Devletlerinde % 2 ve % 2,2 oranlarında (Gates ve Nolan, 2009 ve Little ve ark., 2009), Fransa'nın St. Pierre adasında % 22,8 (Bridger ve Whitney, 2009), İspanya'da % 6,9 (Ortuno ve ark., 2014), İtalya'da % 13 (Riggio ve

ark., 2013), Portekiz’de % 7,8 (Neves ve ark., 2014), Danimarka’da % 12,4 (Al-Sabi ve ark., 2013), Galapagos adalarında % 16,5 (Gingrich ve ark., 2010), Polonya’da kızıak köpeklerinde % 17 (Bajer ve ark., 2011), Slovakya’da % 16,6 (Antolova ve ark., 2004), Finlandiya’da % 3,1 (Pullola ve ark., 2006), Avustralya’da % 1,2 (Palmer ve ark., 2008), Pakistan’da sokak köpeklerinde % 49, sahipli köpeklerde % 30 (Chattha ve ark., 2009), Zambiya’da kentsel bölgede % 11, kırsal yörede % 11,9 (Bwalya ve ark., 2011) ve Etiyopya’da % 21 (Yacop ve ark., 2007) oranında *T. canis* yumurtasına rastlanmıştır.

Slovakya’da dışkı bakısı yapılan 310 tilkide % 8,1 (Antolova ve ark., 2004), Polonya’da 72 kurtta % 6,9 ve 45 kırmızı tilkide % 11,1 oranında (Borecka ve ark., 2013), Danimarka’da ise 1040 tilkide % 59,4 (Saeed ve ark., 2006) oranında *T. canis* yumurtası kaydedilmiştir.

1.1.6.2. Türkiye’deki Yaygınlığı

Nekropsi çalışmaları

Nekropsi sonuçlarına göre parazitin köpeklerdeki yaygınlığı Ankara’da % 4,5 ile % 59,4 arasında (Ayçiçek ve ark., 1998; Doğanay, 1983; Doğanay ve Öge, 1993; Ertürk ve Tanzer, 1973; Mimioğlu ve ark., 1960; Pamukçu ve Ertürk, 1961 ve Zeybek ve ark., 1992), Konya’da % 16,66 (Aydenizöz, 1997), Kayseri’de % 40 (Şahin ve ark., 1993), Elazığ’da % 44,76 (Güralp ve ark., 1977), Kars’ta % 50 (Umur ve Arslan, 1998), Sivas’ta % 28 ve % 46 (Ataş ve ark., 1997 ve Saygı ve ark., 1990), Hatay’da % 16,7 (Yaman ve ark., 2006), İzmir’de % 3 ve % 66,6 (Budak ve ark., 1986 ve Korkmaz ve ark., 2000) ve Bursa’da ise % 39 (Tınar ve ark., 1989) oranında bulunmuştur.

Tilkiler de ise Kars’ta % 20 (Gıcık ve ark., 2009), Ankara’da % 35,2 oranında (Mimioğlu ve ark., 1965) *T. canis*’e rastlanmıştır.

Dışkı muayenesi

Dışkı bakıları sonucu parazitin köpeklerdeki yaygınlığı Ankara'da % 11,11 ve % 13,22 (Çerçi, 1992 ve Güralp, 1957), Konya'da % 14,75 (Güçlü ve Aydenizöz, 1995), Afyon'da % 36,2 ve Eskişehir'de % 47,8 (Kozan ve ark., 2007), Kayseri'de % 4,2 (Yıldırım ve ark., 2007), Erzurum'da % 20,3 (Balkaya ve Avcıoğlu, 2011), Van'da % 13,9 (Orhun ve Ayaz, 2006), Aydın'da % 20 (Ünlü ve Eren, 2007) ve İstanbul'da % 22,7 ve % 28 (Merdivenci, 1962 ve Öncel, 2004) olarak saptanmıştır.

1.2. İnsanlarda Toxocarosis

Canidae ve felidae grubuna ait olmayan konaklardaki gibi, insanlar da *T. canis* ve *T. cati* için paratenik konaktır. Dolayısıyla insanlar da larvalı yumurtaların ya da daha ender olarak larvaların oral yolla alınması ile enfekte olmaktadır. Alınan enfektif dönem larvalı yumurtalar, bağırsakta açılmakta ve L3 açığa çıkarak doku ve organlarda göç geçirmektedir (Smith ve ark., 2009). Oluşan enfeksiyonun şiddetine göre klinik olarak toxocarosis;

- a) Visceral Larva Migrans sendrom (VLM),
- b) Nörolojik Toxocarosis (NT) (Cerebral Toxocarosis)
- c) Ocular Larva Migrans sendrom (OLM) (Ocular Toxocarosis)
- d) Covert Toxocarosis (Common Toxocarosis) olmak üzere dört grupta sınıflandırılmaktadır (Strube ve ark., 2013).

1.2.1. Visceral Larva Migrans

Bazı nematod larvaları uygun olmayan konaklara giriş yaptıklarında onlarda normal konaklarındakine benzer tipik doku göçü başlar. Ancak bu göç tamamlanamaz. Tesadüfi olarak larvalar çeşitli doku ve organlarda dolaşır ve sonunda hipobiyozu uğrarlar. Oluşan bu sendroma Visceral Larva Migrans (VLM) denir. Visceral Larva Migrans'a neden olan birçok etken olmasına karşın başlıca etkenler, *T. canis*, *T. cati*, daha az olarak *Toxocara vitulorum*, *Strongyloides*

stercoralis, *Capillaria hepatica* (rodentlerde) larvaları ve *Lagochilascaris minor* (vahşi kedilerde)'dür. *Toxascaris leonina* da laboratuvar hayvanlarının dokularına yerleşebilmekte, potansiyel olarak insanlarda da hastalığa neden olabileceği düşünülmektedir (Despommier, 2003; Kassai, 1999; Roberts ve Janovy, 2006 ve Soulsby, 1982).

Önceleri köpek ve kedi parazitlerinin insanları enfekte etmediği, onlar için tehlikeli olmadığı düşünülmekteyken, 1950'li yılların erken dönemlerinde bu durumun doğru olmadığı saptanmış, *T. canis* kökenli vakalar bildirilmeye başlanmıştır (Roberts ve Janovy, 2006). İlgili yayına atfen, insanlarda toxocarosis enfeksiyonu ilk olarak Wilder tarafından 1950 yılında tanımlanmıştır. Retinal granülomalı bir çocukta tanımlanamayan bir nematod larvası bulunmuştur (Despommier, 2003 ve Sprent, 1963). Beaver ve ark. (1952)'de ise ilk kez VLM'nin tanısını yapmış yüksek eozinofili, uzun süreli multisistem hastalıkları görülen üç çocukta, göç eden larvaların neden olduğu karaciğer lezyonlarına rastlamıştır. Bu grup hastalarda VLM'nin klinik semptomları saptanmış, histopatolojik olarak dokulardan biyopsi alınarak *T. canis* ya da *T. cati* larvalarının hastalığa sebep olduğu tespit edilmiştir.

İnsanlar tarafından oral yolla alınan enfektif dönem larva taşıyan *T. canis* yumurtaları ince bağırsakta açılarak, bağırsak duvarına girer ve hepato-pulmonar yol ile somatik göç yapar. Çeşitli dokularda yerleşim gösterir. Larvalar bulunduğu dokularda konak tarafından oluşturulan yangısal reaksiyonlar sonucu granülomlar ile çevrelenir (Kassai, 1999 ve Overgaauw ve van Knapen, 2008).

1.2.2. Visceral Larva Migrans'ın Yaygınlığı

Günümüze kadar dünyada rapor edilen VLM vakaları parazitin son konaklardaki yaygınlığına göre oldukça düşüktür. Çoğu araştırmacı bu durumun buzdağının görünen kısmı olduğunu düşünmekte, gerçekte *T. canis*'in insanlarda

yaygın olduğunu fakat çoğu vakanın anlaşılamadığını ya da rapor edilemediğini belirtmektedir (Roberts ve Janovy, 2006).

Dünyada Visceral Larva Migrans yaygınlığı daha çok hastalığa yatkınlığı olan çocuklarda, mental-astım vs. problemi olan hastalarda yapılan serolojik ve histopatolojik testlerle araştırılmaktadır.

1.2.2.1. Dünyadaki Yaygınlığı

İnsan toxocarosisinin dünyadaki seroprevalans araştırmaları ile ilgili Smith ve Noordin (2006), Avrupa’da % 1,6 ile % 33,1; Amerika’da % 5,2 ile % 23,1; Güney Amerika’da % 5,2 ile % 39; Uzak doğuda % 14; Avustralya’da % 7,3; Asya kıtasında % 19,6 ile % 92,8 oranda yaygınlık gösterdiğini kaydetmiştir.

Brezilya’da 1309 çocukta anti-*Toxocara* IgG seropozitivitesi İndirekt ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemiyle % 48 (Mendonça ve ark., 2013) olarak saptanmış, aynı ülkede yapılan başka bir ELISA ile toxocarosis çalışmasında 242 çocukta % 8,7’sinde anti-*Toxocara* antikor pozitif bulunmuştur (Teixeira ve ark., 2006). Latin Amerika’da atopisi ve hırıltılı solunumu olan 1445 çocukta % 47 oranında seropozitivite bulunmuştur (Mendonça ve ark., 2012). Arjantin’de 206 çocukta hematolojik parametrelere ve ELISA ile antikor düzeylerine bakılmış, % 37,9 oranda pozitiflik gözlemlenmiştir (Alonso ve ark., 2000). Nijerya’da 336 ilkokul çocuğunda *Toxocara* Excretory/Secretory (TES) antijeni ile Western Blot (WB) yapılmış, % 86,1 oranda seropozitiviteye rastlanmıştır (Gyang ve ark., 2015). Polonya’da ELISA ile 242 öğrencide toxocarosisin seroprevalans araştırmasında, öğrencilerin % 14,5’inde yüksek pozitifliğe (OD: ≥ 1.026), % 4,9’unda sınırdaki (OD: 0.823-1.025) pozitifliğe rastlanmıştır (Jarosz ve ark., 2010). Tayvan’ın kuzeydoğu dağlık bölgesinde yaşayan yerli halktan 73 okul çocuğunda TES ELISA yöntemi ile % 57,5 oranda pozitiflik bulunmuştur (Fan ve ark., 2005).

Brezilya’da sağlıklı 253 bireyden alınan kan örneklerinin ELISA ile bakısında % 8,7 seropozitif sonuç alınmıştır (Negri ve ark., 2013). Kanada’da 50 kişiden alınan serum örneklerinde ELISA yöntemi ile % 2 oranında seropozitifliğe rastlanmıştır (Levesque ve ark., 2007).

Meksika’nın Durango şehrinde 168 bahçıvan ve 168 kontrol grubu insanda ELISA ile anti-*Toxocara* IgG antikor araştırılmış, her iki çalışma grubunda da seropozitivite % 1,8 oranda bulunmuştur (Alvarado-Esquivel ve ark., 2014).

1.2.2.2. Türkiye’deki Yaygınlığı

Eskişehir, Bilecik, Kütahya ve Afyon illerinde 571 çocukta *T. canis* yönünden yapılan ELISA araştırmasında % 12,95 oranında seropozitif sonuç alınmıştır (Doğan ve ark., 2007). Aynı şekilde Sivas’ta 186 çocukta % 32,3 (Oğuztürk ve Saygı, 2002), Kütahya’da 119 çocuktan 9’unda (Akdemir, 2010) ve İstanbul’da 177 çocukta % 33,8 oranında (Büyükbaba ve ark., 1996) seropozitiflik saptanmıştır.

Malatya, Elazığ, Diyarbakır illerinde 96 mental problemlili ve 85 kontrol grubu çocukta, sırasıyla % 18,8 ve % 7,1 oranlarında *T. canis* yönünden seropozitiflik saptanmıştır (Kaplan ve ark., 2004).

Ankara’da karın ağrısı olan, parazit ya da idrar yolu enfeksiyonu bulunmayan 37 hastada ve 25 kontrol grubu çocukta ELISA yapılmış, sırasıyla % 51,35 ve % 8 (Güngör ve ark., 1999) *Toxocara* seropozitifliği saptanmıştır.

Aydın’da eozinofilisi olan ve olmayan 350’şer kişide ELISA ile sırasıyla % 32,6 ve % 20,3 oranda *T. canis* seropozitivitesi bulunmuştur (Yaman Karadam ve ark., 2008).

İzmir’de hepatomegalisi, kas ağrısı ve doğrudan köpeklerle yakın ilişkisi olan 70 hastada *T. canis* antijeni ile Indirect Hemagglutination Testi (IHAT) yapılmış, % 44,28’inde seropozitif sonuç alınmıştır (Kuman ve Altıntaş, 1984).

Ankara’da 126 astımlı ve 60 kontrol grubu insanda ELISA ile anti-*Toxocara* IgG seropozitifliği sırasıyla % 9,7 ve % 5 olarak tespit edilmiştir (Kustimur ve ark., 2007).

Elazığ’da 98 şizofren hasta ve 100 kontrol grubu insanda yapılan ELISA taramasında sırasıyla % 45,9 ve % 2 oranında bu enfeksiyona bağlı seropozitifliğe rastlanılmıştır (Kaplan ve ark., 2008).

Aydın’da 100 idiyopatik epilepsi hastası ve 50 kontrol grubu insan ile yapılan araştırmada ise % 12 ve % 5,9 oranlarında seropozitiflik kaydedilmiştir (Akyol ve ark., 2007)

Isparta ve Edirne illerinde *T. canis* yönünden hem ELISA, hem de histopatolojik olarak, pozitif bulunan vakalar (Gorgulu ve ark., 2006 ve İnan ve ark., 2006) bildirilmiştir. Van’da da ELISA ile *T. canis* bakımından seropozitif bulunan bir olgu (Doğan ve ark., 2009) tespit edilmiştir.

1.2.2.3. İnsan Toxocarosisinde Toprak, Tüy ve Çiğ Sebze-Meyvelerin Önemi

Şehir yaşamında, köpek sahipleri parkları köpeklerini dolaştıracak en iyi bölge olarak kabul ederler. Ebeveynler de çocuklarını oyun oynamaya çimlerin üstüne aynı parklara getirirler (Roberts ve Janovy, 2006). Çocuklar, kum havuzlarında ve oyun alanlarında oynarken buralara köpek ve kedilerin dışkıları ile atılan yumurtaları tesadüfen alarak, enfeksiyona yakalanırlar (Despommier, 2003). *Toxocara* sp. yumurtaları, çevresel faktörlere karşı oldukça dayanıklı ve yıllarca enfektif özelliğini korumaktadır (Bowman, 2014). Küçük yaşlardaki çocuklar her objeyi ağızlarına

götürme ve tadına bakma eğilimindedir. Pika alışkanlığı, jeofaji vs. sayesinde kontamine toprak ile çok sayıda enfektif dönem yumurta alınabilmekte, dolayısıyla hastalık bu yaşlar arasında yaygın olarak görülmektedir (Kassai, 1999; Roberts ve Janovy, 2006; Smith ve ark., 2009 ve Soulsby, 1982). Enfeksiyon en çok 1-5 yaş arası çocuklarda görülür. Küçük çocukların yavru köpeklerle çok oynaması da enfeksiyonun bu yaşlarda daha yaygın olarak görülmesine yol açar (Kassai, 1999; Roberts ve Janovy, 2006 ve Soulsby, 1982).

Toxocarosiste, toprak örneklerinin kontaminasyonu, kedi-köpek tüylerinde ve çiğ sebze-meyvelerde bulunan yumurtalardan oluşabilecek enfeksiyonlar hakkında dünyada ve Türkiye’de çok sayıda araştırma ile bilgi verilmektedir.

Toprak muayenesi

Brezilya’da 25 meydandan alınan örneklerde % 8 oranında *Toxocara* sp. yumurtasına rastlanırken (Mandarino-Pereira ve ark., 2010), aynı ülkede plajdan alınan 2520 örneğin 458’inde çeşitli parazitlere ait gelişim dönemlerine rastlamış, bunun % 59,4’ünde *Toxocara* sp. yumurtası bulunmuştur (Rocha ve ark., 2011). Venezuela’da şehrin 5 bölgesinde 25 park ve meydandan alınan toprak örneklerinde % 55 (Devera ve ark., 2008), Kosta Rika’da alınan 44 çim örneğinde % 14, 243 toprak örneğinde % 0,8 ve 16 plaj kumu örneğinde % 12 oranda *Toxocara* sp. yumurtası kaydedilmiştir (Paquet-Durand ve ark., 2007). Çek Cumhuriyeti’nde parklardan alınan 49 örnekte % 10,5; evlerin arka bahçelerinden alınan (çiçek altlıkları) 20 örnekte % 17,4; kırsal alanlardaki tarlaların yakınlarından alınan 30 örnekte % 2, barınak etrafından alınan 20 örnekte % 2,5 ve kum havuzlarından alınan 126 örnekte % 5,6 oranda embriyolu yumurtalara rastlanmıştır (Dubna ve ark., 2007). Polonya’da okul bahçesi, çocuk parkları ve kum havuzlarından alınan 88 örnekte % 9,3’ünde çeşitli helmint yumurtalarına rastlanmış, yumurtaların % 73,5’inin *Toxocara* sp. olduğu saptanmıştır (Błaszowska ve ark., 2013). Romanya’nın Bükreş şehrinde oyun parkı, köpek barınağı ve parklardan alınan 45 toprak örneğinde % 17,1 oranında *Toxocara* sp. yumurtasına rastlanmıştır (Tudor, 2015). İran’da 190 toprak ve çim örneğinde sırasıyla % 3,15 ve % 8,42 oranda *Toxocara* sp. yumurtası (Sarai ve ark., 2012), 210 park, meydan ve sokaklardan

alınan toprakların mikroskopik incelemesinde % 30,4 ve PCR yöntemi ile % 33,8 oranında *Toxocara* sp. yumurtası olduğu kaydedilerek, %5,7'sinin *T. canis* (Khademvatan ve ark., 2014) olduğu saptanmıştır. Japonya'da 107 kum havuzundan 8'inde *Toxocara* sp. yumurtası bulunmuştur (Matsuo ve Nakashio, 2005).

Konya'da kum örneklerinin % 4,16'sı (Güçlü ve Aydenizöz, 1998), Aydın'da % 18,91'i (Gürel ve ark., 2005) *Toxocara* sp. ile enfekte bulunurken, Ankara'da incelen parkların % 45-% 60,9'u (Avcioglu ve Burgu, 2008 ve Oge ve Oge, 2000), Kırıkkale'de % 62,5'i (Aydenizöz Özkayhan, 2006), Kayseri'de ve Erzurum'da % 50'si (Avcioglu ve Balkaya, 2011 ve Bozkurt ve ark., 2012) enfekte bulunmuştur.

Tüy muayenesi

Köpeklerin tüyleri üzerinde yapılan çalışmalarda Hollanda'da 148 ev köpeğinin, 18'inde (% 12,2) (Overgaauw ve ark., 2009), İrlanda'da 100 sokak köpeğinin % 67'sinde (Roddie ve ark., 2008), İrlanda ve İngiltere'de 60 ev, çiftlik ve barınak köpeğinin % 25'inde (Wolfe ve Wright, 2003), ayrıca 182 sahipli köpeğin de % 8,8'inde (Devoy-Keegan ve Holland, 2010), Mısır'da 64 sokak köpeğinin % 26,6'sında, 56 ev köpeğinin % 10,7'sinde (El-Tras ve ark., 2011), Brezilya'da 64 sokak köpeğinin 21'inde, 40 ev köpeğinin de 4'ünde (Amaral ve ark., 2010) *Toxocara* sp. yumurtaları saptanmıştır. Ayrıca İrlanda'da kırsal bölgede yaşayan 87 kırmızı tilkiden 24'ünün (*Vulpes vulpes*) tüylerinde *Toxocara* sp. yumurtasına rastlanılmıştır (Roddie ve ark., 2008).

Türkiye'de İç Anadolu bölgesinde bu konu ile ilgili araştırmalar yapılmış olup, Kırıkkale'de % 21,57 (Aydenizöz-Özkayhan ve ark., 2008), Ankara'daki sokak köpeklerinde % 49 (Öge ve ark., 2013), ev köpeklerinde ise % 14 (Öge ve ark., 2014) oranında *Toxocara* sp. yumurtaları saptanmıştır.

Yıkanmamış çiğ sebze-meyve muayenesi

Çiğ sebze-meyveler üzerinde yapılan araştırmalarda Mısır'da % 19 (El Said Said, 2012) ve Nijerya'da % 48,3 (Maikai ve ark., 2012) oranında *Toxocara* sp. yumurtası saptanmıştır.

Türkiye'de yapılan çalışmalarda, Bursa'dan alınan örneklerin % 1'inde (Avcioglu ve ark., 2011), Burdur'da % 2,7 oranında (Adanir ve Tasci, 2013) ve kış aylarında Antalya, Adana, Mersin ve Hatay illerinden, yaz aylarında da Ankara'dan elde edilen 203 yıkanmamış sebze örneğinde % 1,48 oranında (Kozan ve ark., 2005) *Toxocara* sp. yumurtalarına rastlanmıştır.

1.2.3. İnsanlardaki Toxocarosisin Klinik Bulgular ve Patogenez

İnsan toxocarosisinde konaktaki hasar derecesi ve belirtilerin konkomitant olarak ortaya çıkmasıyla oluşan semptomlar larvalar hangi dokuya yerleşmiş ise o dokuya bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Despommier, 2003 ve Macpherson, 2013). Toxocarosisin şiddeti, L3'lerin sayısına, hastanın yaşına, vücutta yerleştiği organa bağlı şekillenmektedir. En hassas bölgeler karaciğer, akciğer, MSS ve gözlerdir. Karaciğer L3'lerin en yaygın görüldüğü organ olmakla beraber, larvaların hiçbir organa istisnası yoktur. (Despommier, 2003 ve Roberts ve Janovy, 2006).

Dalgalı (intermittent) ateş, % 70'lere ulaşabilen eozinofili, hepatomegali, hepatosplenomegali, abdominal ağrı, kusma, diyare gibi intestinal fonksiyon düzensizliği, öksürük, hırıltılı solunum, astım, tekrarlayan bronşitis gibi solunum sistemi semptomları, myokarditis, ensefalopati gibi nörolojik semptomlar, nefritis, malasi, anoreksi, iştahsızlık, kilo kaybı, yorgunluk hissi, solgunluk ve ürtiker gibi semptomlar görülebilmektedir (Deplazes ve ark., 2011; Despommier, 2003; Macpherson, 2013; Overgaauw ve van Knapen, 2008; Roberts ve Janovy, 2006 ve Soulsby, 1982).

Daha çok 1-7 yaş arası çocuklarda karakterize persiste eozinofili (periferik kanın % 50'sinden fazlası beyaz hücre), lökositosis, yüksek GT γ ve hipergamaglobulineminin yanı sıra, ayrıca tekrarlayan abdominal sancılarda da VLM'nin düşünülmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Overgaauw ve van Knapen, 2008 ve Smith ve ark., 2009).

Visceral Larva Migrans olgularında kutanöz reaksiyonlar da saptanmaktadır. Yetişkin ve çocuklardaki toxocarosis kronik idiyopatik ürtiker, kronik pruritis, çeşitli egzama durumlarının sıklıkla görüldüğü kaydedilmiştir (Deplazes ve ark., 2011; Overgaauw ve van Knapen, 2008 ve Smith ve ark., 2009). *Toxocara* sp.'nin deri bozukluklarından en az ikisinin (prurigo ve ürtiker) oluşmasında faktör olduğu, ayrıca eozinofilik artritise neden olduğu kaydedilmiştir (Despommier, 2003). Ciddi pnömoni, eozinofilik meningoensefalit, aortada tromboz tablosu VLM'nin ağır olgularında görülebilmektedir. Beyinde çok sayıda L3'ler bulunduğunda ölümlerin oluşabileceği düşünülmektedir (Overgaauw ve van Knapen, 2008 ve Roberts ve Janovy, 2006).

Larva 3'ler gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonunu uyarmaktadır. Paratenik konaklardaki reaksiyonun (oluşan sendromun) düzeyi ve süresi, enfeksiyonun dozuna bağlı olarak değişim göstermektedir. Deneysel enfeksiyonlarda konak modelinde göç sonunda L3'lerin çoğu beyinde görülmektedir. Çok anlaşılamamakla birlikte bu durum, L3'lerin beyine karşı tercihi olduğunu göstermekte ya da diğer bölgelerde yıkımlanmasına rağmen bu organda yıkımlanmadığını düşündürmektedir. (Roberts ve Janovy, 2006).

Patolojik bulgular, larvaların ölüp ölmemesine bağlı değişmektedir. Larvaların ölümlerinde gecikmiş ve hızlı tip hipersensitivite cevabı oluşur. Yangısal olarak eozinofilik granülomlar da oluşmaktadır. Hızlı tip hipersensitivite cevabında ölmekte olan ve ölen larvalar karaciğer, akciğer, beyin gibi organlarda görülerek karakteristik VLM semptomlarını oluştururlar (Despommier, 2003).

1.2.4. Ocular Larva Migrans (Ocular Toxocariosis)

Ocular Larva Migrans ilk kez Wilder tarafından VLM'den önce tanımlanmış, retinoblastomalı çocukta larva bulunmuştur. Son dönemlerde Ocular Larva Migrans (OLM), Ocular Toxocariosis (OT) olarak adlandırılmaktadır. Ocular Toxocariosis, VLM ile karşılaştırıldığında daha ender olarak görülmekte ve sendrom az sayıda yanlışlıkla alınan *T. canis* larvasının göze göç etmesiyle oluşmaktadır. İnkubasyon periyodu aylardan yıllara kadar devam edebilmektedir (Fan ve ark., 2015; Fillaux ve Magnaval, 2013 ve McCarthy ve Moore, 2011). Sendrom yeni yürümeye başlayan, küçük ve ergenlikteki çocuklarda görülmektedir. Hastalığın en yüksek insidansı 5-10 yaş arası çocuklarda görülmektedir. Sendrom genelde sublinik seyretmektedir. Görmede tahribat (görme kaybı), unilateral ve intermitten strabismus, ağrı ve kızarıklık yaygın olan semptomlardandır. Larvanın, göz membranında göç etmesiyle yangısal reaksiyon oluşarak bölgede retinal granuloma gelişir. Bu tablonun ileri aşamasında posterior pole'da retinoblastomaya neden olur. Ayrıca uveitis de toxocariosis enfeksiyonunu düşündüren bir klinik bulgudur. Eğer OT tablosu persiste ise bilateral bozukluklar da şekillenir. Ocular toxocariosis genelde sadece göz muayenesinde teşhis edilmektedir. Ocular toxocariosisi şekillendiren tek bir larva olduğu için kan eozinofili değeri normal seviyelerde görülmektedir. Ocular Toxocariosiste eozinofili tablosu humor vitreous ya da aqueousta görülür. Ancak gözü de içeren generalize larva migrans sendromda eozinofili tablosu görülebilmektedir. Genel olarak OT'si olan hastalarda beyaz kan hücresi sayısı ve IgE seviyesi normaldir. Patolojik bulgular, anterior uveitis ya da sıklıkla hyalitis ile birlikte seyreden uveitis ve korioretinitistir. Humor vitreusta immun kompleksin çökmesi ile bu sıvı matlaşmaktadır (Fan ve ark., 2015; Fillaux ve Magnaval, 2013; McCarthy ve Moore, 2011 ve Nash, 2015).

Teşhis; yalnızca klinik belirtiler baz alınarak yapılmakta, serolojik testlere güvenilmemektedir. Humor vitreous ya da aqueousta eozinofili görülmesine karşın, sıvının az olması örnek alınmasını güçleştirdiği için bu testler teşhis için kullanılmamaktadır (Fillaux ve Magnaval, 2013). Oftalmolojistler, OT teşhisinde

klirik bulgulara ek olarak *Toxocara* sp. Goldman-Witmer (GW) katsayısının hesaplanmasını tavsiye etmektedir.

$$GW = \frac{(\text{Humor aqueoustaki spesifik IgG seviyesi} / \text{Serumdaki spesifik serum IgG seviyesi})}{(\text{Humor aqueoustaki total IgG seviyesi} / \text{Serumdaki total IgG seviyesi})}$$

Bu katsayı hastadaki idiopatik fokal korioretinitis ve vitritis teşhisine yardım etmek amaçlı kullanılmaktadır. Hasta bireylerde cut off değeri ≥ 3 'dür (Fan ve ark., 2015).

İmmunodiagnoziste TES-ELISA'nın spesifitesi ve sensitivitesi VLM teşhisi için uygunken, OT'nin teşhisinde bu testlerin sensitivitesi çok düşüktür. *Toxocara* sp. antikorunun titresi genellikle VLM olgularından daha düşük düzeydedir (Fan ve ark., 2015 ve McCarthy ve Moore, 2011). Merkeze yerleşen kitleler MRI ile teşhis edilebilmektedir. Lezyonlarda kalsifikasyon nadiren görülmektedir (Fan ve ark., 2015).

Epidemiyolojik olarak da okular rahatsızlıklarda sistemik hastalığa eğilim olmaması durumun OLM ve VLM'yi şekillendirdiğini, spesifik tropizmi olan iki farklı *Toxocara canis* suşu olduğunu düşündürmektedir. VLM daha önce yangısal cevabı olan ve tekrarlayan iç organlardaki göçte görülebilirken, OLM bireysel olarak daha önceden duyarlaştırılan bireylerde görülmemektedir (Despommier, 2003).

1.2.5. Nörolojik Toxocarosis

Toxocara larvalarının MSS invazyonu sonucu beyin ve omurilikte bulunması durumudur. Konağın genetik faktörleri, alınan enfektif dönem yumurtaların miktarı ve daha önce etkene maruz kalma gibi durumlar Nörolojik Toxocarosisin kompleks patogeneziini açıklamaktadır. Merkezi Sinir Sistemindeki toxocarosis insanlarda ilk defa Beautyman ve Wolf tarafından polmyelitisi olan bir çocuğun nekropsisinde beynin sol thalamusta larva görülmesi ile bildirilmiştir (Fan ve ark., 2015).

Sendromda; nörolojik hasar, epilepsi, nöropsikolojik bozukluk, eozinofilik meningo ensefalitis, myelitis, transverse myelitis ve serebral vaskulitis görülmektedir. Çoğu vakada MSS’de var olan toxocarosisin antikor titresi kanda negatif bulunurken, serebrospinal sıvıda pozitif bulunmaktadır. Larvalar merkezi sinir sistemine girmiş ise eozinofili ve cerebrospinal sıvıda pleositozis görülmektedir. Bu tip sendrom ender olarak görülür. Şimdiye kadar Nörolojik Toxocarosis olarak rapor edilen sadece 40 vaka bulunmaktadır (Fan ve ark., 2015 ve Fillaux ve Magnaval, 2013).

1.2.6. Covert Toxocarosis

“Covert toxocarosis” ilk olarak İrlanda’da tanımlanmış, daha sonra “Common Toxocarosis” olarak da adlandırılmıştır. Covert ya da Common toxocarosis, seropozitif çocuk ve erişkinlerdeki asemptomatik ya da ılımlı non-spesifik semptomlar durumuna denmektedir. Sendrom az miktarda enfektif dönem larvalı yumurtaların alınmasıyla şekillenmektedir. İnkubasyon süresi haftalardan yıllara kadar devam eder. Klinik olarak; abdominal ağrı, gastrointestinal semptomlar, halsizlik, pruritis görülmektedir. Eozinofili tablosu daha düşük değerlerdedir. Eozinofili ve ilgili yüksek IgE’nin şekillenebildiği vakalar da görülmektedir. Eozinofili oranı yaklaşık 1500 hücre/mm³ olup, özellikle kronik deri alerji semptomları gösteren hastalarda, bu bulgu gözden kaçabilmektedir (Fan ve ark., 2015 ve Fillaux ve Magnaval, 2013). ELISA ile *Toxocara* antikoru titresi düşükten ılımlı miktara kadar çıkmaktadır (McCarthy ve Moore, 2011).

1.2.7. VLM Teşhisi

Visceral Larva Migrans’ta hastalar parazitin herhangi bir gelişme dönemini (yumurta, larva vb.) vücuttan dışarı atmadığı için, teşhis kolay olmamaktadır (Lee ve ark., 2010). Ayrıca vakaların çoğunda belirtilerin oldukça hafif ve geçici olması,

teşhiste VLM'nin gözden kaçmasına ya da sendromun yanlış teşhisine neden olmaktadır (Roberts ve Janovy, 2006).

Visceral Larva Migrans'ın teşhisi, hastaneye giden kişinin anamnezinden yola çıkılarak şekillenmektedir. Hastanın köpeklerle yakın ilişkisinin olması, çiğ et yeme alışkanlığı, pika veya jeofajisinin bulunması, astım-mental problemlerinin olması ya da bahçıvan gibi toprakla ilişkili meslek grubunda yer alması VLM'nin olabileceğini düşündürmekte ve teşhis için aşağıdaki testler uygulanmaktadır.

1.2.7.1. Non Spesifik Testler

Kan sayımı; kanda eozinofili varlığına bakılır. Bu durum bazen ağır (10000 hücre/mm³) seyredir. Lökositosis 10000/mm³'den fazla, eozinofili % 10'dan yüksektir (Fillaux ve Magnaval, 2013 ve Soulsby, 1982).

Total serum IgE seviyesi; yaygın olarak hastaların % 79'unda total serum IgE seviyesi yükselir. Bu ortalama değer yaklaşık olarak 850 kIU/L'dir (Fillaux ve Magnaval, 2013).

Eosinophil cationic protein (ECP) seviyesi; ECP ve diğer granüler katyonik proteinler eozinofili hücreleri aktive olduğunda açığa çıkarlar. Aktif toxocarosis'e eosinophil cationic protein düzeyinin araştırıldığı bir çalışmada, bu yöntemin teşhiste kullanılabileceği kaydedilmiştir. Eosinophil cationic protein seviyesinin belirlenmesi ile enfeksiyonun yeni mi şekillendiği yoksa geçmişte var olan sendromla ilgili mi olduğu bakılmaktadır (Fillaux ve Magnaval, 2013).

Enfeksiyonun diğer indikatörleri; hipergamaglobulinemi, yükselmiş isohemagglutinin titresidir. Laboratuvar çalışmalarında hastalarda, Immunoglobulin M (IgM), IgG ve IgE'de hipergamaglobulinemi görülür. Daha çok artan tablo ise IgE/anti-IgE immun kompleksi düzeyleridir. IgG ve IgM seviyesi hastanın yaşına ve

cinsiyetine göre daha yüksek miktarda görülür. Anti-A isohemaglutinin titresi 1:400 ya da daha yüksek, anti-B titresi 1:200 ya da daha yüksek olur. Böylece klinik olarak sendromun tanımlanması için pika, eozinofili ve pozitif seroloji sonuçları teşhis için güçlü bir durum yaratır (Despommier, 2003 ve Soulsby, 1982).

Diğer vücut sıvılarında sitolojik testler; *Toxocara* sp. larvalarının merkezi sinir sistemindeki varlığı, eozinofili ve serebrospinal sıvıda pleositoz ile teşhis edilir (Fillaux ve Magnaval, 2013).

1.2.7.2. Direkt Teşhis

Toxocara sp. larvalarının biyopside ya da organ parçasında görülmesi, serebrospinal sıvıda ya da okular sıvıda bulunması ile kesin teşhis yapılmaktadır. Yaşayan larvaların motilitesi sıvılarda çok yüksektir (Fillaux ve Magnaval, 2013).

Biyopsiyi takiben yapılan histopatolojik bakılarda özel boyama yöntemleri kullanılmaktadır (Strube ve ark., 2013). Biyopsi ya da organ parçasının mikroskopik bakısında larvalar iç yapısından ya da kütikulasından teşhis edilir. Eğer tahrip olmadıysa karakteristik larvalar rahatlıkla görülür (Fillaux ve Magnaval, 2013).

Karaciğer biyopsisinde larvanın etrafını sarmış granülom yapısı da teşhis için karakteristik bir bulgudur. Fakat alınan biyopsi örneğinde o bölgede larvanın varlığı şansa bağlıdır (Despommier, 2003 ve Roberts ve Janovy, 2006). Larvalar dokularda geniş yayılım gösterdiği için hastada sendromun olmasına rağmen larvanın her zaman alınan biyopsi materyali içerisinde bulunamaması bu teşhis yönteminin dezavantajını oluşturmaktadır. Dolayısıyla *Toxocara* enfeksiyonuna bağlı direk teşhis tatmin edici bulunmamaktadır (Smith ve ark., 2009).

1.2.7.3. Görüntüleme Yöntemleri

Görüntüleme yöntemleri de VLM teşhisinde yardımcı olmaktadır. *Toxocara* sp. larvalarının oluşturduğu lezyonlar için görüntüleme yöntemlerinden; Ultrasonography (USG), Computed Tomography (CT) ve Magnetic Resonance Imaging (MRI) kullanılmaktadır. Sonografide, karaciğer paranziminde çoklu, küçük, oval hipoekoik lezyonlar görülür. Computed Tomography ya da MRI'da hepatik lezyonlar multiple olarak görülür. Hastalık bölgesinde oval lezyonlar genelde 1-1,5 cm ölçülür. MRI; nörolojik sendromu olan hastalarda kortikal ya da subkortikal granülomları tespit etmek için kullanılır (Deplazes ve ark., 2011; Macpherson, 2013; Overgaauw ve van Knapen, 2008 ve Strube ve ark., 2013).

Örnek olarak, Kore Cumhuriyeti'nde retrospektif olarak medikal kaydı ve MRI görüntülemesi bulunan 8 hastada yapılan çalışmada spinal VLM teşhis edilmiş ve bu hastalarda *T. canis* yönünden seropozitif bulunmuştur (Lee ve ark., 2010). İtalya'da 47 yaşındaki bir kadında, USG ve CT sonucu karaciğerde hipoekoik alanlar görülmüş, yapılan biyopside histopatolojik olarak eozinofilik granulom ve Charcot-Leyden kristallerine rastlanmıştır. Ayrıca serolojik olarak da VLM saptanmıştır (Leone ve ark., 2006). Hindistan'da VLM semptomlarına rastlanan ve anamnezinde çiğ et yeme alışkanlığı olan 45 yaşındaki erkek bir hastada USG ve CT sonucu karaciğerde hiperekoik alanlar görülmüş, lezyonlar aspire edilip alınan örnekte eozinofili ve Charcot-Leyden kristallerine rastlanılmıştır. Hastada serolojik olarak da *T. canis* yönünden seropozitiflik saptanmıştır (Chandrashekhara ve ark., 2010).

1.2.7.4. Serolojik Teşhis

Visceral Larva Migrans'ın teşhisi için kullanılan yöntemlerden biri de immunolojik testlerdir. Bunların başlıcaları; Presipitin test, IHAT, ELISA ve Western Blot (WB)'dir.

Immunoelectrophoresis (IEP) teşhiste ilk kullanılan immunodiagnostik yöntemdir. Spesifitesi yüksek ancak, sensitivitesi düşüktür. Presipitasyon testlerinin pozitif olabilmesi için yüksek oranda spesifik antikora ihtiyaç duyulmaktadır (Fillaux ve Magnaval, 2013).

Toxocarosiste standardize kullanılan bir antijenin olması paraziter hastalıkların çok azında olan bir durumdur. Bu standardizasyon hastalığın global olarak görüldüğünü ortaya koymaktadır (Smith ve ark., 2009).

Serodiagnostik testlerden ELISA en çok kullanılan yöntemdir. Enfekte yetişkinlerde Anti-*Toxocara* antikoru ELISA yöntemi ile persiste enfeksiyonun 2,8. yılına kadar saptanabilmektedir. Ancak, antikor varlığı hastada şu an aktif olan (devam eden) bir enfeksiyondan mı, yoksa geçmişte olan bir enfeksiyondan mı, kaynaklandığını ayırt edememektedir. Bu yüzden eozinofili sayımı, total serum IgE gibi diğer laboratuvar testleri ile desteklenmelidir (Deplazes ve ark., 2011; Lee ve ark., 2010 ve Overgaauw ve van Knapen, 2008). Spesifik IgG bağlanma yeteneği gibi daha ileri diagnostik testlerin ileride bu problemin çözülmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir (Lee ve ark., 2010).

Excretory/Secretory (ES) antijenleri kullanılarak yapılan ELISA uygulamaları klinik teşhisi kolaylaştırmakta, VLM'nin epidemiyolojik çalışmalarını desteklemektedir (Roberts ve Janovy, 2006 ve Smith ve ark., 2009).

Gelişmiş immunodiagnostik testlerde (ELISA gibi) kullanılan ES antijenleri, kültüre edilen enfektif dönem larvalardan toplanarak üretilmektedir (Roberts ve Janovy, 2006 ve Smith ve ark., 2009).

Toxocara Excretory/Secretory (TES) antijenlerine karşı ELISA ile IgG antikoru araştırılması referans bir yöntem olmuştur. Toxocarosisin serolojik teşhisinde en iyi yöntem TES ELISA ve sonrasında pozitif bulunan örneklerde WB yapılmasıdır (Fillaux ve Magnaval, 2013). Enzymed Linked Immunosorbent Assay

1:32'den daha iyi titrelerde oldukça yüksek sensitiviteye (yaklaşık % 78) sahiptir (Despommier, 2003).

Ancak, endemik olarak poliparazitizm görülen bölgelerde antijenlerin çapraz reaksiyonlar oluşturmasıyla problem devam etmekte, sonuç olarak başka parazitlerle enfeksiyonda da TES ELISA sonuçları pozitif elde edilebilmektedir (Smith ve ark., 2009 ve Strube ve ark., 2013). Çapraz reaksiyonlarda yüksek molekül ağırlığı bileşenleri (TES'de >32 kDa) dikkati çekmektedir. Bu değerler *Ascaris lumbricoides*, filariasis ya da strongyloidiasis gibi diğer nematod enfeksiyonlarında da görülür. *Toxocara* Excretory/Secretory WB ile doğrulanması çapraz reaksiyonların üstesinden gelebilmektedir. Yöntemde saptanan düşük molekül ağırlıkları (24, 28, 30 ve 35 kDa) yüksek moleküler ağırlıklarından (132, 147, 200 kDa) daha spesifik ve iyi teşhis sağlamaktadır. IgM antikorları uzun süre varlığını göstermektedir. İndirekt TES ELISA testi ile IgG araştırılması ve takiben yapılacak TES WB doğrulanması en etkili yaklaşımdır. Ancak sensitivite ve spesifite, hedef antijenin kalitesi, kullanım şekli vs. ile değişmektedir. Ilıman iklim ülkelerinde TES WB ve TES ELISA klinik bulgularla desteklenir, ancak insanlarda yaygın olarak görülen diğer helmint enfeksiyonları, bu yöntemlerden elde edilen sonuçların güvenilirliğini azaltmaktadır. *Toxocara* antikor titresini hastalık sona erdiğinde bile pozitif kalabilmekte ve eozinofili iki yıl ya da daha fazla sürede normal seviyeye inmektedir (Smith ve ark., 2009).

Ayrıca, TES antijenleri insanda A ve B kan grubuna benzer madde içermektedir. Bu durum anti-A veya anti-B izohemoglobulinine insan serumunda müdahale etmektedir. Bu zorlukları aşmak için IgE ELISA ile ayırıcı teşhis yapılabilmektedir (Strube ve ark., 2013). Ayrıca larvaların antijenlerine karşı kan grubu A olan insanlarda çapraz reaksiyon vermektedir (Despommier, 2003).

1.2.7.5. Moleküler Teşhis

Veteriner hekimlikte, DNA temelli yöntemlerin kullanılması parazitlerin; spesifik teşhisinde (larva, yumurta, erişkin vs.), epidemiyolojik araştırmalarında, prevalansının saptanmasında, konak genomundaki varyasyonlar nedeniyle parazitlerde oluşan dirençlerin ve ilaç dirençlerinin saptanmasında kullanılmaktadır. DNA tabanlı testlerde spesifik genetik markerların kullanılması, parazitin türleri arasındaki teşhisine ya da parazitlerin genusunun belirlenmesine izin vermektedir. Araştırmacının daha güvenilir teşhis yapmasını dolayısıyla, parazitlerin tedavilerinde ve kontrollerinde daha emin sonuçlar alınmasını sağlamaktadır (Hunt ve Lello, 2012 ve Smith ve ark., 2009).

Toxocara cinsinin larva ve diğer gelişim aşamalarındaki spesifik teşhislerinin sınırlı olması, çalışmaları geleneksel parazitolojik yaklaşımlardan moleküler çalışmalara kaydırmaktadır. Günümüzde insanlardaki toxocarosisin rutin teşhisinde serolojik testler (TES ELISA ve TES WB) kullanılmaktadır. Bu testler, enfeksiyonun olduğunu, ancak oluşan sendroma hangi parazitlerin (*T. canis*, *T. cati* vs.) neden olduğunu tür bazında ayırt edememekte, ayrıca multiparazitizmi olan hastalarda çapraz reaksiyonlar göstermektedir. Bu sebeple insan dokusundaki larvaların teşhisi ve etken türlerinin belirlenmesi için moleküler tekniklerin kullanılması gerekmektedir (Gasser ve ark., 2006 ve Li ve ark., 2007).

Nematodlar, hayvanlar aleminde ikinci sırada yer alsalar da sadece 40'ın üzerinde nematod türünün (hayvan ve insan sağlığını etkileyen türlerle çalışılmış) günümüzde tamamlanmış mitokondrial DNA (mtDNA) sekansı bulunmaktadır (Li ve ark., 2008). Bu phylumundaki genomik DNA sekanslarından, *T. canis* genomu ile *A. lumbricoides* genomunun neredeyse aynı boyutta (3×10^9 bp) olduğu kaydedilmiştir. *Toxocara canis*'in 18, *Ascaris*'lerin ise 24 kromozomu bulunmaktadır (Despommier, 2003). *Toxocara canis*'in mtDNA genomu 14322 bp boyutundadır (GenBank™ accession number: AM411108). On iki protein (cox1-3, nad1-6, nad 4L, ATP 6 ve cytb), 2 rRNAs, 22 transfer RNA geni bulunur. *Toxocara canis*'te tüm genomun %

68,57'sini A+T içerir (Li ve ark., 2008). Askarit türlerindeki moleküler genetik karakterizasyon, özellikle *Toxocara* genusunda uygulanmaktadır (Gasser ve ark., 2006).

Moleküler teşhiste kullanılan mtDNA ve ribozomal DNA (rDNA) markerları askarit türlerinin teşhisinde iyi bir hedef oluşturmakta, spesifik identifikasyonlarda hedef DNA'nın türler arasındaki farklılığını yeterli şekilde ortaya koymaktadır. Bu türler arasında kullanılan hedef DNA'da, varyasyonlar olmamasına dikkat edilmelidir (Gasser ve ark., 2006 ve Smith ve ark., 2009).

Askaritlerin teşhisinde günümüzde kullanılan birkaç PCR yöntemi vardır. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) yöntemi ile *T. canis* ve *T. cati*'nin farklılıkları, çoğaltılan bölgeye uygun enzimler yardımıyla araştırılmaktadır. Örnek olarak, Internal transcribed spacers 2'nin (ITS-2) çoğaltılan bölgesine uyumlu Hinf I ya da Rsa I enzimi kullanılan çalışmada pozitif sonuçlar alınmıştır. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) yöntemi de *Toxocara* cinsinin genetik karakterizasyonda kullanılmakta, ancak RAPD'da artefaktların ve/veya non spesifik amplifikasyonların oluşması gibi bazı kısıtlamalar bulunmaktadır. Teşhiste Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) yöntemi de kullanılmaktadır. Internal transcribed spacers 2 bölgesine uyumlu primerler yardımıyla *T. canis*, *T. cati*, *T. vitulorum*, *T. leonina*, *B. procyonis*, *A. suum* ve *P. equorum* türlerinin SSCP ile teşhis edildiği bildirilmektedir (Gasser ve ark., 2006). Ayrıca realtime PCR yöntemi ile de askaritlerin tür teşhisi yapılmaktadır (Pinelli ve ark., 2013).

Ribozomal DNA'nın Internal transcribed spacers 1 (ITS-1) ve ITS-2 bölgeleri *Toxocara* türlerinde genetik marker olarak kullanılmaktadır. Taksonomi ve populasyon genetiği araştırmalarında ITS-2 ampliconları kullanılmaktadır (Gasser ve ark., 2006). İlk defa Jacobs ve ark. (1997), morfolojik olarak ayırdığı *T. canis*, *T. cati* ve *T. leonina*'ların erişkinlerinin ITS-2 bölgesi sekans farklılıklarını tespit etmiş, bu farklılıklar % 26-50 oranlarında ve türler arasındaki varyasyon ise % 0-% 0,6 olarak

saptanmıştır. Bu durum ITS-2'nin tür spesifik genetik marker olduğunu göstermektedir (Gasser ve ark., 2006).

Mitokondrial gen bölgesinden; ATP sentetaz alt ünite 6 (ATPase 6) ve small subunit ribozomal RNA (12S rDNA) ve nüklear ribozomal gen bölgesinden; internal transcribed spacers 2 (ITS-2) ve large ribosomal subunit (28S; 5,8S) bölgeleri de askaritlerin teşhisinde amplifiye edilmektedir (Li ve ark., 2007 ve Wickramasinghe ve ark., 2009). Çalışmada ATP sentetaz alt ünite 6'nın bu cinsteki türleri ayırt edebileceği, iyi korunmuş bir bölge olduğu ve moleküler filogenetik çalışmalar için de kullanışlı olduğu bildirilmiştir (Wickramasinghe ve ark., 2009).

Internal transcribed spacers 2 gen bölgesi çoğaltılarak karaciğer dokusundaki *T. canis* larvalarının varlığı tespit edilmeye çalışılmış ve sonuçlar pozitif bulunmuştur (Borecka ve ark., 2008). Bu araştırmalar *T. canis*, *T. cati* ve diğer askaritlerin ITS-1 ve ITS-2 rDNA sekansları sonucu, bu parazitlere ait DNA'ların insan biyopsilerinde teşhis edilebileceğini belirtmektedir (Macpherson, 2013).

Çalışmalarda oluşturulan PCR'ların sensitivitesini saptamak amacıyla, yöntemle teşhis edilebilen en küçük DNA titresi ölçülmektedir. *Toxocara canis* ile yapılan çalışmalarda birden az sayıda larvada teşhis yapıldığı kaydedilmiştir. Bu durum moleküler tekniklerin bir diğer avantajını oluşturmaktadır (Jacobs ve ark., 1997 ve Li ve ark., 2007).

Toxocara enfeksiyonuyla ilgili epidemiyolojik çalışmalar (çevresel kontaminasyonun teşhisi amacıyla yumurtaların tespiti vs.) için PCR kullanışlı bir yöntemdir (Smith ve ark., 2009). Toprak örneklerindeki askarit yumurtalarının *T. canis* ve *T. cati* olarak ayırt edilmesi, insanlarda oluşabilecek sendromların yaygınlığını ve kimden kaynaklandığını ölçmektedir. Parazitlerin yumurta düzeyinde (*T. canis* ve *T. cati*) moleküler olarak ayrılabilmesi Borecka (2004) ve Fogt-Wyrwas ve ark. (2007)'nin yaptıkları çalışmalarda bildirilmiştir. Ayrıca, bir çalışmada köpek dışkılarında morfolojik olarak tanısı konan *Toxocara* sp. örneklerinin ITS-2

bölgesine uyumlu primerler ile yapılan PCR'larında % 68,5'inin *T. canis* ve % 31,5'inin *T. cati* olduğu saptanmıştır (Fahrion ve ark., 2011).

İnsanlarda toxocarosisi oluşturan sendromlardan sadece VLM değil, OLM'nin de teşhisi amacıyla moleküler çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Örnek olarak bir çalışmada, *T. cati* yumurtaları ile deneysel olarak enfekte edilmiş Mongolian gerbil ve Wistar ratlarda teşhis amacıyla; orbital dokularından histolojik kesit alınmış, orbital dokuların formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş bloklarından ve jelöz yapıdaki vitreus sıvısından DNA ekstraksiyonu hazırlanmıştır. Ayrıca hayvanların vitreus sıvısında ve serumlarında *T. cati* yönünden seropozitiflik bakılmıştır. Gerbillerin orbital dokusunda enfeksiyon sonrası 5. günden itibaren PCR'da pozitif sonuçlar alınmış, ancak ratlarda PCR'da hiç pozitifliğe rastlanmamıştır (Zibaei ve ark., 2013).

Bu bilgiler ışığında, Dünya ve Türkiye'de geniş yayılım gösteren zoonoz karakterdeki toxocarosis sendromları; hastaların anamnez ve laboratuvar bulguları ile biyopsi, görüntüleme yöntemleri ve serolojik testlerle desteklenerek teşhis edilmektedir. Ancak kullanılan bu yöntemlerde kesin teşhisin sınırlı olması yeni yöntemlerin kullanılmasına olanak vermiş, bu konuda yapılan moleküler araştırmaların umut verici olması tez çalışmamızı bu konuda tasarlamamızı sağlamıştır.

Çalışmamızda BALB/c farelerde deneysel olarak *T. canis* ile VLM sendrom oluşturularak larvaların dokulardaki göçü esnasında (biyolojisine uygun olarak saptanan günlerde) sadece larvalara en çok rastlanan karaciğer dokusunda değil; bacak kasları, akciğer ve beyin dokusunda da moleküler teşhise gidilmesi planlanmış; moleküler teşhisin sensitivitesi, spesifitesi ve doğruluk oranları; yöntem ile teşhis edilebilen en az miktar; konvansiyonel yöntemle de (pepsin-HCl doku digestyonu) larvaların varlığı ve bulunduğu organlardaki sayıları hakkında bilgi verilmesi amaçlanmış; ayrıca "Farklı dokulardaki deney ve kontrol grupları değişkeni ile PCR sonucu değişkeni ilişkilidir.", "Deney gruplarında farklı nekropsi

günlerine göre dokular arasında larva görülme düzeyleri aynıdır.” ve “Deney gruplarında farklı dokular arasında farklı nekropsi günlerinde larva görülme düzeyleri aynıdır.” hipotezlerinin istatistiksel olarak araştırılmasının çalışmayı daha değerli kılacağı düşünülmüştür.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.2. Gereç

2.1.1. Örneklenen Hayvanlar

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (GÜDAM) temin edilen 6-8 haftalık 36 adet dişi BALB/c fare kullanıldı. Araştırma, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 26.09.2011 gün ve B.30.2.GÜN.0.05.06.00/179-17444 sayılı kararı (kod no: G.Ü.ET-10.038) kapsamında gerçekleştirildi (Ek-1 ve Ek-2).

2.1.2. *Toxocara canis*, *Toxocara cati* ve *Toxascaris leonina* Örneklerinin Elde Edilmesi

Askarit örnekleri, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi klinikleri ve özel veteriner kliniklerine muayene için getirilen kedi ve köpeklerden elde edildi. Pyrantel pamoate (Kontil® süspansiyon, 5 mg/kg C.A.) tedavisi sonrası atılıp, laboratuvarımıza teşhis için ulaştırılan askaritlerden dişi olanlar ayrılıp, morfolojik olarak tür teşhisleri yapıldı. Saptanan *T. canis*'ler farelerin deneysel enfeksiyonunda ve moleküler teşhis yönteminde pozitif kontrol olarak, *T. cati* ve *T. leonina*'lar ise oluşturulan moleküler teşhis yönteminin duyarlılığını ölçmek amacıyla kullanıldı.

2.1.3. Kedi, Köpek ve İnsan Örneklerinin Elde Edilmesi

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü laboratuvarlarından temin edilen kedi, köpek ve insana ait genomik DNA'lar, tasarlanan primerler yardımıyla hazırlanan PCR reaksiyonunda oluşabilecek çapraz reaktivitelerin saptanması amacıyla kullanıldı.

2.1.4. Çalışmada Kullanılan Kitler

2.1.4.1. DNA Ekstraksiyon Kiti

Farelerin farklı dokularında bulunan *T. canis* larvalarına ait DNA'nın izolasyonu amacıyla ticari olarak temin edilen DNA ekstraksiyon kiti (GeneJet™ Genomic DNA Purification Kit, #K0722, Thermo Scientific, Litvanya) kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. *Toxocara canis* Yumurtalarının Toplanması ve Enfektif Döneme Getirilmesi

Dişi *T. canis*'ler bistüri yardımıyla distile suyun içerisinde parçalanarak uterusları çıkarıldı. Yumurtalı distile su süspansiyonu 20 °C'de 2000 devir/dk'da 3 dakika santrifüj (Mikro 22R, Hettich Zentrifugen, Almanya) edildi. Santrifüj sonrası yumurtaların tamamının dibe çökmesi için tüpler 10 dk da dışarıda bekletildi.

Süre sonunda üstteki distile su alınabildiği kadar ortamdan uzaklaştırıldı. Tüpe sodyum hipoklorit solüsyonu (% 1) eklenerek manyetik karıştırıcıda 10 dk karıştırıldıktan sonra süspansiyon çay süzgecinden süzüldü. Süspansiyon 6 adet 15 ml'lik (V uçlu) falcon tüplere alınarak 20 °C'de, 2000 devir/dk'da 3 dk santrifüj edildi. Birinci santrifüj sonrası 4 tüpe, ikinci santrifüj sonrası iki tüpe düşürüldü. Her defasında tüplerdeki % 1'lik sodyum hipoklorit atılarak yerine % 0,5'lik formalin solüsyonu ilave edildi. İki tüple yapılan santrifüjden sonra tüplerdeki % 0,5'lik formalinli yumurtalar petri kutularına aktararak, 23 gün 26-27 °C'de inkubasyona (EN500, Nüve, Türkiye) bırakıldı. Her gün sıvı kontrolü yapıldı ve yumurtalar havalandırıldı. Yumurta gelişimi ve larva oluşumu günlük mikroskop kontrolleri ile takip edildi.

2.2.2. Deney Hayvanlarında Visceral Larva Migrans Oluşturulması

Yumurta inkubasyonun 23. gününde süspansiyon, % 0,9'luk izotonik NaCl solüsyonu ile üçer kez 22 °C'de, 2000 devir/dk'da 2 dk santrifüj edilerek yıkanmak suretiyle yumurtalar formalinden arındırıldı. BALB/c farelerin bir seferde en fazla 0,2 ml sıvı alabilmeleri nedeniyle enfeksiyon dozu 0,2 ml'de 1000 adet enfektif dönem larvalı yumurta olacak şekilde ayarlandı (Ek-2).

Pozitif kontrol grubu (enfekte) farelere intragastrik gavaj yardımıyla 0,2 ml'de 1000 adet enfektif dönem larvalı yumurta verilerek enfeksiyon oluşturuldu. Negatif kontrol grubu (enfekte olmayan) farelere de intragastrik gavaj yardımıyla 0,2 ml % 0,9'luk izotonik NaCl solüsyonu verildi.

2.2.3. Nekropsi Zamanları

Enfektif dönem larvalı yumurtaların farelere verildiği gün enfeksiyonun 0. günü kabul edildi. Enfeksiyonun 2., 4., 7. ve 14. günlerinde 6'sı enfekte (pozitif kontrol grubu), 3'ü enfekte olmayan (negatif kontrol grubu) olmak üzere toplam 36 hayvan sakrifiye edildi. Nekropsi günleri larvaların organlara ulaştıkları ve göçün tamamlandığı günler dikkate alınarak saptandı. Nekropsiler, Berkin ve Alçıgır (2007)'ın belirttiği yöntemle göre yapıldı.

Ötanazi işlemi, alfazine-alfamine anestezisi (alfazine: 5 mg/kg I.M., alfamine: 45 mg/kg I.M.) altında her bir farenin kalbinden kan alınarak gerçekleştirildi. Hayvanlar bekletilmeden aynı gün içerisinde nekropsi yapıldı.

2.2.4. Çalışmada Kullanılan Organların İşlenmesi-Larvaların Sayımı

Farelerin nekropsisinde karaciğer, akciğer, beyin, ön bacak ve arka bacak kasları incelendi. Vücuttan ayrılıp tartılan her organın ağırlığı kaydedildi. Daha sonra organlar ikiye bölündü. Bir kısmı pepsin enzimi yardımıyla digesyona tabi tutulurken, diğer kısım DNA ekstraksiyonu için kademeli olarak önce -20 °C’de, sonra -80 °C’de dondurularak kullanılıncaya kadar saklandı.

Digesyon işlemi için tartılıp ayrı ayrı petri kutularına alınan organlar, üzerine bir miktar pepsin-HCl solüsyonu [988 ml % 0,9’luk izotonik NaCl solüsyonu + 5 g Pepsin (Merck, Almanya) + 7 ml HCl (Sigma-Aldrich, ABD) (Öge, 1993)] eklenerek çift bistüri ile olabildiğince küçük parçalara ayrıldı ve 37 °C’de 2-3 gün kadar bekletildi. Süre sonunda petrilereki süspansiyon çay süzgecinden geçirilerek 15 ml’lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüpler 2000 devir/dk’da 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üstteki sıvı olabildiğince alınıp, yerine % 6’lık formalin solüsyonu ilave edildi. Tüpler inceleninceye kadar +4 °C’de buzdolabında muhafaza edildi.

Her tüpe tek tek bakılarak, ışık mikroskobu altında larva varlığı-yokluğu ve/veya sayıları tespit edildi.

Beyin dokusunda sindirim işlemi yapılmadı. Nekropsi günlerinde dokudan ezme preparat yapılarak ışık mikroskobu altında doğrudan incelendi. Bulunan larvaların sayıları kaydedildi.

2.2.5. Moleküler Teşhis ve Karakterizasyon

Araştırma materyalini oluşturan toplam 180 örneğin tümünde, dokudaki larvaların tespiti amacıyla, *T. canis*’in mtDNA ATP sentetaz alt ünite 6 (ATP synthase subunit 6) gen bölgesinin karakterizasyonu moleküler yöntemler ile yapıldı.

2.2.5.1. DNA Ekstraksiyonu

2.2.5.1.1. BALB/c Fare Dokusundan DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu amacıyla organlar önce 1 ml PBS solüsyonu içerisinde 0,06 g organ olacak şekilde ultrasonik homojenizatörde (HD2070, Bandelin, Almanya) ön parçalanmaya tabi tutuldu. Takiben ticari DNA purifikasyon kiti (Thermo Scientific, Litvanya) üretici firmanın önerdiği protokole uygun şekilde kullanıldı. Ekstraksiyon sonrası DNA miktarı nanodrop spektrofotometre (ND2000, Thermo Scientific, ABD) ile ölçüldü (Ek-3).

2.2.5.1.2. *Toxocara canis*, *Toxocara cati* ve *Toxascaris leonina*'nın DNA Ekstraksiyonu

Pozitif kontrol olarak kullanılmak amacıyla morfolojik olarak teşhis edilmiş dişi *T. canis*'ten ve tasarlanan primerlerin kontrolü amaçlı erişkin *T. cati* ve *T. leonina*'lardan, DNA analizi Sambrook ve ark. (1989) tarafından belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. 325 µl örnek homojenatı ve 325 µl solüsyon D (4,2 M guanidin tiyosiyanat, 0,75 M sodyum sitrat dihidrat, 0,33 M N-Lauril sarcosin ve 360 µl 2-merkaptotanol) karışımı 1,5 ml'lik DNase RNase ari mikrosantrifüj tüplerine alınarak 15 sn vortekslendi. Karışımın üzerine 325 µl alkali fenol (pH: 4); 325 µl kloroform/izoamilalkol [Ch/IsoA (24:1)] eklendi. Homojen bir karışım elde edilene kadar 15 sn vortekslendi. Daha sonra karışım 12000 devir/dk'da oda sıcaklığında 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonucu üstteki fazdan 700 µl alınarak yeni bir mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Üzerine eşit hacimde (700 µl) -20 °C'de soğutulmuş saf izopropil alkol ve 1:10 karışım hacminde 3 M sodyum asetat (pH: 5,2) ilave edilerek 30 sn vortekslendi.

Elde edilen karışım, nükleik asit presipitasyonu için -80 °C'de en az 1 saat süre ile bekletildi. Süre sonunda donmuş olan karışımın oda ısısında çözülmesi beklendi.

Çözülen karışım 12000 devir/dk'da 10 dk santrifüj edildi. Üstteki sıvı dikkatlice alınarak ortamdan uzaklaştırıldı. DNA pelleti 300 µl % 70 etanol (EtOH) ile yıkandı. 12000 devir/dk'da yapılan santrifüj işleminden sonra EtOH ortamdan aspire edildi. Aspirasyondan sonra pellet 37 °C'ye ayarlı etüvde kurutuldu. Kurutulan pelletler 20 µl DNase RNase ari su (18 Mohm-cm, Applichem, Almanya) ile sulandırıldı. Elde edilen DNA miktar tayini için nanodrop spektrofotometre ile ölçüldükten sonra PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere -20 °C'de dondurularak saklandı.

2.2.5.1.3. Deteksiyon Sınırının Belirlenmesi Amacıyla *Toxocara canis* Yumurtasının DNA Ekstraksiyonu

PCR'ın çalışabildiği en alt düzeydeki larva/yumurta sayısını saptayabilmek için deteksiyon limitinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla, dişi *T. canis*'ler bistüri yardımıyla distile su içerisinde parçalandı. Elde edilen yumurtalı distile su süspansiyonu konik mezurlara alınarak 30-40 dk bekletildi. Süre sonunda üstteki distile su alınabildiği kadar ortamdan uzaklaştırıldı ve tekrar distile su ilave edilerek aynı süre bekletildi. *Toxocara canis*'lerin organel parçalarının ortamdan uzaklaştırılması için bu işlem 3 kez tekrarlandı. İşlem sonunda dipte toplanan yumurta süspansiyonu petri kutularına aktarıldı. 23 gün 26-27 °C'de inkubasyona (EN500, Nüve, Türkiye) bırakıldı. Her gün sıvı kontrolü yapıldı ve yumurtalar havalandırıldı.

İnkubasyonun 23. günü yumurtalar 2000 devir/dk'da 5 dk olmak üzere toplam 4 kez santrifüj edildi. Her defasında tüplerdeki distile su atılarak yerine phosphate buffered saline (PBS) ilave edildi. Son santrifüjde ortamdaki fazla PBS de uzaklaştırıldı.

Ana süspansiyonda 90 µl PBS olacak şekilde, 1,5 ml'lik 10 adet DNase RNase ari mikrosantrifüj tüp içerisine sırasıyla; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 adet larvalı ve/veya morula aşamasındaki yumurta eklendi. Örnekler önce -20 °C'de

donduruldu. Ardından oda sıcaklığında çözündürüldü. Ekstraksiyon için ticari DNA purifikasyon kiti (Thermo Scientific, Litvanya) kullanıldı. Kitin ilk basamağı 6 saat uzatıldı. Ancak diğer basamaklar, üretici firmanın önerdiği protokole uygun şekilde yapıldı. Ekstraksiyon sonrası DNA miktar tayini için nanodrop spektrofotometre (ND2000, Thermo Scientific, ABD) kullanıldı (Ek-4). Elde edilen örnekler içlerindeki yumurta sayısına göre etiketlendirilerek PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere -20 °C’de dondurularak saklandı.

2.2.5.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Ekstraksiyonu takiben örneklerin tümü mtDNA ATP sentetaz alt ünite 6 bölgesine spesifik primerler kullanılarak PCR işlemine tabi tutuldu. Araştırmada kullanılan dizinler çalışma kapsamında tasarlandı (Çizelge 2.1). Bu primerler ile sınırlanarak çoğaltılan mtDNA ATP sentetaz alt ünite 6 bölgesi Çizelge 2.2’de verildi.

Çizelge 2.1. PCR’da kullanılan primer dizinleri ve elde edilen ürün büyüklüğü.

Primer adı	Primer dizini 5’→3’	Lokasyon (bp)	Ürün büyüklüğü (bp)	Kaynak
<i>T. canis</i> ATP F1	GTTTGTTGTTTTGGGGGCTA	190-209	217	Orjinal
<i>T. canis</i> ATP R1	CCAAAGGACGAGAAACCTCA	387-406		

F: Forward **R:** Reverse

Çizelge 2.2. PCR’da çoğaltılan bölgenin dizini.

GTTTGTTGTTT	TGGGGGCTAT	TTTACTTATT	CTTTTTGTCC
TTGTGGTATG	GTAGAGTTTA	CTTTTGTTTA	TGCTGTTGTG
GCCTGGATGA	GAACTTTTT	ATCTTTCATT	TCTAGTGAGA
AGTTTTCTGT	TTATATTCT	AAGCCTGGCG	ATAGATTTTT
GAAGACTTTT	AGGATGTTAT	TGGTTGAGAT	TGTTAGTGAG
GTTTCTCGTC	CTTTGG		

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda yapılan karışımların içerikleri Çizelge 2.3’de, uygulanan ısı döngüleri de Çizelge 2.4’de verildi. Tüm bu işlemler için termal çevirici cihaz (T1 Biometra, Almanya) kullanıldı.

Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan PCR karışım bileşenleri ve miktarları.

PCR Karışımı	
Bileşen	Miktar (µl)
DNA	10
10xTampon	3
MgCl ₂ (25 mM)	2,4
dNTP (10 mM)	0,8
Primer F (10 pmol/µl)	0,5
Primer R (10 pmol/µl)	0,5
DNAse, RNAse ari H ₂ O (18 Mohm-cm)	12,5
Taq DNA Polimeraz (5 U/µl)	0,3
Toplam reaksiyon hacmi	30

Çizelge 2.4. PCR karışımına uygulanan ısı döngüleri.

Basamak adı	
Birincil denatürasyon	94 °C 5 dk
Yapışma	50 °C 1 dk
Uzama	72 °C 1 dk
Denatürasyon	94 °C 30 sn
Son uzama	72 °C 10 dk

} x 34 döngü

30 µl’lik karışımlar; 94 °C’de 5 dk denatürasyon basamağından sonra, 50 °C’de 1 dk, 72 °C’de 1 dk, 94 °C’de 30 sn’lik 34 döngü, 50 °C’de 1 dk ve 72 °C’de 10 dk son uzama basamağından oluşan ısı döngülerine maruz bırakıldı.

2.2.5.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi ile Görüntülenmesi

Amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi için % 3 yoğunlukta olacak şekilde 1,5 gr agaroz (Prona, İspanya) üzerine 50 ml 0,5xTAE (Tris-Asetik Asit-EDTA) elektroforez tampon solüsyonu ilave edildi ve karışım mikrodalga fırında ısıtılarak çözüldü. Agarozun 50-55 °C’ye soğuması beklendikten sonra üzerine 0,8 µg/ml etidyum bromid (Sigma-Aldrich, ABD) ilave edildi. Hazırlanan % 3’lük agaroz, tırağı yerleştirilmiş jel taşıyıcısına döküldü. Agarozun donması için 25-30 dk

beklendi. Donan agaroz jelden taraklar çıkarılarak, jel tankına yerleştirildi. Daha sonra jelin üstü tamamen örtülene kadar 0,5xTAE ilave edildi.

PCR ürünleri, 6xLoading dye (Fermentas, Litvanya) ile bir kısım boya ve beş kısım PCR ürünü olacak şekilde karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Ürün büyüklüklerinin belirlenebilmesi için 10-300 bp'lik DNA merdiveni (Fermentas, Litvanya) (1 kısım depo marker + 1 kısım yükleme boyası + 4 kısım DNase RNase ari su), örneklerin en dışındaki kuyucuklara 1 µl olacak şekilde yüklendi.

Jele 8 volt/cm akımı uygulanarak 50 dk süre ile ürünler yürütüldü. Süre sonunda agaroz jel CCD kamera bağlantılı UV transilluminatore (Vilber Lourmat, Fransa) nakledildi ve jel görüntüleme sisteminde (Kodak Gel Logic 100, ABD) görüntülendi.

2.2.5.4. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analizi

PCR ürünü agaroz jelde yürütüldükten sonra, görüntülenen bantların spesifikliğini kontrol etmek amacıyla PCR ürünü Bbs-I (New England Bio Labs® Inc., İngiltere) (5000 units/ml) restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesime tabi tutuldu. Bu enzim elde edilen PCR ürününü 1 pozisyonundan (360. bp) kesti (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. PCR ürününün Bbs-I restriksiyon endonükleaz enzim kesimi sonucu oluşan iki fragment.

^a GTTTGTGTTT TTGTGGTATG GCCTGGATGA AGTTTTCTGT GAAGACTTT ▶ ^b T GTTTCTCGTC	TGGGGGCTAT GTAGAGTTTA GAACTTTTT TTATATTTCT AGGATGTTAT CTTTGG	TTACTTATT CTTTTGTTTA ATCTTTCATT AAGCCTGGCG TGGTTGAGAT	CTTTTGTCC TGCTGTTGTG TCTAGTGAGA ATAGATTTTT TGTTAGTGAG
---	---	---	---

▶: Bbs-I restriksiyon endonükleaz enzim tanıma bölgesi ■: 1. fragment (170 bp)

■: 2. fragment (47 bp)

Bu amaçla 5 µl DNA ürünü (amplikonu), 2 µl DNase RNase ari su, 2 µl Bbs-I enzimi ve 1 µl Buffer-2 (toplam 10 µl) karıştırılarak 37 °C’de 55 dakika bekletildi. Süre sonunda % 3’lük agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak kesim işlemi görüntülendi.

2.2.5.5. İstatistiksel Analizler

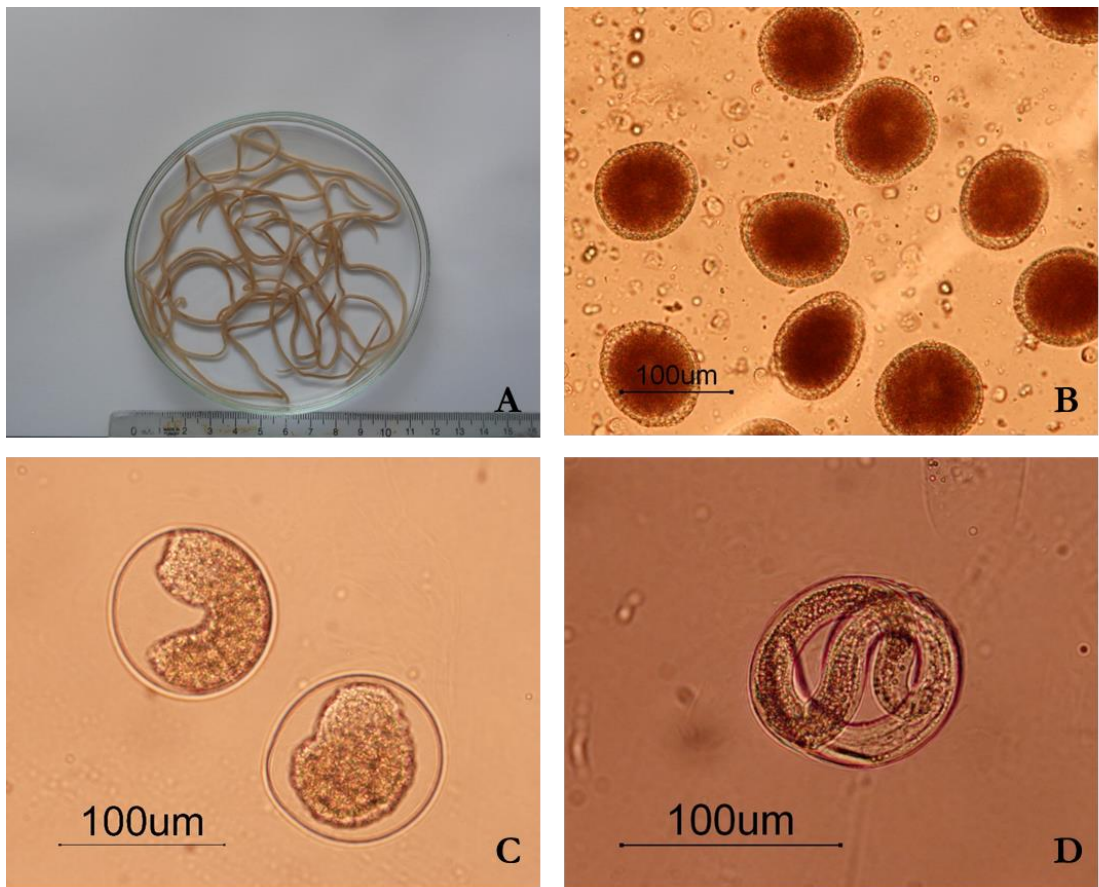
Pepsin enzimi ile organ sindirimi ve PCR yöntemlerine ait tanımlayıcı istatistikler (ortalama, standart sapma, ortanca, en büyük değer, en küçük değer) verilmiştir.

Doku türüne göre PCR sonuçlarının (negatif/pozitif) karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi, dokular arasında larva sayıları arasındaki farklılık ve farklı nekropsi günlerinde aynı dokunun bağımsız günlerindeki larva sayılarının değişimi Kruskal-Wallis testi, tüm grupların farklı dokularındaki PCR sonucu ile larva görülme sıklıkları arasındaki farklılık Ki-kare testi ile incelendi. Analizlerde sonuçlara göre $P<0,01$ ve $P<0,001$ değerleri anlamlı kabul edildi. Testin gücü; spesifite, sensitivite ve doğruluk oranları ile tanımlandı.

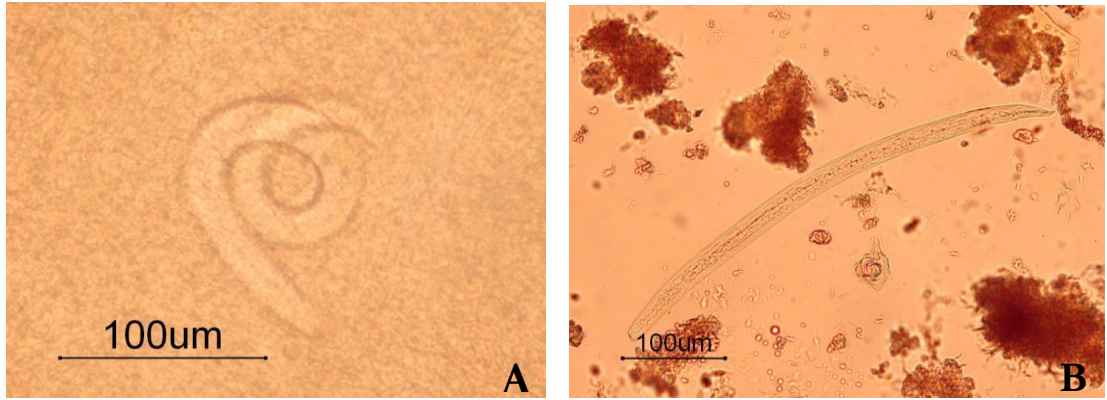
3. BULGULAR

3.1. Parazitolojik Sonuçlar

Oluşturulan Visceral Larva Migrans modelinde 4 nekropsi gününde 36 BALB/c fare sakrifiye edilmiş, organlar ikişer parçaya ayrılmıştır. Organların bir parçası pepsin-HCl ile digesyona tabi tutulmuştur. Sonuçlar Çizelge 3.1-3.4 ve Şekil 3.1 ve 3.2’de işlenmiştir.



Şekil 3.1. Farelerde VLM oluşturulması amacıyla toplanan ve enfektif döneme getirilen *T. canis* örnekleri **A:** *T. canis* erişkinleri **B:** Dişi *T. canis*'in uterusundan çıkarılan yumurtalar **C:** *T. canis* yumurtası gelişimi (etüv 5. gün) **D:** *T. canis* yumurtası gelişimi (etüv 21. gün).



Şekil 3.2. Fare dokularında teşhis edilen *T. canis* larvaları **A:** Beyin dokusu ezme preperatında *T. canis* larvası (nekropsi 4. gün) **B:** Pepsin-HCl digesyonu sonucu karaciğer dokusundaki *T. canis* larvası (nekropsi 14. gün).

Çalışmada, pozitif kontrol gruplarında görülen larvaların günlere göre varlığı ve/veya miktarı parazitin biyolojisiyle uyum içerisinde bulunmuştur.

Nekropsi 2. günde, tüm pozitif kontrol grubu farelerin karaciğer ve akciğer dokularında *T. canis* larvalarına rastlanırken; beyin, ön ve arka bacak kaslarında bu larvalara rastlanmamıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Nekropsi 2. gün pepsin-HCl ile digesyona tabi tutulan doku miktarı ve toplanan larva sayıları.

Örnek adı	Dokular									
	Karaciğer		Akciğer		Beyin		Ön bacak kası		Arka bacak kası	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
D1	0,37	97	0,07	3	0,17	-	0,40	-	0,63	-
D2	0,52	271	0,05	6	0,14	-	0,28	-	0,56	-
D3	0,69	152	0,12	8	0,14	-	0,55	-	0,66	-
D4	0,46	193	0,06	6	0,16	-	0,50	-	0,73	-
D5	0,44	97	0,08	1	0,13	-	0,25	-	0,50	-
D6	0,47	350	0,04	13	0,18	-	0,55	-	0,74	-
K1	0,41	-	0,02	-	0,10	-	0,60	-	0,12 (kemiksiz)	-
K2	0,36.	-	0,05	-	0,12	-	0,24	-	0,62	-
K3	0,35	-	0,03	-	0,06	-	0,58	-	0,70	-

A: Eritilen miktar (g) **B:** Bulunan larva sayısı

D: VLM oluşturulmuş pozitif kontrol grubu **K:** Negatif kontrol grubu

Nekropsi 4. günde karaciğer, akciğer ve beyin dokularında pozitif kontrol gruplarının tamamında *T. canis* larvası bulunurken, ön bacak kasında 1 (D6), arka

bacak kasında ise 3 (D2, D4, D6) pozitif kontrol grubu örneği negatif bulunmuştur (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Nekropsi 4. gün pepsin-HCl ile digesyona tabi tutulan doku miktarı ve toplanan larva sayıları.

Örnek adı	Dokular									
	Karaciğer		Akciğer		Beyin		Ön bacak kası		Arka bacak kası	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
D1	0,46	65	0,25	121	0,22	33	0,45	10	0,78	2
D2	0,59	83	0,36	137	0,15	47	0,53	2	0,75	-
D3	0,35	40	0,23	164	0,11	47	0,54	3	0,66	1
D4	0,47	75	0,15	168	0,15	34	0,52	1	0,65	-
D5	0,23	55	0,28	128	0,12	67	0,47	12	0,60	2
D6	0,51	75	0,24	99	0,13	38	0,60	-	1,15	-
K1	0,33	-	0,01	-	0,08	-	0,45	-	0,54	-
K2	0,41	-	0,02	-	0,15	-	0,45	-	0,82	-
K3	0,31	-	0,01	-	0,05	-	0,42	-	0,66	-

A: Eritilen miktar (g) **B:** Bulunan larva sayısı

D: VLM oluşturulmuş pozitif kontrol grubu **K:** Negatif kontrol grubu

Nekropsi 7. ve 14. günlerinde sadece arka bacak kası dokularındaki birer (D6-D6) pozitif kontrol grubu örneği negatif bulunmuştur. Diğer dokulardaki (karaciğer, akciğer, beyin ve ön bacak kası) tüm pozitif kontrol gruplarında *T. canis* larvalarına rastlanmıştır (Çizelge 3.3 ve 3.4).

Çizelge 3.3. Nekropsi 7. gün pepsin-HCl ile digesyona tabi tutulan doku miktarı ve toplanan larva sayıları.

Örnek adı	Dokular									
	Karaciğer		Akciğer		Beyin		Ön bacak kası		Arka bacak kası	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
D1	0,40	12	0,16	16	0,06	22	0,40	38	0,49	10
D2	0,27	10	0,17	37	0,14	72	0,40	32	0,59	14
D3	0,18	27	0,20	48	0,09	75	0,19	38	0,53	16
D4	0,15	46	0,18	70	0,08	85	0,35	30	0,57	4
D5	0,24	7	0,11	24	0,07	19	0,42	13	0,64	6
D6	0,34	11	0,32	31	0,14	56	0,30	7	0,83	-
K1	0,50	-	0,10	-	0,11	-	0,38	-	0,79	-
K2	0,32	-	0,06	-	0,14	-	0,34	-	0,50	-
K3	0,42	-	0,04	-	0,12	-	0,23	-	0,53	-

A: Eritilen miktar (g) **B:** Bulunan larva sayısı

D: VLM oluşturulmuş pozitif kontrol grubu **K:** Negatif kontrol grubu

Çizelge 3.4. Nekropsi 14. gün pepsin-HCl ile digesyona tabi tutulan doku miktarı ve toplanan larva sayıları.

Örnek adı	Karaciğer		Akciğer		Beyin		Dokular		Ön bacak kası		Arka bacak kası	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
D1	0,45	8	0,08	2	0,12	1	0,51	4	0,64	9		
D2	0,47	3	0,10	6	0,14	35	0,49	13	0,77	14		
D3	0,39	7	0,14	8	0,11	52	0,43	23	0,45	16		
D4	0,59	15	0,16	11	0,10	44	0,42	18	0,65	20		
D5	0,58	5	0,15	11	0,14	70	0,64	14	0,68	5		
D6	0,51	2	0,05	2	0,12	48	0,49	6	0,91	-		
K1	0,45	-	0,08	-	0,09	-	0,44	-	0,67	-		
K2	0,43	-	0,04	-	0,06	-	0,42	-	0,61	-		
K3	0,30	-	0,10	-	0,06	-	0,26	-	0,69	-		

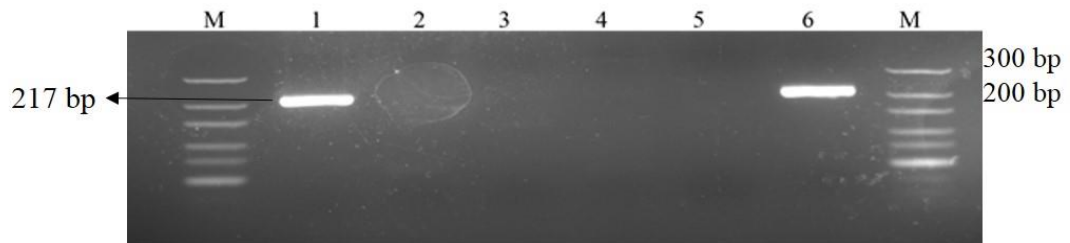
A: Eritilen miktar (g) **B:** Bulunan larva sayısı

D: VLM oluşturulmuş pozitif kontrol grubu **K:** Negatif kontrol grubu

Negatif kontrol grubu farelerin herhangi bir dokusunda hiç larvaya rastlanmamıştır (Çizelge 3.1-3.4).

3.2. PCR Sonuçları

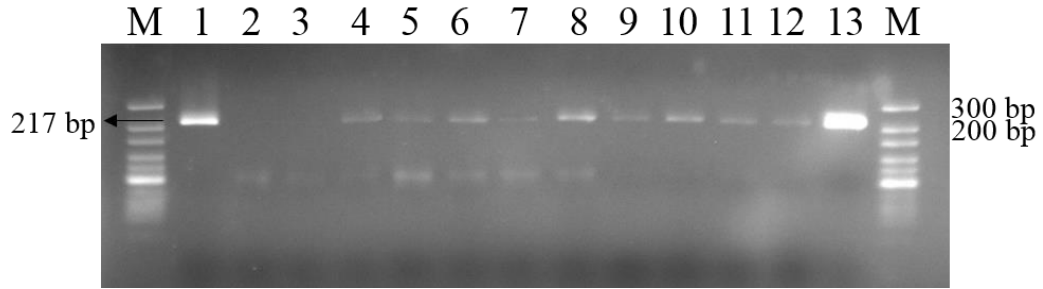
Toxocara canis için tasarlanan primerler kedi, köpek ve insan genomu ile reaksiyona sokulmuş, sonuçlar Şekil 3.3'de verilmiştir. Yapılan değerlendirmede tasarlanan primerler ile köpek, kedi ve insan genomunda istenilen bölgede herhangi bir ampikon elde edilmedi. Ayrıca *T. cati* ve *T. leonina* ile yapılan PCR'da her iki parazitte de pozitifliğe rastlanmadı.



Şekil 3.3. Primerlerin köpek, kedi ve insan gDNA'sındaki reaksiyonu.

M: DNA merdiveni (10-300 bp) **1:** Pozitif kontrol **2:** Negatif kontrol **3:** Köpek DNA'sı **4:** Kedi DNA'sı **5:** İnsan DNA'sı **6:** Pozitif kontrol

Morulalı ve/veya larvalı *T. canis* yumurtalarının PCR’da teşhis edilebilen en az miktarı (deteksiyon sınırı) saptanmış olup, 2 yumurtadan itibaren pozitif sonuçlar alınmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. *T. canis* yumurtalarının deteksiyon sınırı PCR sonuçları agaroz jel görüntüleri.

M: DNA merdiveni (10-300 bp) **1:** Pozitif kontrol **2:** Negatif kontrol **3:** 1 yumurta **4:** 2 yumurta **5:** 3 yumurta **6:** 4 yumurta **7:** 5 yumurta **8:** 6 yumurta **9:** 7 yumurta **10:** 8 yumurta **11:** 9 yumurta **12:** 10 yumurta **13:** Pozitif kontrol

Doku örnekleri -80 °C’den önce -20 °C’de sonra +4 °C’de kademeli olarak çözündürülmüş, DNA izolasyonu sonrasında, PCR’ları yapılan doku örneklerine ait DNA izolasyonu sonrası nükleik asit miktarları Ek-3’de verilmiştir. Enfeksiyon sonrası 2., 4., 7. ve 14. günlerde yapılan örneklemelere ilişkin PCR sonuçları Çizelge 3.5-3.8 ve Şekil 3.5-3.7’de verilmiştir.

Nekropsi 2. gün: Karaciğer dokusunda tüm pozitif kontrol grubu örnekleri pozitif bulunmuştur. Akciğer dokusunda, D4 ve D5 örnekleri dışındaki 4 örnek pozitif saptanmıştır. Ön bacak kasında, D1 örneği pozitifken aynı dokuda diğer örnekler ise negatiftir. Beyin dokusu ve arka bacak kasındaki tüm deneme grupları negatif kaydedilmiştir (Çizelge 3.5).

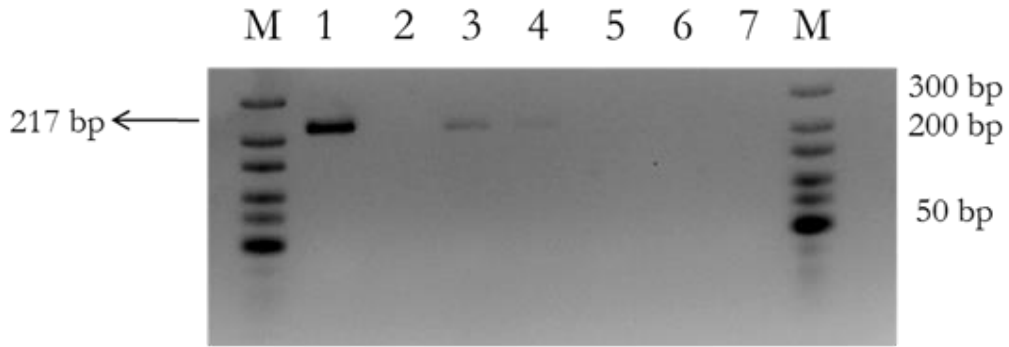
Çizelge 3.5. Nekropsi 2. gün PCR sonuçları.

Örnek adı	Karaciğer	Akciğer	Dokular			Arka bacak kası
			Beyin	Ön bacak kası		
D1	+	+	-	+		-
D2	+	+	-	-		-
D3	+	+	-	-		-
D4	+	-	-	-		-
D5	+	-	-	-		-

Çizelge 3.5 Devam.

D6	+	+	-	-	-
K1	-	-	-	-	-
K2	-	-	-	-	-
K3	-	-	-	-	-

D: VLM oluşturulmuş pozitif kontrol grubu **K:** Negatif kontrol grubu **+**: mtDNA ATP sentetaz alt ünite 6 bölgesi pozitif **-**: mtDNA ATP sentetaz alt ünite 6 bölgesi negatif

**Şekil 3.5.** Nekropsi 2. gün D2 grubu PCR sonuçları agaroz jel görüntüleri.

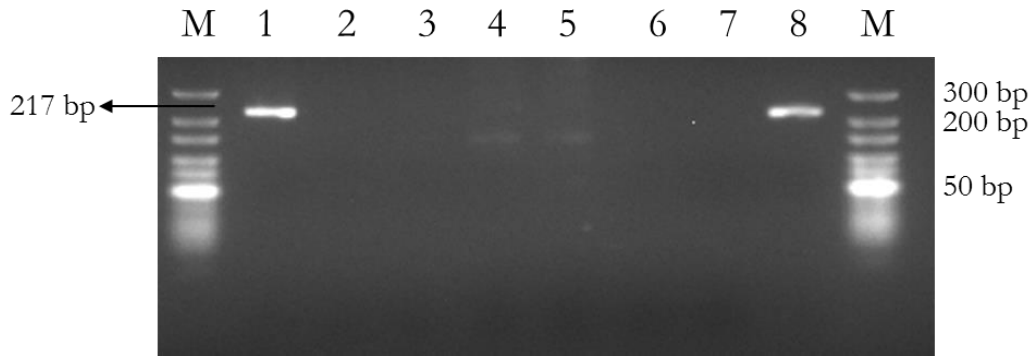
M: DNA merdiveni (10-300 bp) **1:** Pozitif kontrol **2:** Negatif kontrol **3:** Karaciğer **4:** Akciğer **5:** Beyin **6:** Ön bacak kası **7:** Arka bacak kası

Nekropsi 4. gün: Karaciğer, akciğer, beyin ve arka bacak kaslarındaki tüm pozitif kontrol grubu örnekleri pozitif bulunmuştur. Ön bacak kası örneklerinde D4 negatif, diğer örnekler ise pozitif olarak teşhis edilmiştir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. Nekropsi 4. gün PCR sonuçları.

Örnek adı	Dokular				
	Karaciğer	Akciğer	Beyin	Ön bacak kası	Arka bacak kası
D1	+	+	+	+	+
D2	+	+	+	+	+
D3	+	+	+	+	+
D4	+	+	+	-	+
D5	+	+	+	+	+
D6	+	+	+	+	+
K1	-	-	-	-	-
K2	-	-	-	-	-
K3	-	-	-	-	-

D: VLM oluşturulmuş pozitif kontrol grubu **K:** Negatif kontrol grubu **+**: mtDNA ATP sentetaz alt ünite 6 bölgesi pozitif **-**: mtDNA ATP sentetaz alt ünite 6 bölgesi negatif



Şekil 3.6. Nekropsi 4. gün K1 grubu PCR sonuçları agaroz jel görüntüleri.

M: DNA merdiveni (10-300 bp) **1:** Pozitif kontrol **2:** Negatif kontrol **3:** Karaciğer **4:** Akciğer **5:** Beyin **6:** Ön bacak kası **7:** Arka bacak kası **8:** Pozitif kontrol

Nekropsi 7. gün: Akciğer, beyin, ön bacak ve arka bacak kasları pozitif kontrol grubu örneklerinin hepsi pozitif bulunmuştur. Karaciğer dokusunda ise, D1 örneği dışındaki diğer örnekler pozitif saptanmıştır (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Nekropsi 7. gün PCR sonuçları.

Örnek adı	Karaciğer	Akciğer	Dokular			Arka bacak kası
			Beyin	Ön bacak kası		
D1	-	+	+	+		+
D2	+	+	+	+		+
D3	+	+	+	+		+
D4	+	+	+	+		+
D5	+	+	+	+		+
D6	+	+	+	+		+
K1	-	-	-	-		-
K2	-	-	-	-		-
K3	-	-	-	-		-

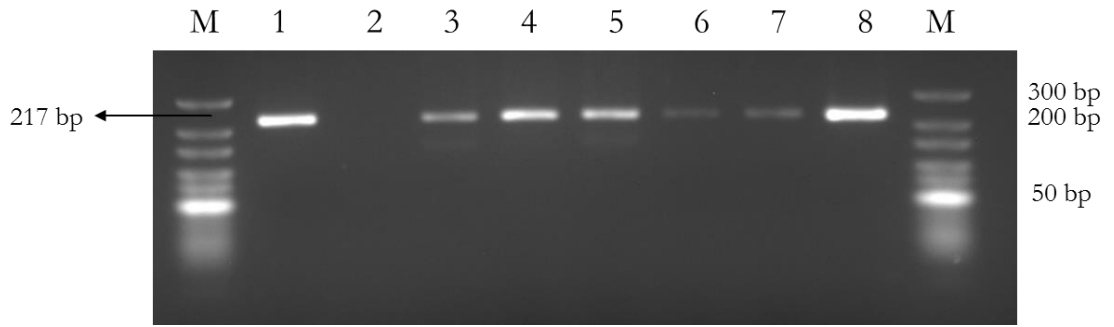
D: VLM oluşturulmuş pozitif kontrol grubu **K:** Negatif kontrol grubu **+:** mtDNA ATP sentetaz alt ünite 6 bölgesi pozitif örnekler **-:** mtDNA ATP sentetaz alt ünite 6 bölgesi negatif örnekler

Nekropsi 14. gün: Beyin, ön bacak ve arka bacak kası pozitif kontrol gruplarında örneklerin hepsinde pozitif bantlar görülmüştür. Karaciğer dokusunda D2, D3, ve D5 örnekleri negatif, diğer örnekler pozitif olarak kaydedilmiştir. Akciğer dokusunda ise sadece D2 örneği negatif saptanmıştır (Çizelge 3.8). Tüm nekropsi günlerinde negatif kontrol grubundaki örnekler negatif saptanmıştır.

Çizelge 3.8. Nekropsi 14. gün PCR sonuçları.

Örnek adı	Karaciğer	Akciğer	Beyin	Dokular	
				Ön bacak kası	Arka bacak kası
D1	+	+	+	+	+
D2	-	-	+	+	+
D3	-	+	+	+	+
D4	+	+	+	+	+
D5	-	+	+	+	+
D6	+	+	+	+	+
K1	-	-	-	-	-
K2	-	-	-	-	-
K3	-	-	-	-	-

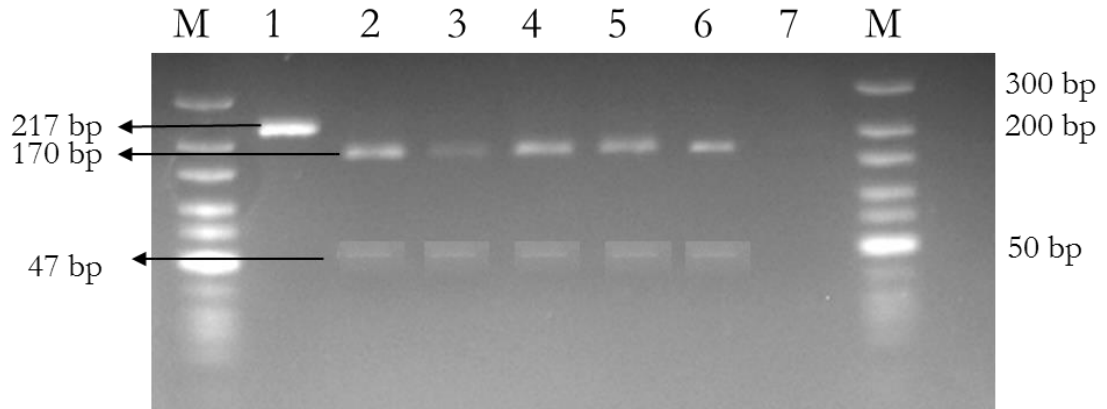
D: VLM oluşturulmuş pozitif kontrol grubu **K:** Negatif kontrol grubu **+**: mtDNA ATP sentetaz alt ünite 6 bölgesi pozitif örnekleri **-**: mtDNA ATP sentetaz alt ünite 6 bölgesi negatif örnekleri

**Şekil 3.7.** Nekropsi 14. gün D4 grubu PCR sonuçları agaroz jel görüntüleri.

M: DNA merdiveni (10-300 bp) **1:** Pozitif kontrol **2:** Negatif kontrol **3:** Karaciğer **4:** Akciğer **5:** Beyin **6:** Ön bacak kası **7:** Arka bacak kası **8:** Pozitif kontrol

3.3. RFLP Sonuçları

PCR sonrası pozitif bulunan ampliconların spesifikliğini tespit etmek amacıyla; Bbs-I enzimi ile kesim yapılmış, enzim ampliconu bir yerinden kesmiş, 170 bp ve 47 bp olmak üzere iki ürün oluşturmuştur. Ürünler % 3'lük agaroz jelde (Şekil 3.8) görüntülenmiştir. Ürünlerin tamamında beklenen büyüklüklerde ve 2 adet DNA fragmanı elde edilmiştir.



Şekil 3.8. Nekropsi 14. gün D4 grubu Bbs-I enzim kesimi agaroz jel görüntüleri.

M: DNA merdiveni (10-300 bp) **1:** Pozitif kontrol kesilmemiş PCR ürünü **2:** Pozitif kontrol enzim kesimi **3:** Karaciğer dokusu enzim kesimi **4:** Akciğer dokusu enzim kesimi **5:** Beyin dokusu enzim kesimi **6:** Ön bacak kası enzim kesimi **7:** Negatif kontrol

3.4. İstatistik Değerlendirme

Negatif kontrol gruplarındaki fare dokularında larva bulunmamıştır. Pozitif kontrol gruplarında ise, karaciğer ve akciğer dokusunda nekropsi günlerinin hepsinde larvalara rastlanmıştır. Karaciğerde; gram dokuda ortalama larva sayısı; 2. günde 398,00, 4. günde 157,00, 7. günde 97,50 iken 14. günde 13,33 olarak saptanmıştır. Akciğerde ise, gram dokuda ortalama larva sayısı 2. günde 111,33; 4. günde 594,67; 7. günde 210,33 iken 14. günde 54,00 bulunmuştur. Beyin, ön bacak ve arka bacak kas dokularında nekropsi 2. günde larvalara rastlanmazken; beyin ve ön bacak kası dokularında, gram dokuda ortalama larva sayısı sırasıyla en yüksek 574,67 ve 85,83 ile nekropsi 7. günde, arka bacak kasında ise 17,67 ile nekropsi 14. günde rastlanmıştır (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. Negatif ve pozitif kontrol gruplarında farklı dokularda ve farklı nekropsi günlerinde saptanan larva sayılarının (adet/gram) tanımlayıcı istatistikleri.

Grup	Doku	Nekropsi günü	Larva sayısı (adet/gram)				
			Ortalama	Standart sapma	Ortanca	En büyük değer	En küçük değer
Negatif Kontrol Grubu	Karaciğer	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Akciğer	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Beyin	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Ön bacak kası	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Arka bacak kası	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Pozitif Kontrol Grubu	Karaciğer	2	398,00	208,75	341,00	745,00	220,00
		4	157,00	42,88	144,00	239,00	114,00
		7	97,50	113,00	34,50	307,00	29,00
		14	13,33	8,24	13,50	25,00	4,00
	Akciğer	2	111,33	111,50	83,50	325,00	13,00
		4	594,67	282,78	470,50	1120,00	381,00
		7	210,33	107,65	218,00	389,00	97,00
		14	54,00	18,26	58,50	73,00	25,00
	Beyin	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		4	327,83	145,68	302,50	558,00	150,00
		7	574,67	308,13	457,00	1063,00	271,00
		14	345,17	187,11	420,00	500,00	8,00
	Ön bacak kası	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		4	10,00	11,10	5,00	26,00	0,00
		7	85,83	63,41	83,00	200,00	23,00
		14	27,50	17,56	24,50	53,00	8,00
	Arka bacak kası	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		4	1,33	1,51	1,00	3,00	0,00
		7	15,00	11,45	14,50	30,00	0,00
		14	17,67	13,81	16,00	36,00	0,00

Bütün gruplarda yapılan PCR uygulamalarının sonuçlarında bağımsız örneklerde Mann-Whitney U testi yapılmıştır. Bakısı yapılan tüm dokulardaki PCR pozitif ya da negatif kontrol gruplarında larva miktarları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$) (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10. Negatif ve pozitif kontrol gruplarında farklı dokularda saptanan PCR sonuçlarının larva sayıları (adet/gram) ile ilgili istatistikleri.

Doku	PCR sonucu	Larva sayısı (adet/gram)					P değeri
		Ortalama	Standart sapma	Ortanca	En büyük değer	En küçük değer	
Karaciğer	Negatif	3,94	8,54	0,00	30,00	0,00	*
	Pozitif	196,60	188,25	148,50	745,00	4,00	
Akciğer	Negatif	11,53	29,00	0,00	100,00	0,00	*
	Pozitif	269,00	270,86	218,00	1120,00	25,00	
Beyin	Negatif	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	*
	Pozitif	415,89	240,55	400,00	1063,00	8,00	
Ön bacak kası	Negatif	0,11	0,47	0,00	2,00	0,00	*
	Pozitif	41,00	49,32	24,50	200,00	0,00	
Arka bacak kası	Negatif	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	*
	Pozitif	11,33	12,23	7,00	36,00	0,00	

*: $P<0,001$

“Farklı dokularda negatif kontrol ve pozitif kontrol grubu değişkeni ile PCR sonucu değişkeni ilişkili değildir” hipotezi reddedilmektedir ($p<0,001$) (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.11. Dokulara ait Ki-kare testi sonuçları.

Doku	Grup		PCR sonucu		Toplam
			Negatif	Pozitif	
Karaciğer	Negatif kontrol	N	12	0	12
		%	100,0	0,0	100,0
	Pozitif kontrol	N	4	20	24
		%	16,7	83,3	100,0
	Toplam	N	16	20	36
		%	44,4	55,6	100,0
Akciğer	Negatif kontrol	N	12	0	12
		%	100,0	0,0	100,0
	Pozitif kontrol	N	3	21	24
		%	12,5	87,5	100,0
	Toplam	N	15	21	36
		%	41,7	58,3	100,0
Beyin	Negatif kontrol	N	12	0	12
		%	100,0	0,0	100,0
	Pozitif kontrol	N	6	18	24
		%	25,0	75,0	100,0
	Toplam	N	18	18	36
		%	50,0	50,0	100,0
Ön bacak kası	Negatif kontrol	N	12	0	12
		%	100,0	0,0	100,0
	Pozitif kontrol	N	6	18	24
		%	25,0	75,0	100,0
	Toplam	N	18	18	36
		%	50,0	50,0	100,0
Arka bacak kası	Negatif kontrol	N	12	0	12
		%	100,0	0,0	100,0
	Pozitif kontrol	N	6	18	24
		%	25,0	75,0	100,0
	Toplam	N	18	18	36
		%	50,0	50,0	100,0
Ki-kare testi					
	Değer		Serbestlik derecesi		P değeri (2-yönlü)
Ki-kare karaciğer	22,500		1		0,000
Ki-kare akciğer	25,200		1		0,000
Ki-kare beyin	18,000		1		0,000
Ki-kare ön bacak kası	18,000		1		0,000
Ki-kare arka bacak kası	18,000		1		0,000
Geçerli gözlem sayısı	36				

N: Örnek sayısı

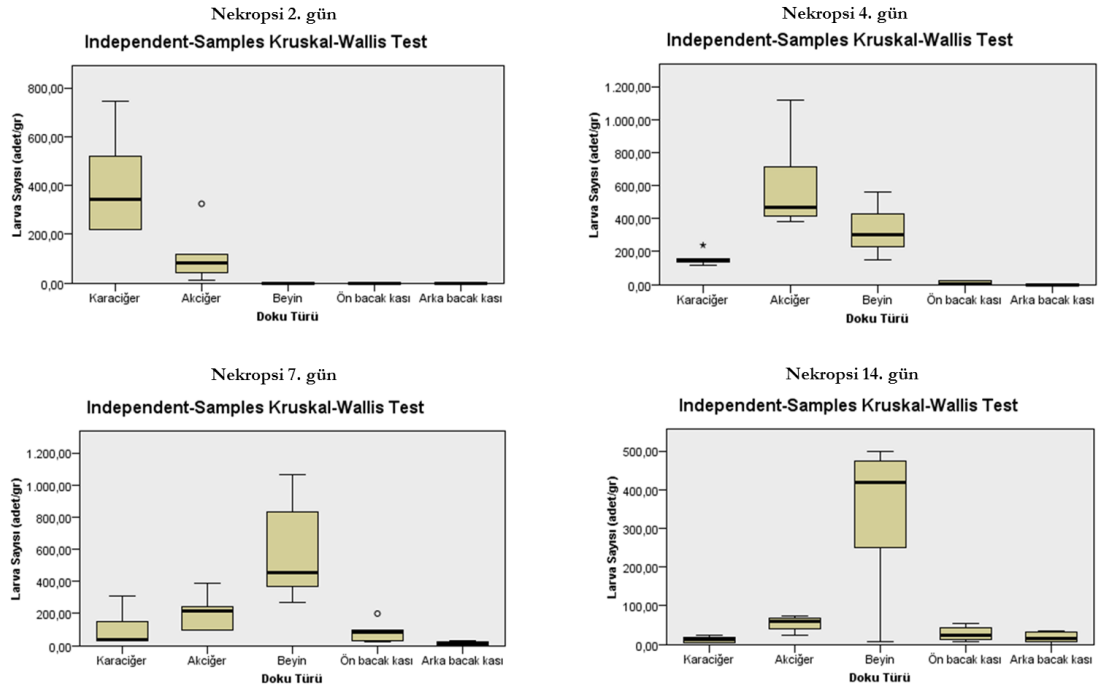
Karaciğer dokusunda yapılan PCR sonucunda bu dokudaki testin sensitivitesi % 83,33, doğruluk oranı % 88,88; akciğer dokusunda sensitivite % 87,50, doğruluk oranı ise % 91,66 oranında bulunmuştur. Beyin, ön bacak ve arka bacak kası dokularındaki PCR sonuçlarında bu dokulardaki testlerin sensitivitesi % 75 ve doğruluk oranları % 83,33 olarak saptanmıştır. Tüm dokularda testin spesifitesi %100,0'dür. (Çizelge 3.12).

Çizelge 3.12. Dokulara göre PCR sonuçlarının sensitivite, spesifite ve doğruluk oranı analizi.

Doku	Sensitivite (%)	Spesifite (%)	Doğruluk oranı (%)
Karaciğer	83,33	100,0	88,88
Akciğer	87,50	100,0	91,66
Beyin	75,00	100,0	83,33
Ön bacak kası	75,00	100,0	83,33
Arka bacak kası	75,00	100,0	83,33

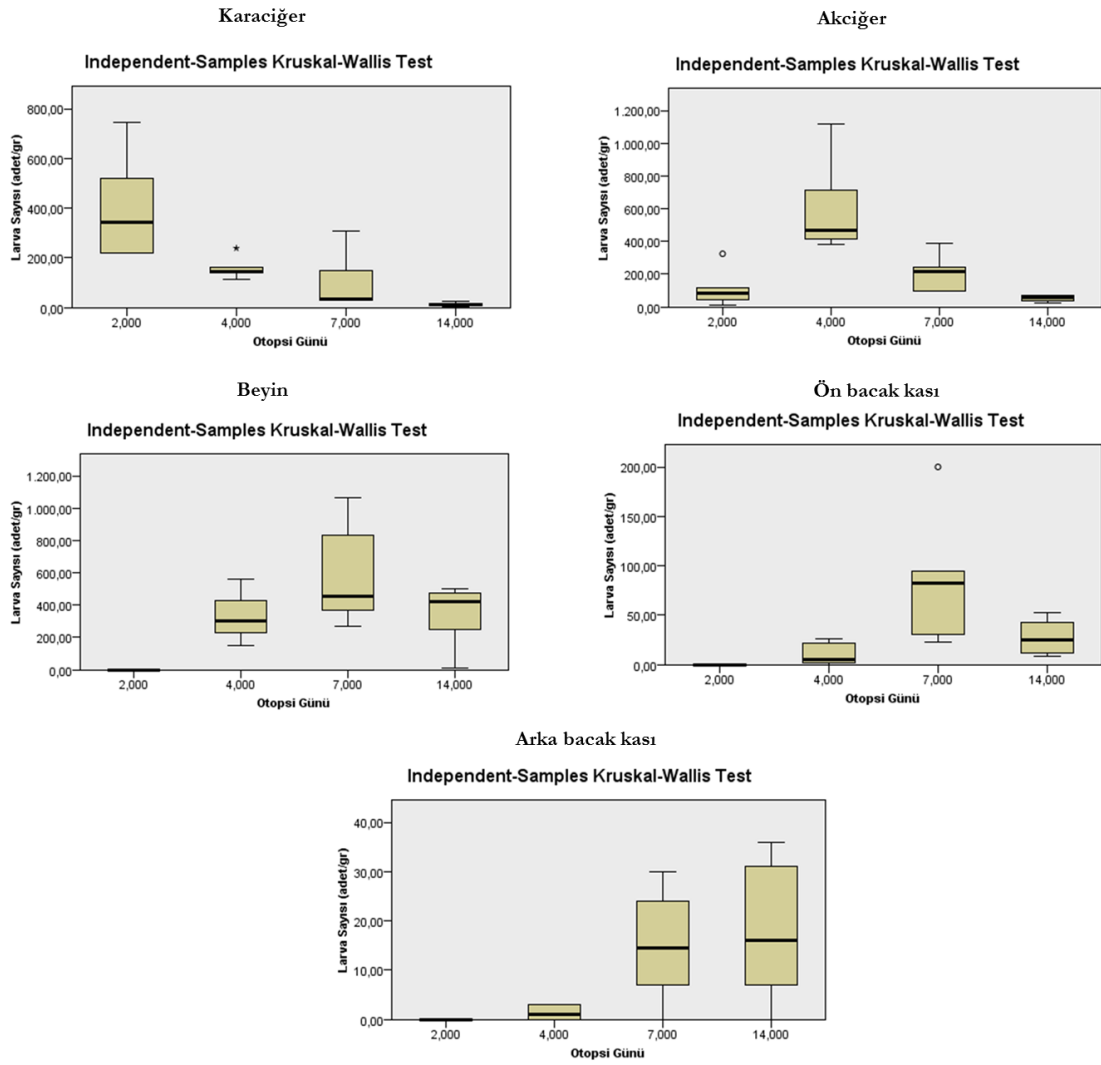
Akciğer dokusundaki sensitivite ve doğruluk oranı, diğer dokular ile karşılaştırıldığında daha yüksek saptanmıştır (Çizelge 3.12).

“Pozitif kontrol gruplarında farklı nekropsi günlerine göre dokular arasında larva görülme düzeyleri aynıdır” hipotezi bağımsız örneklerde Kruskal-Wallis testi ile reddedilmiştir ($p<0,01$) (Farklı nekropsi günlerinde, farklı dokuda saptanan larva sayıları birbirinden farklıdır). Nekropsi 2. günde karaciğer-beyin, karaciğer-ön bacak kası ve karaciğer-arka bacak kasında larva sayıları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) bulunmuş, karaciğer dokusu en fazla miktardaki larvayı taşıırken beyin, ön bacak ve arka bacak kaslarında larvalara rastlanmamıştır. Nekropsi 4. günde; beyin-arka bacak kası, akciğer-arka bacak kası, akciğer-ön bacak kası arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Karaciğerdeki larva miktarı azalırken akciğerde artışa, beyinde de larva görülmeye başlanmıştır. Nekropsi 7. günde; arka bacak kası-akciğer, arka bacak kası-beyin, ön bacak kası-beyin dokuları larva sayılarında anlamlı fark vardır ($p<0,001$). En fazla larva miktarına beyin dokusunda rastlanılmıştır. Nekropsi 14. günde karaciğer-beyin dokusu arasında larva sayısında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,01$) (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Pozitif kontrol gruplarında dokulardaki larva sayılarına göre günler arası fark (Kruskal-Wallis testi) sonuçları.

“Pozitif kontrol gruplarında farklı dokular arasında farklı nekropsi günlerinde larva görülme düzeyleri aynıdır” hipotezi bağımsız örneklerde Kruskal-Wallis testi ile reddedilmiştir ($p < 0,001$). Hasta hayvanlarda karaciğer dokusunda larva sayılarında günler arasındaki farklılık, ilk iki günde benzerlik gösterirken, sonraki günlerde anlamlı derecede azalma görülmüştür ($p < 0,001$). Akciğer dokusunda; 2 ile 4. gün arası anlamlı derecede artış gösterirken, 4.-14. gün arasında da anlamlı şekilde azalma görülmüştür. Beyinde larva sayısında günlere bağlı olarak giderek artan şekilde bir farklılık saptanmıştır. Ön ve arka bacak kaslarındaki larvalar birbirine paralel şekilde gözükmüş, nekropsi 7. ve 14. günlerde ikinci güne göre artış göstermiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Dokularda farklı nekropsi günlerinde saptanan larva sayılarının Kruskal-Wallis testi ile analizi.

4. TARTIŞMA

Çalışmada, enfektif dönem *T. canis* yumurtaları ile 24 adet dişi BALB/c farede VLM oluşturulmuş, enfeksiyon sonrası 2., 4., 7. ve 14. günlerde nekropsiler yapılmıştır. Farelerin karaciğer, akciğer, beyin, ön bacak ve arka bacak kas dokularında larva tespiti; çalışmanın güvenilirliği bakımından konvansiyonel yöntemle (pepsin-HCl ile doku digesyonu) desteklenmiş, parazitin bu dokularda moleküler olarak teşhis edilmesi hedeflenmiştir.

BALB/c fareler, *T. canis* enfeksiyonu için oldukça duyarlı hayvanlardır. BALB/c, C3H, C57B1, DBA ve NMRI farelerinin toxocarosis enfeksiyonunda en düşük morbidite ve mortalite değerlerini BALB/c fareler vermiştir. Ayrıca, bazı çalışmalarda da BALB/c farelerin toxocarosis için en iyi hayvan modeli olduğu belirtilmiştir (Akao, 2006 ve Strube ve ark., 2013). Sendromun konak tarafından iyi tolere edilmesi, larvaların konak dokusunda iyi tutunması gibi nedenler doğrultusunda tez çalışmamızda BALB/c fareler kullanılmıştır.

Yapılan araştırmalarda, farelerde *T. canis* ile VLM çeşitli sayılarda (6-5000 arasında) enfektif dönem larvalı yumurta ile oluşturulmuştur (Abo-Shehada ve Herbert, 1984/85; Bisseru, 1969; Burren, 1968; Burren, 1971; Ollero ve ark., 2008; Oshima, 1961; Sinha, 1966; Sprent, 1955 ve Sprent, 1958). Çalışmamızda kaynaklara göre farelerin 2000 enfektif dönem larvalı yumurta ile enfekte edilmesi öngörülmüş, ancak yapılan ön çalışmalarda BALB/c farelerin bu sayıda enfektif dönem larvalı *T. canis* yumurtasıyla oluşturulan enfeksiyonu sonrası, 2-3 gün içerisinde toplu ölümler görülmüş ve alınan nekropsi raporuna göre ölümün oluşturulan enfeksiyondan kaynaklandığı bildirilmiştir (Ek-2). Enfeksiyon dozu 1000 enfektif dönem larvalı yumurtaya düşürülmüş ve günlere göre nekropsiler tamamlanmıştır.

Nekropsi günleri parazitin biyolojisi göz önüne alınarak saptanmıştır. Karaciğer dokusunda ilk 24 saat içerisinde (Bisseru, 1969 ve Burren, 1968), akciğer

dokusunda ilk üç gün içinde ve en yüksek oranda ise 6. günde (Burren, 1968 ve Sinha, 1966), beyin dokusunda ise 2-3. günden itibaren larvalar görülmüş (Bisseru, 1969; Burren, 1968; Burren, 1971; Sinha, 1966; Sprent, 1958 ve Ollero ve ark., 2008), ayrıca larvaların 7. günde görülmeye başladığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Abo-Shehada ve Herbert, 1984/85 ve Oshimo, 1961). Kas dokularında 1-2. günlerde (Burren, 1968; Sprent, 1958; Abo-Shehada ve Herbert, 1984/85), ayrıca 3-7. günlerde de görülmeye başladığı bildirilmiştir (Abo-Shehada ve Herbert, 1984/85 ve Oshimo, 1961). Çalışmamız sonucu nekropside günlere göre organ ve dokularda görülen larvalar yukarıdaki araştırmalarla orantılı bulunmuş, karaciğer ve akciğer dokusundaki larvalar 2. günde görülmeye başlanmış, takiben tüm nekropsi günlerinde görülmüştür. Ancak parazitin biyolojisi gereği ortalama larva sayıları günlere göre giderek azalmıştır. Beyin dokusunda larvalar 4. günden itibaren görülmeye başlamış, en yüksek ortalama değer 7. günde yapılan nekropside kaydedilmiştir. Larvalar bacak kaslarında 4. gün nekropsisinden itibaren görülmeye başlanmış, en yüksek ortalama değer ön bacak kası için 7. günde saptanmıştır. Arka bacak kaslarında ise ortalama larva sayısı günlere göre giderek artan bir korelasyon oluşturmuştur. Ön bacak ve arka bacak kasları arasında ortalama larva sayıları arasında farklılık görülmüş, ön bacak kaslarında daha fazla sayıda larva gözlemlenmiştir.

Dokulardaki larvaların açığa çıkması için kullanılan enzimlerin de sonuçlar üzerinde etkisi olduğu düşünülmekte, Sprent (1952) bir çalışmada farelerde *T. canis* yumurtası ile oluşturduğu enfeksiyonda doku digesyonunu, enfeksiyon sonrası 8. güne kadar tripsinle, sonraki günlerde ise pepsin ile yapmıştır. Enfeksiyon sonrası 8. günden itibaren larvaların dokuda kapsüle olduğunu, kapsüle larvalarda tripsin enziminin digesyonunda işe yaramadığını (larvaların yeterli sayıda saptanamadığını), pepsin ile de larvaların rahatlıkla görüldüğünü kaydetmiştir. Bu tez çalışmasında oluşturulan enfeksiyonda nekropsi günleri enfeksiyon sonrası 2., 4., 7. ve 14. günler seçilmiş ve konvansiyonel teşhis için dokular pepsin enzimi ile digesyona tabi tutulmuştur. *Toxocara canis* larvaları beyin dokusunda kapsüle olmamakta ve doku içerisinde hareket etmektedir (Burren, 1968; Roberts ve Janovy, 2006 ve Sprent, 1955). Larvaların bu özellikleri dolayısıyla beyin dokusundaki örneklerle ezme

preperat tekniği uygulanmıştır. Yapılan değerlendirmelerde kullanılan bu tekniklerin beklenen performansta sonuç verdiği gözlenmiş, larvalar rahatlıkla sayılmıştır.

Moleküler tanı yöntemleri son yıllarda birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tekniklerin en önemli olumsuzluklarının başında, örnekten elde edilen DNA ya da RNA konsantrasyonuna bağlı olarak karşılaşılan hatalı negatiflikler gelmektedir. Jacobs ve ark., (1997) yaptıkları çalışmada elde ettikleri örneklerin DNA konsantrasyonunu ölçerek, teşhis edilebilen en düşük *T. canis* DNA'sının Tcan-NC2 primer seti için 0,1-0,5 ng/μl olduğunu kaydederken, Li ve ark. (2007) *T. canis* olarak teşhis edilen her spesifik PCR aşamasında en küçük DNA miktarının 0,14 ng olduğu bildirmiş, bu miktarın bir nematod larvasından daha az olduğunu (larvanın boyutuna göre değişmekle beraber yaklaşık olarak bir larva 200-1500 ng'dır) belirtmiştir. Ayrıca, Borecka ve ark. (2008) ilgili literatüre atfen enfeksiyon sonrası 3., 5., 7. ve 14. günlerde karaciğer dokusunda sırasıyla 0,8; 0,4; 0,09 ve 0,09 larvanın olduğunu kabul ederek, yöntemle birden az larvanın PCR ile teşhis edilebildiği kanısına varmıştır. Bu noktadan hareketle çalışmamızda tasarlanan PCR yönteminin sensitivitesi sorgulanmış, yukarıda belirtilen araştırmalarda hep istatistiki değerler göz önüne alınarak yöntemin sensitivitesi saptanmaya çalışılmıştır. Ancak bu çalışmada morula ve/veya enfektif dönem larvalı yumurtalar ardışık olarak 10 yumurtaya kadar porsiyonlanarak, PCR'ları yapılmıştır. Jel görüntülemeye 2 yumurta ve daha fazla sayıdaki yumurta örneklerinde istenen pozisyonda pozitif bantlar görülmüştür. Saptanan pozitif örneklerdeki DNA titreleri 5,1 ile 11,2 ng/μl arasında ölçülmüştür (Ek-4).

Çalışmamızda kullanılan primerler ATP sentetaz alt ünite 6 gen bölgesinden tasarlanmıştır. Wickramasinghe ve ark., (2009) tarafından yapılan bir çalışmada iki mitokondrial gen bölgesi; ATP sentetaz alt ünite 6 (ATP synthase subunit 6-ATPase 6) ve small subunit ribozomal RNA (12S rDNA) ve iki nükleer ribozomal gen; internal transcribed spacers 2 (ITS-2) ve large ribosomal subunit (28S) bölgesi amplifiye edilmiştir. Büyük bir gen bölgesi yerine farklı bölgelerdeki bu genomlar sayesinde genetik çeşitlilik karşılaştırılmıştır. ATP sentetaz alt ünite 6 geni sekanslarda *T. canis*, *T. vitulorum* ve *A. suum* G/T bakımından zengin bulunmuştur.

Çalışmada ATP sentetaz alt ünite 6'nın bu cinsteki türleri ayırt edebileceği, iyi korunmuş bölge olduğu ve moleküler filogenetik çalışmalar için de kullanışlı olduğu bildirilmiştir.

Tez çalışmamız için tasarlanan primer seti benzer moleküler çalışmalarda (Jacobs ve ark., 1997 ve Li ve ark., 2007) olduğu gibi kedi, köpek ve insan genomunda olabilecek reaktiviteleri (hatalı pozitifleri) önlemek amacıyla kontrol edilmiştir. Ancak her üç örneğin DNA'sını amplifiye etmemiştir. Aynı şekilde çalışmanın negatif kontrol grubu farelerinde de PCR sonuçları negatif bulunmuştur.

Araştırmalarda, kullanılan primer setleri kendilerine uyumlu olan askaritler dışında diğer askarit türleri ile reaksiyona alınmış, diğer askarit türleriyle uyumlu sonuçlar alınmamıştır (Jacobs ve ark., 1997 ve Li ve ark., 2007). Örnek olarak; İngiltere, Hollanda, Avusturalya, Malezya ve Çin'den elde edilen 107 adet kedi ve köpek askariti morfolojik olarak teşhis edilmiş, moleküler teşhis için de ITS-1, ITS-2 ve 5,8S bölgelerine uygun farklı primer setleri kullanılmıştır. Primerlerin spesifitelerini ölçmek amacıyla, primerlere özel askarit dışında diğer askaritlerle (*T. cati*, *T. canis*, *T. malaysiensis* ve *Toxascaris leonina* gibi) kontrol edilmiştir (Li ve ark., 2007). Başka bir çalışmada ise insan dokusunda rastlanabilecek üç askariti (*T. canis*, *T. cati* ve *T. leonina*) moleküler olarak ayırt edebilmek için ITS-2 bölgesine uyumlu primerler kullanılmış, her spesifik primer setleri diğer parazit örneklerinde negatif sonuç vermiştir (Jacobs ve ark., 1997). Bu tez çalışmasında da tasarladığımız primerlerin uygunluğu, diğer carnivor askaritlerinden *T. cati* ve *T. leonina* ile karşılaştırılmış, bu askaritlerle pozitifliğe rastlanmamıştır. Negatif sonuçlar *T. canis*'in bu primer setiyle spesifik teşhisinin yapılacağını düşündürmektedir.

İnsan dokusunda rastlanabilecek *T. canis*, *T. cati* ve *T. leonina*'yı moleküler olarak ayırt edebilmek için oluşturulan bir çalışmada, ITS-2 bölgesine uyumlu her spesifik primer diğer parazit örneklerinde negatif sonuç vermiş, elde edilen pozitif PCR ürünleri; Alu I, Hae III, Hinf I ya da Rsa I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesime tabi tutulmuştur. Hinf I enzimi, *Toxocara* sp. ile *T. leonina*'yı ayırt etmek

için kullanılmıştır. Rsa I enzimi ise, *T. cati* ile *T. canis*'i teşhis etmiş, *T. canis*'i 2 (250 ve 290 bp), *T. cati*'yi de 3 fragmente ayırmıştır (110-160-280 bp) (Jacobs ve ark., 1997). Bu çalışmada da *T. canis* pozitif sonuçları çoğaltılan bölgeye uygun olan Bbs I enzimi ile kesilmiş, kesim sonucu 2 fragment (47 ve 170 bp) oluşmuştur.

Çalışmada kullanılan yöntemler karşılaştırıldığında; nekropsi 2., 7. ve 14 . günlerde karaciğerde 4, akciğerde 3 örnekte pepsin-HCl doku digesyonu ile larva görülmüş, yapılan PCR'larında negatif sonuçlar alınmıştır. Ayrıca nekropsi 4. gününde ön bacakta 1 örnekte PCR negatifken, digesyon sonucu larva bulunmuştur. Moleküler teşhis için bu dokudan alınan ekstraksiyon örneğinde parazite ait bir parçanın bulunmadığı düşünülmektedir. Nekropsi 2. günde ön bacakta 1 örnekte PCR sonucu pozitifken, digesyonunda larvaya rastlanmamıştır. Aynı gün diğer ön bacak kas örneklerinde ise her iki yöntemde de sonuçlar negatif bulunmuştur. Nekropsi 2. günde karşılaşılan bu durum (larvanın görülmesi gereken dokuda zamanından önce moleküler olarak saptanması) dokuda larvaya ait bir DNA parçası olduğunu göstermektedir. Bazı araştırmacıların da (Burren, 1968; Sprent, 1958 ve Abo-Shehade ve Herbert, 1984/85) enfeksiyonun 1.-2. günlerinde larvaların kas dokusunda görüldüğünü kaydetmesi ile sonuçların bu tür çıkabileceği düşünülmektedir. 4., 7. ve 14. günlerdeki nekropsilerde arka bacak kaslarında 5 örnekte PCR sonucu pozitif bulunurken, digesyonda larvalara rastlanmamıştır. Digesyonu yapılan doku parçasında larva görülmezken, PCR'da pozitif sonuç alınması; PCR'ın dokudaki *T. canis*'in teşhisinde uygulanabilmesi açısından uygun bir yöntem olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca çalışmada digesyonu yapılan diğer örneklerde ve beyindeki ezme preperat örneklerinde her iki yöntemde (konvansiyonel ve moleküler) pozitif korelasyon olması PCR'ın VLM teşhisi için uygun bir yöntem olduğunu düşündürmektedir.

Bazı VLM hastalarının anamnezlerinde çiğ karaciğer tüketimi dikkati çekmekte, bu alışkanlık sendromun bulaşma yollarından birisini oluşturmaktadır. Bu bulaşma yolunu araştırmak amacıyla, yavru ve erişkin köpeklerle komşu olan 5 hindinin karaciğerinde moleküler olarak parazitlerin teşhis edilmesi planlanmış, 4 hindinin karaciğerindeki lezyonlarda nematod larvalarına mikroskopik olarak

rastlanırken, bu larvaların *T. canis* olduğu PCR ile tespit edilmiştir (Ishiwata ve ark., 2004). Kullanılan digesyon yöntemleri ile larvaların görüldüğü ancak uğraş ve zaman kaybı olduğu, ayrıca tam olmayan bir larva parçasının yöntem ile görülemeyeceği bildirilmiştir. Bu düşüncelerle yola çıkılarak PCR pozitif olup, dokuda larvaların görülmediği örneklerde bu durumun da olabileceği düşünülmektedir.

PCR sonuçlarını konvansiyonel bir testle karşılaştıran bir çalışmada Pinelli ve ark. (2013), *T. canis* yumurtası ile enfekte 1-2 ve 5-6 haftalık BALB/c farelerde enfeksiyon sonrası 60. günde, bronchoalveolar lavaj (BAL) yaparak akciğerdeki larvaların varlığını realtime PCR ile teşhis etmiş, akciğer dokusundaki larvalar konvansiyonel olarak Baermann Wetzell yöntemiyle sayılmıştır. DNA izolasyonu ise BAL'dan alınan hücre pelletlerinden yapılmıştır. 5-6 haftalık farelerin 2'si Nemo-PCR, 4'ü BAL ve bunlardan ikisinde de hem BAL hem PCR ile pozitif sonuç alınmıştır. 1-2 haftalık farelerin 4'ünde Nemo-PCR, 2'sinde BAL ile larvalar saptanmış, sadece 1 örnekte hem PCR hem BAL'da pozitif sonuç tespit edilmiştir. Larvalar farelerin 3'ünde BAL ile teşhis edilemese de PCR'da pozitif sonuç alınmıştır. Bazı örneklerde her iki yöntemle de sonuçlar aynıken, bazı örneklerde farklılık görülmektedir. PCR yöntemi ile *T. canis* larvalarının karaciğer dokusundaki teşhisini amaçlanan başka bir çalışmada, enfekte edilen 12 mongolian gerbil enfeksiyon sonrası 3., 5., 7. ve 14. günlerde sakrifiye edilmiş, yöntemle tüm deney grupları pozitif bulunmuştur (Borecka ve ark., 2008). Benzer günlerde yaptığımız nekropsilerde 4 farenin karaciğerinde konvansiyonel yöntemle larvaların bulunması, ancak PCR ile pozitif sonuç alınamaması dokuda larvaya ait herhangi bir parça bulunmamasından kaynaklandığı düşünülmekte, ayrıca çalışmalarda kullanılan ekstraksiyon kitlerinin farklılığından mı ya da manuplasyon mı kaynaklandığı da bilinmemektedir.

Moleküler yöntemlerle askaritler yumurta düzeyinde de (*T. canis* ve *T. cati*) teşhis edilmektedir (Borecka, 2004 ve Fogt-Wyrwas ve ark., 2007). Morfolojik olarak *T. cati* yumurtası olduğu teşhis edilen toprak örneklerinin hepsi PCR ile doğrulanmıştır. Bir örnekte ise mikroskopide hem *T. cati* hem de *T. canis* yumurtası bulunmuş, PCR ile sonuçlar teyit edilmiştir (Fogt-Wyrwas ve ark., 2007). Ayrıca

köpek dışkılarında *T. canis* ve *T. cati*'nin görüldüğünü örnekleyen başka bir çalışmada, ITS-2 bölgesine uyumlu primer setleri (*T. canis* için Tcan/NC2 ve *T. cati* için Tcat/NC2) kullanılarak saptanan 35 *Toxocara* sp. örneğinin 24'ünün (% 68,5) *T. canis*, 11'inin ise (% 31,5) *T. cati* olduğu teşhis edilmiştir. Elde edilen 11 amplikondan 3'ü sekansa gönderilerek, sonuçlar konfirme edilmiştir (Fahrion ve ark., 2011). Araştırma sonuçlarına göre dışkı muayeneleri sonucu teşhisin, *Toxocara* sp. olarak koyulması gerektiği ve moleküler teknikler ile daha doğru sonuca (kesin tür ayırımına) varılacağı düşünülmektedir. Ayrıca toprak örneklerindeki askarit yumurtalarının *T. canis* ve *T. cati* olarak ayırt edilmesi, insanlarda oluşabilecek enfeksiyonun yaygınlığını ve kimden kaynaklandığını ölçmektedir. Çalışmamızda deteksiyon sınırının saptanması amacıyla morulalı ve/veya larvalı *T. canis* yumurtalarıyla PCR'da pozitif sonuçlar alınması, tasarladığımız primerlerle oluşturduğumuz reaksiyonda dışkıda bulunan *Toxocara* sp. yumurtalarının da *T. canis* mi? olduğunu teşhis edebilecektir. Ayrıca insanlara bulaşma kaynağı olan toprak ve yıkanmamış çiğ sebze-meyve örneklerinde de teşhis edilen *Toxocara* sp. yumurtalarını *T. canis* olarak tanımlayabildiği düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada 6-8 haftalık 36 adet dişi BALB/c fare kullanılmış, enfeksiyon sonrası 2., 4., 7. ve 14. günlerde, enfektif dönem larva taşıyan *T. canis* yumurtaları ile enfekte edilen 6'şar pozitif kontrol grubu ve 3'er negatif kontrol grubu farenin nekropsileri yapılmıştır. Çalışma kapsamında farelerin karaciğer, akciğer, beyin, ön bacak ve arka bacak kaslarındaki larvalarının tespiti; çalışmanın güvenilirliği bakımından konvansiyonel yöntemle (pepsin-HCl doku digesyonu) saptanmış ve enfeksiyonun moleküler olarak teşhis edilmesi hedeflenmiştir. Moleküler tanıda, *T. canis*'in mtDNA ATP sentetaz alt ünite 6 gen bölgesi çoğaltılmıştır. Çalışma için tasarlanan primerlerin reaktivitesi; kedi ve köpeklerin diğer askaritleriyle (*T. cati* ve *T. leonina*), ayrıca köpek, kedi ve insan genomu ile de kontrol edilmiştir. Çalışmada PCR'ın pozitif sonuç verdiği en alt düzeydeki larvalı ve/veya morulalı yumurta sayısı 2 olarak belirlenmiştir. PCR sonrası oluşan ampikon (217 bp) Bbs-I enzimi ile kesime tabi tutulmuş, 47 ve 170 bp olacak şekilde iki fragment oluşmuştur. PCR'ın spesifite, sensitivite ve doğruluk oranları larvaların dokulardaki yerleşimine bağlı olarak hesaplanmıştır. Tüm dokularda testin spesifitesi % 100 bulunurken, karaciğer dokusunda sensitivite % 83,3 ve doğruluk oranı % 88,8; akciğer dokusunda sensitivite % 87,5 ve doğruluk oranı % 91,6 olarak kaydedilmiştir. Beyin, ön bacak ve arka bacak kas dokularında ise PCR sensitivitesi % 75 ve doğruluk oranı % 83,3 olarak hesaplanmıştır.

Enfeksiyon sonrası 2. gün nekropside; konvansiyonel yöntemde, tüm pozitif kontrol gruplarının karaciğer ve akciğer dokularında larvaya rastlanırken, bu dokulara ait PCR sonuçlarında karaciğer dokusunda tüm örnekler, akciğer dokusunda ise 4 örnek pozitif bulunmuştur. Beyin, ön ve arka bacak kaslarının digesyonunda larvaya rastlanmamış, ancak PCR'larında sadece bir ön bacak kas örneğinde ampikon oluştuğu gözlenmiştir.

Enfeksiyon sonrası 4. gün nekropsisinde; karaciğer, akciğer ve beyin dokularında tüm pozitif kontrol gruplarında konvansiyonel olarak larvalar teşhis edilirken, PCR'ları da pozitif saptanmıştır. Pepsin-HCl digesyonu ile arka bacak

kasında 3 örnek negatif bulunurken, bu örneklerin PCR sonuçları pozitif bulunmuştur. PCR’da 1 ön bacak kas örneği negatifken, aynı dokunun pepsin-HCl digesyonunda larvalar görülmüştür.

Enfeksiyon sonrası 7. gündeki nekropside, pepsin-HCl digesyonu sonucu pozitif kontrollerde sadece 1 arka bacak kas dokusu örneği negatifken, diğer dokularda (karaciğer, akciğer, beyin ve ön bacak kası) tüm örneklerde *T. canis* larvalarına rastlanmıştır. Larva görülmeyen örnek PCR’da pozitif sonuç vermiştir. Ancak digesyonda larva görülmesine rağmen PCR ile negatif sonuç veren bir karaciğer örneği de kaydedilmiştir.

Enfeksiyon sonrası 14. gün nekropside, pepsin-HCl ile pozitif kontrol grubunda sadece 1 arka bacak kas örneğinde larva bulunmazken, diğer dokularda (karaciğer, akciğer, beyin ve ön bacak kası) tüm örneklerde *T. canis* larvalarına rastlanmıştır. Örneklerin PCR’ları sonucu karaciğer dokusunda 3 örnek, akciğer dokusunda ise 5 örnek pozitif bulunmuştur. Pozitif kontrol gruplarının hepsinde beyin, ön bacak ve arka bacak kaslarında PCR ile pozitif sonuçlar alınmıştır.

Enfekte edilmeyen negatif kontrol grupları tüm nekropsisi günlerinde her iki yöntemle de negatif bulunmuştur.

Bu çalışmada uygulanan alternatif teşhis yöntemi, sadece BALB/c fare dokularında kullanılabilmiş, VLM şüpheli insan dokularında da denenmesi gerektiği, ve biyopsi sonrası sadece histopatolojik bakısı yapılan dokularda bu yöntem ile VLM varlığı *T. canis*’in tür bazında saptanabileceği düşünülmektedir. Çalışma, konusu ve içeriği bakımından daha ileri çalışmalara basamak oluşturabilir niteliktedir.

Ayrıca veteriner hekimlikte; dişi köpekler yavruyken aldıkları *T. canis* enfeksiyonunu, gebe kaldıklarında doğacak yavrularına parazitin biyolojisi gereği prenatal yolla peşpeşe üç laktasyon boyunca aktarmaktadır. Köpekler her batında ortalama 5 yavru doğurmakta ve doğan her enfektif dişi köpek kendi gebeliklerinde

de *T. canis*'i doğacak yavrularına taşımaktadır. Parazitin yaygınlığı açısından handikap olan bu durumu önlemek amacıyla çeşitli tedavi protokolleri benimsenmiş, gebelikten itibaren yapılan antelmentik uygulamaları ile enfeksiyonun önlediği düşünülmüştür. Ancak gebelik esnasında alınabilecek yavru kesesi sıvısında PCR ile *T. canis* larvalarının teşhis edilebilmesi ile her ne kadar kullanılan antelmentik teratojenik olmadığı düşünülse de kesin olamayan bu kanının, ayrıca fazladan antelmentik uygulamalarının önüne geçebileceği ve bu tez çalışmasının bu konuda yeni araştırmaların yapılabilmesi için bir basamak olabileceği düşünülmektedir.

ÖZET

***Toxocara canis* ile Deneysel Enfekte Farelerde Visceral Larva Migrans'ın PCR ile Teşhisi**

Çalışmada 6-8 haftalık 36 adet dişi BALB/c fare kullanıldı. Enfekte edilen (pozitif kontrol) grup farelere 1000 adet enfektif dönem larvalı yumurta verilirken, enfekte olmayan (negatif kontrol) grup farelere % 0,9'luk izotonik NaCl solüsyonu verildi. Nekropsi günleri, larvaların organlara ulaştıkları ve göçün tamamlandığı günler dikkate alınarak enfeksiyonun 2., 4., 7. ve 14. günleri olarak seçildi. Çalışmada farelerin karaciğer, akciğer, beyin, ön bacak ve arka bacak kasları kullanıldı. Larvaların tespiti için örneklerin bir kısmı pepsin enzimi yardımıyla organ sindirilmesine tabi tutulurken, kalan kısımdaki organlar *Toxocara canis*'in mitokondrial DNA ATP sentetaz alt ünite 6 gen bölgesini çoğaltmak suretiyle moleküler yöntemler kullanıldı. Araştırmada kullanılan dizinler çalışma kapsamında tasarlandı. Tasarlanan primerlerin kontrolü amaçlı erişkin *Toxocara cati* ve *Toxascaris leonina* ve köpek, kedi, insan genomu ile reaksiyona sokuldu ancak, herhangi bir amplifikasyon elde edilmedi. PCR'ın çalışabildiği en alt düzeydeki larva/yumurta sayısı ise 2 olarak saptandı. PCR sonrası pozitif bulunan amplikonların spesifikliğini tespit etmek amacıyla Bbs-I enzimi ile kesim yapıldı. Enzim, amplikonu bir yerinden kesti (170 bp ve 47 bp iki ürün oluştu).

Polymerase Chain Reaction ile nekropsi 2. gün karaciğer dokusunda tüm enfekte grup örnekleri pozitif bulunurken, akciğer dokusunda 4 örnek pozitif, ön bacak kasında ise sadece 1 örnek pozitif saptandı. Nekropsi 4. günde karaciğer, akciğer, beyin ve arka bacak kaslarındaki tüm enfekte gruplar pozitif, ön bacak kas örneklerinden sadece biri negatifti. 7. gün nekropsisinde; akciğer, beyin, ön bacak ve arka bacak kasları enfekte grupları pozitif bulunurken, karaciğer dokusunda sadece 1 örnek negatif saptandı. Nekropsi 14. gün, enfekte grupların karaciğer dokusunda 3 örnek pozitif bulunurken, akciğer dokusunda ise 5 örnek pozitif kaydedildi. Beyin, ön bacak ve arka bacak kası enfekte gruplarının hepsinde pozitif bantlar görüldü. Tüm nekropsi günlerinin kontrol grupları ise negatif saptandı.

Doku türüne göre PCR sonuçlarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi, dokular arasında larva sayıları arasındaki farklılık ve farklı nekropsi günlerinde aynı dokunun bağımsız günlerindeki larva sayılarının değişimi Kruskal-Wallis testi, tüm grupların farklı dokularındaki PCR sonucu ile larva görülme sıklıkları arasındaki farklılık Ki-kare testi ile incelendi.

Anahtar Sözcükler: BALB/c Fare, PCR-RFLP, *Toxocara canis*, Visceral Larva Migrans

SUMMARY

PCR Detection of Visceral Larvae Migrans in Mice Experimentally Infected with *Toxocara canis*

Thirty six, 6-8 weeks old female BALB/c mice were used in the study. Infection was performed by oral administration of 1000 embryonated eggs per mouse, the uninfected mice received oral administration of isotonic sodium chloride saline solution 0,9 %. Infected and uninfected group were euthanized post infection 2.,4.,7. and 14. days. *Toxocara canis* larvae were recovered from liver, lungs, brain and muscles of front and hind limbs with pepsin-HCl digestion method and PCR. A new set of primer was design to mtDNA of ATPase synthase subunit 6. The primer sets were checked with *Toxocara cati*, *Toxascaris leonina* and dog, cat, human gDNA and no product was amplified. The detection limit of DNA detectable for each specific PCR assay were 2 embryonated eggs. Purified ATPase 6 PCR products were digested with Bbs-I restriction endonuclease enzyme (170 bp and 47 bp).

Using Polymerase Chain Reaction; second day post infection, liver of all groups were positive at necropsy. In 4 of them lungs were positive and only in one mouse muscles of front limbs were positive. In the necropsies of fourth day post infection, liver, lungs, brain and muscles of hind limbs were positive in all groups; muscles of front limbs were negative in only one mouse. In necropsies done seven days after infection; lungs, brain and muscles of front and hind limbs were found positive in all infected groups, but liver was negative in only one case. In necropsies done 14 days after infection, while liver was found negative in only one mouse; lungs were positive in 5 mice. Brain and muscles of front and hind limbs were positive in all infected groups. All uninfected groups were negative.

PCR and pepsin-HCl techniques results were analysed with Mann-Whitney U, Kruskal-Wallis and Chi-square tests.

Keywords: BALB/c, PCR-RFLP, *Toxocara canis*, Visceral Larvae Migrans

KAYNAKLAR

- ABO-SHEHADA MN, HERBERT IV (1984/85). The migration of larval *Toxocara canis* in mice II. Post-intestinal migration in primary infections. *Vet Parasitol* **17**: 75-83.
- ADANIR R, TASCI F (2013). Prevalence of helminth eggs in raw vegetables consumed in Burdur, Turkey. *Food Control* **31**: 482-484.
- AKAO N (2006). Critical Assesment of Existing and Novel Model Systems of Toxocariasis. In: *Toxocara the enigmatic parasite*, Ed.: Holland, C.V., Smith, H.V., CABI Publishing, Oxfordshire. 74-85.
- AKDEMİR C (2010). Visceral larva migrans among children in Kütahya (Turkey) and an evolution of playgrounds for *T. canis* eggs. *Turk J Pediatr* **52**: 158-162.
- AKYOL A, BICEROL B, ERTUG S, ERTABAKLAR H, KIYLIOGLU N (2007). Epilepsy and seropositivity rates of *Toxocara canis* and *Toxoplasma gondii*. *Seizure* **16**: 233-237.
- ALONSO JM, BOJANICH MVL, CHAMORRO M, GORODNER JO (2000). *Toxocara* seroprevalence in children from subtropical city in Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **42(4)**: 235-237.
- AL-ABI MNS, KAPEL CMO, JOHANSÅN A, ESPERSEN MC, KOCH J, WILLESEN JL (2013). A coprological investigation of gastrointestinal and cardiopulmonary parasites in hunting dogs in Denmark. *Vet Parasitol* **196**: 366-372.
- ALVARADO-ESQUIVEL C, HERNÁNDEZ-TINOCO J, SÁNCHEZ-ANGUIANO LF (2014). *Toxocara* infection in gardeners: a case control seroprevalence study. *Asian Pac J Trop Med* **7(Suppl 1)**: 79-81.
- AMARAL HLC, RASSIER GL, PEPE MS, GALLINA T, VILLELA MM, NOBRE MO, SCAINI CJ, BERNE MEA (2010). Presence of *Toxocara canis* eggs on the hair of dogs: A risk factor for visceral larva migrans. *Vet Parasitol* **174(1-2)**: 115-118.
- ANDERSON RC (2000). Nematode Parasites of Vertebrates Their Development and Transmission. CABI Publishing, UK. 303-307.
- ANTOLOVA D, REITEROVA K, MITERPAKOVA M, STANKO M, DUBINSKY P (2004). Circulation of *Toxocara* spp. in suburban and rural ecosystems in the Slovak Republic. *Vet Parasitol* **126(3)**: 317-324.
- ARAUJO P (1972). Observacoes pertinentes as priméiras ecdises de larvas de *Ascaris lumbricoides*, *A. suum* e *Toxocara canis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **14(2)**: 83-90.

- ATAŞ AD, ÖZÇELİK S, SAYGI G (1997). Sivas sokak köpeklerinde görülen helmint türleri, bunların yayılışı ve halk sağlığı açısından önemi. *Türkiye Parazitol Derg* **21(3)**: 305-309.
- AVCIOGLU H, BURGU A (2008). Seasonal prevalence of *Toxocara* ova in soil samples from public parks in Ankara, Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis* **8(3)**: 345-350.
- AVCIOGLU H, BALKAYA I (2011). The relationship of public park accessibility to dogs to the presence of *Toxocara* species ova in the soil. *Vector Borne Zoonotic Dis* **11(2)**: 177-180.
- AVCIOGLU H, SOYKAN E, TARAKCI U (2011). Control of helminth contamination of raw vegetables by washing. *Vector Borne Zoonotic Dis* **11(2)**: 189-191.
- AYÇİÇEK H, SARİMEHMETOĞLU HO, TANYÜKSEL M, ÖZYURT M, GÜN H (1998). Ankara sokak köpeklerinde görülen bağırsak helmintlerinin yayılışı ve bunların halk sağlığı bakımından önemi. *Türkiye Parazitol Derg* **22(2)**: 156-158.
- AYDENİZÖZ M (1997). Konya yöresi köpeklerinde helmintolojik araştırmalar. *Türkiye Parazitol Derg* **21(4)**: 429-434.
- AYDENİZÖZ ÖZKAYHAN M (2006). Soil contamination with ascarid eggs in playgrounds in Kirikkale, Turkey. *J Helminthol* **80**: 15-18.
- AYDENİZÖZ-ÖZKAYHAN M, YAĞCI BB, ERAT S (2008). The investigation of *Toxocara canis* eggs in coats of different dog breeds as a potential transmission route in human toxocariasis. *Vet Parasitol* **152**: 94-100.
- BAJER A, BEDNARSKA M, RODO A (2011). Risk factors and control of intestinal parasite infections in sled dogs in Poland. *Vet Parasitol* **175**: 343-350.
- BALKAYA I, AVCIOGLU H (2011). Gastrointestinal helminths detected by coprological examination in stray dogs in the Erzurum province-Turkey. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* **17(Suppl-A)**: 43-46.
- BEAVER PC, SNYDER CH, CARRERA GM, DENT JH, LAFFERTY JW (1952). Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans: report of three cases. *Pediatrics* **9(1)**: 7-18.
- BERKİN Ş, ALÇIĞIR G (2007). Nekropsi Yöntem. Medisan, Ankara. 31-63.
- BISSERU B (1969). Studies on the liver, lung, brain and blood of experimental animals infected with *Toxocara canis*. *J Helminthol* **43(3/4)**: 267-272.
- BLASZKOWSKA J, WOJCIK A, KURNATOWSKI P, SWABE K (2013). Geohelminth egg contamination of children's play areas in city of Lodz (Poland). *Vet Parasitol* **192**: 228-233.

- BORECKA A (2004). Differentiation of *Toxocara* spp. eggs isolated from the soil by the PCR linked RFLP method. *Helminthologia* **41(4)**: 185-187.
- BORECKA A, GAWOR J, ZIEBA F (2013). A survey of intestinal helminths in wild carnivores from the tatra national park, southern Poland. *Ann Parasitol* **59(4)**: 169-172.
- BORECKA A, GAWOR J, NIEDWOROK M, SORDYL B (2008). Detection of *Toxocara canis* larvae by PCR in the liver of experimentally infected mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Helminthologia* **45(3)**: 147-149.
- BOWMAN DD (2014). Georgis' Parasitology for Veterinarians. Elsevier Saunders, Missouri. 200-206.
- BOZKURT Ö, YILDIRIM A, İNCİ A, ÇİLOĞLU A, BİŞKİN Z, DÜZLÜ Ö (2012). Kayseri ili parklarında bulunan oyun alanlarının askarit türleri ile kontaminasyonunun parazitolojik ve moleküler yöntemlerle araştırılması. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* **18 (Suppl-A)**: 175-180.
- BRIDGER KE, WHITNEY H (2009). Gastrointestinal parasites in dogs from the island of st. Pierre off the south coast of Newfoundland. *Vet Parasitol* **162**: 167-170.
- BROCHIER B, DE BLANDER H, HANOSSET R, BERKVENS D, LOSSON B, SAEGERMAN C (2007). *Echinococcus multilocularis* and *Toxocara canis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) in Brussels, Belgium. *Prev Vet Med* **80(1)**: 65-73.
- BRUNASKA M, DUBINSKY P, REITEROVA K (1995). *Toxocara canis*: ultrastructural aspects of larval moulting in the maturing eggs. *Int J Parasitol* **25(6)**: 683-690.
- BUDAK S, SERMET İ, ÜNER A (1986). İzmir ve civarındaki sokak köpeklerinde askarid prevalansı. *Türkiye Parazit Derg* **9(1-2)**: 57-65.
- BURREN CH (1968). Experimental toxocariasis I. some observations and histopathology of the migration of *Toxocara canis* larvae in mouse. *Z F Parasitenkunde* **30**: 152-161.
- BURREN CH (1971). The distribution of *Toxocara* larvae in the central nervous system of the mouse. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **65(4)**: 450-453.
- BÜYÜKBABA Ö, ÖZKAN E, BÜGET E (1996). *Toxocariasis canis* ve çocuklardaki seroprevalansının ELISA ile araştırılması. *İnfeksiyon Derg* **10(1)**: 7-11.
- BWALYA EC, NALUBAMBA KS, HANKONGA C, NAMANGALA B (2011). Prevalence of canine gastrointestinal helminths in urban Lusaka and rural Katete districts of Zambia. *Prev Vet Med* **100**: 252-255.

- CHANDRASHEKHARA SH, SHARMA R, BAGH S, GARG P (2010). Hepatic visceral larva migrans due to *Toxocara canis*. *Gastroen Clin Biol* **34**: 573-574.
- CHATTHA MA, ASLAM A, REHMAN ZU, KHAN JA, AVAIS M (2009). Prevalence of *Toxocara canis* infection in dogs and its effects on various blood parameters in Lahore (Pakistan). *J Anim Plant Sci* **19(2)**: 71-73.
- ÇERÇİ H (1992). Ankara ili Elmadağ ilçesi kırsal yöre köpeklerinde görülen mide-bağırsak helmintlerinin yayılışı ve insan sağlığı yönünden önemi. *Türkiye Parazitoloj Derg* **16(1)**: 59-67.
- DAI RS, LI ZY, LI F, LIU DX, LIU W, LIU GH, HE SW, TAN MY, LIN RQ, LIU Y, ZHU XQ (2009). Severe infection of adult dogs with helminths in hunan province, China poses significant public health concern. *Vet Parasitol* **160**: 348-350.
- DARYANI A, SHARIF M, AMOUEI A, GLOHAMI S (2009). Prevalence of *Toxocara canis* in stray dogs in northern Iran. *Pakistan J Biol Sci* **12(14)**: 1031-1035.
- DAS S, ALIM MA, SIKDER S, GUPTA AD, MASUDUZZAMAN M (2012). Prevalence and worm load of enteric helminthiasis in stray dogs of Chittagong Metropolitan, Bangladesh. *YYU Vet Fak Derg* **23(3)**: 141-145.
- DEPLAZES P, van KNAPEN F, SCHWEIGER A, OVERGAAUW PAM (2011). Role of pet dogs and cats in the transmission of helminthic zoonoses in Europe, with a focus on echinococcosis and toxocarosis. *Vet Parasitol* **182**: 41-53.
- DESPOMMIER D (2003). Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology and molecular aspects. *Clin Microbiol Rev* **16(2)**: 265-272.
- DEVERA R, BLANCO Y, HERNANDEZ H, SIMOES D (2008). *Toxocara* spp. and other helminths in squares and parks of ciudad bolivar, Bolivar State (Venezuela). *Enferm Infecc Microbiol Clin* **26(1)**: 23-26.
- DEVOY-KEEGAN J, HOLLAND CV (2010). Contamination of the hair of owned dogs with the eggs of *Toxocara* spp.. *Vet Parasitol* **173**: 161-164.
- DOĞAN N, DİNLEYİCİ EÇ, BOR Ö, TÖZ SÖ, ÖZBEL Y (2007). Seroepidemiological survey for *Toxocara canis* infection in the Northwestern part of Turkey. *Türkiye Parazitoloj Derg* **31(4)**: 288-291.
- DOĞAN M, AÇIKGÖZ M, SAL E, KAYA A, ARSLAN Ş (2009). Toksokariasis: Bir vaka takdimi. *Çocuk Sağ Hast Derg* **52**: 33-35.
- DOĞANAY A (1983). Ankara köpeklerinde görülen helmint türleri, bunların yayılışı halk sağlığı yönünden önemi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* **30(4)**: 550-561.

- DOĞANAY A, ÖGE S (1993). The prevalence of ascariasis in stray dogs in Ankara. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* **40(4)**: 552-562.
- DUBNA S, LANGROVA I, NAPRAVNIC J, JANKOVSKA I, VADIEJCH J, PEKAR S, FECHTNER J (2007). The prevalence of intestinal parasites in dogs from Prague, rural areas, and shelters of the Czech Republic. *Vet Parasitol* **145**: 120-128.
- DYBING NA, FLEMING PA, ADAMS PJ (2013). Environmental conditions predict helminth prevalence in red foxes in western Australia. *Int J Parasitol Parasites Wildl* **2**: 165-172.
- ECKERT J, FRIEDHOFF KT, ZAHNER H, DEPLAZES P (2008). Lehrbuch Der Parasitologie Für Die Tiermedizin. Enke verlag, Stuttgart. 317-320.
- EL SAID SAID D (2012). Detection of parasites in commonly consumed raw vegetables. *Alexandria J Med* **48**: 345-352.
- EL-TRAS WF, HOLT HR, TAYEL AA (2011). Risk of *Toxocara canis* eggs in stray and domestic dog hair in Egypt. *Vet Parasitol* **178(3-4)**: 319-323.
- ERTÜRK E, TANZER F (1973). 1961-1972 yılları arasında Ankara ve yöresinde köpeklerde görülen hastalık olaylarına kısa bir bakış. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* **20(2-3)**: 277-280.
- FAHRION AS, SCHNYDER M, WICHERT B, DEPLAZES P (2011). *Toxocara* eggs shed by dogs and cats and their molecular and morphometric species-specific identification: is the finding of *T. cati* eggs shed by dogs of epidemiological relevance?. *Vet Parasitol* **177**: 186-189.
- FAN CK, HOLLAND CV, LOXTON K, BARGHOUGH U (2015). Cerebral toxocariasis: silent progression to neurodegenerative disorders? *Clin Microbiol Rev* **28(3)**: 664-686.
- FAN CK, LIAO W, KAO TC, LI MH, DU WY, SU KE (2005). Seroepidemiology of *Toxocara canis* infection among aboriginal schoolchildren in the mountainous areas of north-eastern Taiwan. *Annals Trop Med Parasitol* **99(6)**: 593-600.
- FILLAUX J, MAGNAVAL JF (2013). Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Vet Parasitol* **193**: 327-336.
- FOGT-WYRWAS RF, JAROSZ W, MIZGAJSKA-WIKTOR H (2007). Utilizing a polymerase chain reaction method for the detection of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs in soil. *J Helminthol* **81**: 75-78.
- GATES MC, NOLAN T (2009). Endoparasite prevalence and recurrence across different age groups of dogs and cats. *Vet Parasitol* **166**: 153-158.

- GASSER RB, ZHU XQ, HU M, JACOBS DE, CHILTON NB (2006). Molecular Genetic Characterization of Members of the Genus *Toxocara*-Taxonomic, Population Genetic and Epidemiological Considerations. In: *Toxocara the enigmatic parasite*, Ed.: Holland, C.V., Smith, H.V., CABI Publishing, Oxfordshire. 18-31.
- GICIK Y, KARA M, SARI B, KILIÇ K, ARSLAN MÖ (2009). Intestinal parasites of red foxes (*Vulpes vulpes*) and their zoonotic importance for humans in Kars province. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* **15(1)**: 135-140.
- GINGRICH EN, SCORZA AV, CLIFFORD EL, OLEA-POPELKA FJ, LAPPIN MR (2010). Intestinal parasites of dogs on the Galapagos Islands. *Vet Parasitol* **169**: 404-407.
- GORGULU A, ALBAYRAK BS, GORGULU E, TURAL O (2006). Postoperative cerebral abscess formation caused by *Toxocara canis* in meningioma cavity. *J Neuro-Oncol* **77**: 325-326.
- GÜÇLÜ F, AYDENİZÖZ M (1995). Konya’da köpeklerde dışkı bakılarına göre parazitlerin yayılışı. *Türkiye Parazitol Derg* **19(4)**: 550-556.
- GÜÇLÜ F, AYDENİZÖZ M (1998). Çocuk parklarındaki kumların köpek ve kedi helminti yumurtaları ile kontaminasyonunun tespiti. *Türkiye Parazitol Derg* **22(2)**: 194-198.
- GÜNGÖR Ç, ÇİFTÇİ E, ARAL AKARSU G (1999). Nedeni belirlenemeyen karın ağrısı şikayeti olan çocuklarda *Toxocara* antikorı prevalansı. *Türkiye Parazitol Derg* **23(1)**: 24-27.
- GÜRALP N (1957). Köpek ve kedi askaritlerinin tedavisinde piperazine adipate’la yaptığımız deneyler ve aldığımız sonuçlar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* **4(1-2)**: 42-51.
- GÜRALP N (1981). Helmintoloji. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara. 428-437.
- GÜRALP N, DİNÇER Ş, KEMER R, CANTORAY R, TAŞAN E (1977). Elazığ yöresi köpeklerinde görülen gastro-intestinal helmint türleriyle bunların yayılış oranı ve halk sağlığı yönünden önemleri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* **24(2)**: 241-249.
- GÜREL FS, ERTUĞ S, OKYAY P (2005). Prevalence of *Toxocara* spp. eggs in public parks of the city of Aydın, Turkey. *Türkiye Parazitol Derg* **29(3)**: 177-179.
- GYANG PV, AKINWALEC OP, LEED YL, CHUANGA TW, OROKE AB, AJIBAYEE O, LIAOA CW, CHENA PC, CHOUA CM, HUANGA, YC, BARGHOUTH U, FANA CK (2015). Seroprevalence, disease awareness, and risk factors for *Toxocara canis* infection among primary schoolchildren in Makoko, an urban slumcommunity in Nigeria. *Acta Trop* **146**: 135-140.
- HUNT PW, LELLO J (2012). How to make DNA count: DNA-based diagnostic tools in veterinary parasitology. *Vet Parasitol* **186**: 101-108.

- ISHIWATA K, SHINOHARA A, YAGI K, HORII Y, TSUCHIYA K, NAWA Y (2004). Identification of tissue-embedded ascarid larvae by ribosomal DNA sequencing. *Parasitol Res* **92**: 50-52.
- İNAN M, SAKRU N, VATANSEVER U, BİLGİ S (2006). Visceral larva migrans presenting as acute abdomen in a child. *J Pediatr Surg* **41**: E7-E9.
- JACOBS DE, ZHU X, GASSER RB, CHILTON NB (1997). PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat. *Acta Trop* **68**: 191-200.
- JAROSZ W, MIZGAJSKA-WIKTOR H, KIRWAN P, KONARSKI J, RYCHLICKI W, WAWRZYŃIAK G (2010). Developmental age, physical fitness and *Toxocara* seroprevalence amongst lower-secondary students living in rural areas contaminated with eggs. *Parasitology* **137**(1): 53-63.
- KAPLAN M, KALKAN A, HOSOGLU S, KUK S, ÖZDEN M, DEMİRDAG K, OZDARENDELİ A (2004). The frequency of *Toxocara* infection in mental retarded children. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**(2): 121-125.
- KAPLAN M, KALKAN A, KUK S, DEMİRDAG K, OZDEN M, KILIC SS (2008). *Toxocara* seroprevalence in schizophrenic patients in Turkey. *Yonsei Med J* **49**(2): 224-229.
- KASSAI T (1999). Veterinary Helminthology. Butterworth-Heinemann, Oxford. 101-108.
- KHADEM VATAN S, ABDIZADEHB R, TAVALLA M (2014). Molecular characterization of *Toxocara* spp. from soil of public areas in Ahvaz southwestern Iran. *Acta Trop* **135**: 50-54.
- KIM YH, HUH S (2005). Prevalence of *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina* and *Dirofilaria immitis* in dogs in Chuncheon, Korea (2004). *Korean J Parasitol* **43**(2): 65-67.
- KORKMAZ M, YILMAZ M, ÜNER A, ALTINTAŞ N (2000). İzmir sokak köpeklerinde *Toxocara canis* görülme sıklığı. *Türkiye Parazitol Derg* **24**(2): 211-213.
- KOUTZ FR, GROVES HF, SCOTHORN MW (1966). The prenatal migration of *Toxocara canis* larvae and their relationship to infection in pregnant bitches and pups. *Am J Vet Res* **27**(118): 789-795.
- KOZAN E, GONENC B, SARİMEHMETOĞLU O, AYCİCEK H (2005). Prevalance of helminth eggs on raw vegetables used for salads. *Food Control* **16**: 239-242.
- KOZAN E, KIRCALI SEVİMLİ F, BİRDANE FM (2007). Afyonkarahisar ve Eskişehir illerindeki sokak köpeklerinde görülen gastrointestinal cestod ve nematod enfeksiyonları. *Türkiye Parazitol Derg* **31**(3): 208-211.

- KUMAN HA, ALTINTAŞ N (1984). Ege bölgesinde serolojik olarak saptanan toxocariasis olguları. *Türkiye Parazitol Derg* **1-2**: 113-120.
- KUSTIMUR S, DOGRUMAN AL F, OGUZULGEN K, BAKIR H, MARAL I, TURKTAS H, TUZUN H (2007). *Toxocara* seroprevalence in adults with bronchial asthma. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **101**: 270-274.
- LAHMAR S, BOUFANA B, BEN BOUBAKER S, LANDOLSI F (2014). Intestinal helminths of golden jackals and red foxes from Tunisia. *Vet Parasitol* **204**: 297-303.
- LAPAGE G (1968). Veterinary Parasitology. Oliver&Boyd, London. 76-80.
- LEE IH, KIM ST, OH DK, KIM HJ, KIM KH, JEON P, BYUN HS (2010). MRI findings of spinal visceral larva migrans of *Toxocara canis*. *Eur J Radiol* **75**: 236-240.
- LEE ACY, SCHANTZ PM, KAZACOS KR, MONTGOMERY SP, BOWMAN DD (2010). Special issue: Zoonoses of people and pets in the USA. Epidemiologic and zoonotic aspects of ascarid infections in dogs and cats. *Trends Parasitol* **26(4)**: 155-161.
- LEONE N, BARONIO M, TODROS L, DAVID E, BRUNELLO F, ARTIOLI S, RIZZETTO M (2006). Hepatic involvement in larva migrans of *Toxocara canis*. Report case with pathological and radiological findings. *Digest Liver Dis* **38(7)**: 511-514.
- LEVESQUE B, MESSIER V, BONNIER-VIGER YV, COUILLARD M, CÔTE S, WARD BJ, LIBMAN MD, GINGRAS S, DICK D, DEWAILLY E (2007). Seroprevalence of zoonoses in a cree community (Canada). *Diagn Micr Infec Dis* **59(3)**: 283-286.
- LEVINE ND (1968). Nematode Parasites of Domestic Animals and of Man. Bruggess Publishing Company, Minneapolis. 320-322.
- LI MW, LIN RQ, CHEN HH, SANI RA, SONG HQ, ZHU XO (2007). PCR tools for the verification of the specific identity of ascaridoid nematodes from dogs and cats. *Mol Cell Probes* **21**: 349-354.
- LI MW, LIN RQ, SONG HQ, WU XY, ZHU XQ (2008). The complete mitochondrial genomes for three *Toxocara* species of human and animal health significance. *BMC Genomics* **9**: 224.
- LITTLE SE, JOHNSON EM, LEWIS D, JACKLITSCH RP, PAYTON ME, BLAGBURN BL, BOWMAN DD, MOROFF S, TAMS T, RICH L, AUCOIN D (2009). Prevalence of intestinal parasites in pet dogs in the United States. *Vet Parasitol* **166**: 144-152.
- MACPHERSON CNL (2013). The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance. *Int J Parasitol* **43**: 999-1008.

- MAIKAI BV, ELISHA IA, BABA-ONOJA EBT (2012). Contamination of vegetables sold in markets with helminth eggs in Zaria metropolis, Kaduna State, Nigeria. *Food Control* **28**: 345-348.
- MANDARINO-PEREIRA A, DE SOUZA FS, LOPERS CWG, PEREIRA MJS (2010). Prevalence of parasites in soil and dog feces according to diagnostic tests. *Vet Parasitol* **170**: 176-181.
- MATSUO J, NAKASHIO S (2005). Prevalence of fecal contamination in sandpits in public parks in Sapporo City, Japan. *Vet Parasitol* **128**: 115-119.
- MCCARTHY JS, MOORE TA (2011). Section II: Pathogens Part I: Nematode Infections Chapter 109 Toxocariasis and Larva Migrans Syndromes. In: tropical infectious diseases: principles, pathogens and practice, Ed.: Guerrant, R.L., Weller P.F., Elsevier Saunders, Canada. 763-767.
- MENDONÇA LR, VEIGA RV, DATTOLI VCC, FIGUIREDO CA, FIACCONE R, SANTOS J, CRUZ AA, RODRIGUES LC, COOPER PJ, PONTES-DE-CARVALHO LC, BARRETO ML, ALCANTARA-NEVES NM (2012). *Toxocara* seropositivity, atopy and wheezing in children living in poor neighbourhoods in urban Latin American. *PLOS Negl Trop Dis* **6(11)** e1886: 1-9.
- MENDONÇA LR, FIGUEIREDO CA, ESQUIVEL R, FIACCONE RL, PONTES-DE-CARVALHO L, COOPER P, BARRETO ML, ALCANTARA-NEVES NM (2013). Seroprevalence and risk factors for *Toxocara* infection in children from an urban large setting in northeast Brazil. *Acta Trop* **128(1)**: 90-95.
- MERDİVENÇİ A (1962). İstanbul'da larva migrans rezervuarları üzerine araştırmalar. *Türk Vet Hek Dern Derg* **190-191**: 382-398.
- MINNAAR WN, KRECEK RC, FOURIE LJ (2002). Helminths in dogs from a peri-urban resource-limited community in free state province, South Africa. *Vet Parasitol* **107**: 343-349.
- MİMİOĞLU M, GÜRALP N, SAYIN F (1960). Ankara köpeklerinde görülen parazit türleri ve bunların yayılış nisbeti. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* **6(1-2)**: 53-68.
- MİMİOĞLU MM, GÜRALP N, TOLGAY N, SAYIN F (1965). Ankara civarında tilki (*Vulpes vulpes*)lerde bulduğumuz helmintler. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* **12(3)**: 164-190.
- NASH TE (2015). Visceral Larva Migrans and Other Uncommon Helminth Infections. In: principles and practice of infectious diseases, Ed.: Bennett J.E., Dolin R., Blaser M.J., Elsevier Saunders, Philadelphia. 3237-3242.
- NEGRI EC, SANTAREM VA, RUBINSKY-ELEFANT G, GIUFFRIDE R (2013). Anti-*Toxocara* spp. antibodies in an adult healthy population: serosurvey and risk factors in Southeast Brazil. *Asian Pac J Trop Biomed* **3(3)**: 211-216.

- NEVES D, LOBO L, SIMÕES PB, CARDOSO L (2014). Frequency of intestinal parasites in pet dogs from an urban area (Greater Oporto, northern Portugal). *Vet Parasitol* **200**: 295-298.
- NICHOLS RL (1956). The etiology of visceral larva migrans I. Diagnostic morphology of infective second stage *Toxocara* larvae. *J Parasitol* **42(4)**: 349-362.
- OGE S, OGE H (2000). Prevalence of *Toxocara* spp. eggs in the soil of public parks in Ankara, Turkey. *Dtsch Tierarztl Wschr* **107**: 72-75.
- OĞUZTÜRK H, SAYGI G (2002). *Toxocara canis* larvaları ile oluşan enfeksiyonun ilköğretim okulu öğrencilerinde araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg* **26(4)**: 409-414.
- OLLERO MD, FENOY S, CUELLAR C, GUILLEN JL, AGUILA C (2008). Experimental toxocariasis in BALB/c mice: Effect of the inoculation dose on brain and eye involvement. *Acta Trop* **105**: 124-130.
- ORHUN R, AYAZ E (2006). Van yöresi köpeklerinde bulunan endoparazitler ve halk sağlığı yönünden önemi. *Türkiye Parazitol Derg* **30(2)**: 103-107.
- ORTUNO A, SCORZA V, CASTELLA J, LAPPIN M (2014). Prevalence of intestinal parasites in shelter and hunting dogs in Catalonia, northeastern Spain. *Vet J* **199**: 465-467.
- OSHIMA T (1961). Standardization of techniques for infecting mice with *Toxocara canis* and observations on the normal migration routes of the larvae. *J Parasitol* **47**: 652-656.
- OVERGAAUW PAM, VAN KNAPEN F (2008). Toxocarosis, an important zoonosis. *EJCAP* **18(3)**: 259-266.
- OVERGAAUW PAM, VAN KNAPEN F (2013). Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp.. *Vet Parasitol* **193**: 398-403.
- OVERGAAUW PAM, VAN ZUTPHEN L, HOEK D, YOYA FO, ROELFSEMA J, PINELLI E, VAN KNAPEN F, KORTBEEK LM (2009). Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in the Netherlands. *Vet Parasitol* **163**: 115-122.
- ÖGE S (1993). *Toxocara canis* yumurtalarına ve Visceral Larva Migrans'a radyasyonun etkileri. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. Ankara.
- ÖGE H, ÖGE S, ÖZBAKIŞ G, GÜRCAN S (2014). Comparison of *Toxocara* eggs in hair and faecal samples from owned dogs and cats collected in Ankara, Turkey. *Vet Parasitol* **206**: 227-231.
- ÖGE S, ÖGE H, GÖNENÇ B, ÖZBAKIŞ G, YILDIZ C (2013). Presence of *Toxocara* eggs on the hair of dogs and cats. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* **60**: 171-176.

- ÖNCEL T (2004). İstanbul'da evlerde beslenen köpeklerde *Toxocariosis canis*. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* **10(2)**: 151-153.
- PALMER CS, THOMPSON A, TRAUB RJ, REES R, ROBERTSIN ID (2008). National study of the gastrointestinal parasites of dogs and cats in Australia. *Vet Parasitol* **151**: 181-190.
- PAMUKÇU AM, ERTÜRK E (1961). 1933-1960 yılları arasında Ankara ve yöresinde köpeklerde görülen hastalıklara toplu bir bakış. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* **8(4)**: 323-346.
- PAQUET-DURAND I, HERNANDEZ J, DOLZ G, ROMERO ZUNIGA JJ, SCHNIEDER T, EPE C (2007). Prevalence of *Toxocara* spp., *Toxascaris leonina* and ancylostomidae in public parks and beaches in different climate zones of Costa Rica. *Acta Trop* **104**: 30-37.
- PULLOLA T, VIERIMAA J, SAARI S, VIRTALA AM, NIKANDER S, SUKURA A (2006). Canine intestinal helminths in Finland: prevalence, risk factors and endoparasite control practices. *Vet Parasitol* **140**: 321-326.
- PINELLI E, ROELFSEMA JH, BRANDES S, KORTBEEK T (2013). Detection and identification *Toxocara canis* DNA in bronchoalveolar lavage of infected mice using a novel real time PCR. *Vet Parasitol* **193**: 337-341.
- RADWAN NA, KHALIL AI, EL MAHI RA (2009). Morphology and occurrence of species of *Toxocara* in wild mammal populations from Egypt. *Comp Parasitol* **76(2)**: 273-282.
- RAZMI GR, SARDARI K, KAMRANI AR (2006). Prevalence of *Echinococcus granulosus* and other intestinal helminths of stray dogs in Mashhad area, Iran. *Arch Razi Inst* **61(3)**: 143-148.
- RIGGIO F, MANNELLA R, ARITI G, PERRUCCI S (2013). Intestinal and lung parasites in owned dogs and cats from central Italy. *Vet Parasitol* **193**: 78-84.
- ROBERTS LS, JANOVY J (2006). Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology. Mc-Graw Hill, Newyork. 431-443.
- ROCHA S, PINTO RMF, FLORIANO AP, TEIXEIRA LH, BASSILI B, MARTINEZ A, COSTA SOP, CASEIRO MM (2011). Environmental analyses of the parasitic profile found in the sandy soil from the Santos municipality beaches, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **53(5)**: 277-281.
- RODDIE G, HOLLAND C, STAFFORD P, WOLFE A (2008). Contamination of fox hair with eggs of *Toxocara canis*. *J Helminthol* **82**: 293-296.

- RODDIE G, STAFFORD P, HOLLAND C, WOLFE A (2008). Contamination of dog hair with eggs of *Toxocara canis*. *Vet Parasitol* **152**: 85-93.
- SAEED I, MADDOX-HYTTEL C, MONRAD J, KAPEL CMO (2006). Helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Denmark. *Vet Parasitol* **139**: 168-179.
- SAMBROOK J, FRITSCHI EF, MANIATIS T (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SARAEI M, ZAKILO M, TAVAZOEI Y, JAHANIHASHEMI H, SHAHNAZI M (2012). Contamination of soil and grass to *Toxocara* spp. eggs in public parks of Qazvin, Iran. *Asian Pac J Trop Biomed* S1156-S1158.
- SAYGI G, ÖZÇELİK S, TEMİZKAN N (1990). Sivas sokak köpeklerinin ince barsaklarında bulunduğumuz helmintler. *Türkiye Parazitol Derg* **14(1)**: 81-93.
- SCHACHER JF (1957). A contribution to the life history and larval morphology of *Toxocara canis*. *J Parasitol* **43**: 599-612.
- SCHNIEDER T, LAABS EM, WELZ C (2011). Larval development of *Toxocara canis* in dogs. *Vet Parasitol* **175**: 193-206.
- SMITH H, NOORDIN R (2006). Diagnostic limitations and future trends in serodiagnosis of human toxocariasis. In: *Toxocara the enigmatic parasite*, Ed.: Holland C.V., Smith H.V., CABI Publishing, Cambridge. 89-112.
- SINHA BN (1966). The migratory behaviour of the larvae of *Toxocara canis* (Werner 1782) in white mice. *Indian Vet J* **43(12)**: 1101-1105.
- SMITH H, HOLLAND C, TAYLOR M, MAGNAVAL JF, SCHANTZ P, MAIZELS R (2009). How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Trends Parasitol* **25(4)**: 182-188.
- SOULSBY EJJ (1982). Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. The English Language Book Society and Baillere Tindall, London. 150-155.
- SPRENT JFA (1952). On the migratory behavior of the larvae of various ascaris species in the white mice I. Distribution of larvae in tissues. *J infect dis* **90**: 165-176.
- SPRENT JFA (1955). On the invasion of the central nervous system by nematodes. II. Invasion of the nervous system in ascariasis. *Parasitology* **45**: 41-55.
- SPRENT JFA (1958). Observations on the development of *Toxocara canis* (Werner, 1782) in the dog. *Parasitology* **48**: 184-209.
- SPRENT JFA (1963). Visceral Larva Migrans. *Austr J Sci* **25(8)**: 344-354.

- STRUBE C, HEUER L, JANECEK E (2013). *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Vet Parasitol* **193**: 375-389.
- ŞAHİN İ, EKİNCİ N, ŞEN İ, ÖZCAN M, GÖDEKMERDAN A (1993). Kayseri yöresi köpeklerinde *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) ve diğer parazitlerin yayılışı. *Türkiye Parazitol Derg* **17(3-4)**: 69-76.
- TAYLOR MA, COOP RL, WALL RL (2007). *Veterinary Parasitology*. Blackwell Publishing, Oxford. 361-363.
- TEIXEIRA CR, CHIEFFI PP, LESCANO SAZ, SILVA EO, FUX B, CURY MC (2006). Frequency and risk factors for toxocariasis in children from pediatric outpatient center in southeastern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **48(5)**: 251-255.
- THE CENTER FOR FOOD SECURITY&PUBLIC HEALTH (2005). Toxocariasis. Erişim Adresi: [<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/toxocariasis.pdf>]. Erişim tarihi: 03.03.2015.
- TINAR R, COŞKUN ŞZ, DOĞAN H, DEMİR S, AKYOL ÇV, AYDIN L (1989). Bursa yöresi köpeklerinde görülen helmint türleri ve bunların yayılışı. *Türkiye Parazitol Derg* **13(3-4)**: 113-120.
- TUDOR P (2015). Soil contamination with canine intestinal parasites eggs in the parks and shelter dogs from Bucharest area. *Agric Agric Sci Procedia* **6**: 387-391.
- UBELAKER JE, ALLISON VF (1975). Scanning electron microscopy of the eggs of *Ascaris lumbricoides*, *A. suum*, *Toxocara canis* and *T. mystax*. *J Parasitol* **61(5)**: 802-807.
- UGA S, MATSUO J, KIMURA D, RAI SK, KOSHINO Y, IGARASHI K (2000). Differentiation of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs by light and scanning electron microscopy. *Vet Parasitol* **92**: 287-294.
- UMUR Ş, ARSLAN MÖ (1998). Kars yöresi sokak köpeklerinde görülen helmint türlerinin yayılışı. *Türkiye Parazitol Derg* **22(2)**: 188-193.
- ÜNLÜ H, EREN H (2007). Aydın yöresi sokak köpeklerinde dışkı bakışına göre saptanan mide bağırsak helmintleri. *Türkiye Parazitol Derg* **31(1)**: 46-50.
- WEBSTER GA (1958). A report on *Toxocara canis* Werner, 1782. *Can J Comp Med* **22(8)**: 272-279.
- WICKRAMASINGHE S, YATAWARA L, RAJAPAKSE RPVJ, AGATSUMA T (2009). *Toxocara canis* and *Toxocara vitulorum*: molecular characterization, discrimination,

and phylogenetic analysis based on mitochondrial (ATP synthase subunit 6 and 12S) and nuclear ribosomal (ITS-2 AND 28S) genes. *Parasitol Res* **104**: 1425-1430.

WOLFE A, WRIGHT IP (2003). Human toxocariasis and direct contact with dogs. *Vet Rec* **152**: 419-422.

YACOB HT, AYELE T, FIKRU R, BASU AK (2007). Gastrointestinal nematodes in dogs from Debre Zeit, Ethiopia. *Vet Parasitol* **148**: 144-148.

YAMAGUTI S (1961). *Systema Helminthum Volume III The Nematodes of Vertebrates Part I*. Interscience Publishers Inc., Newyork. 578-579.

YAMAN M, AYAZ E, GÜL A, MUZ MN (2006). Hatay ilinde bakısı yapılan kedi ve köpeklerde helmint enfeksiyonları. *Türkiye Parazitol Derg* **30(3)**: 200-204.

YAMAN KARADAM S, ERTUG S, ERTABAKLAR H, OKYAY P (2008). The comparison of IgG antibodies specific to *Toxocara* spp. among eosinophilic and non-eosinophilic groups. *New Microbiol* **31**: 113-116.

YILDIRIM A, İÇA A, DÜZLÜ Ö, YAVUZ A, İNCİ A (2007). Kayseri yöresinde dışkı muayenesine göre köpeklerde bulunan sindirim sistemi helmintleri ve bunların yaygınlığı. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* **4(2)**: 65-71.

ZEYBEK H, TATAR N, TOKAY A (1992). Ankara yöresi kırsal alan köpeklerinde görülen parazitler ve bunların yayılışı. *Etlik Mikrobiyol Derg* **7(2)**: 17-27.

ZIADINOV I, DEPLAZES P, MATHIS A, MUTUNOVA B, ABDYKERIMOV K, NURGAZIEV R, TORGERSON PR (2010). Frequency distribution of *Echinococcus multilocularis* and other helminths of foxes in Kyrgyzstan. *Vet Parasitol* **171**: 286-292.

ZIBAEI M, SADJJADI SM, KARAMIAN M, UGA S, ORYAN A, JAHADI-HOSSEINI SH (2013). A comparative histopathology, serology and molecular study, on experimental ocular toxocariasis by *Toxocara cati* in mongolian gerbils and wistar rats. *BioMed Res Int* ID: 109580.

EKLER

Ek-1. Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığından alınan etik kurul kararı.



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

12.03/2010

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/ 82-4543
KONU:

Sayın
Prof.Dr.Ahmet DOĞANAY
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Parazitoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Prof.Dr.Ahmet DOĞANAY ve Arş.Gör.Gökben ÖZBAKİŞ'dan oluşan, G.Ü.ET-10.038 kod numaralı ve "*Toxocara canis* ile Deneysel Enfekte Farelerde Visceral Larva Migransın PCR ile Teşhisi" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-10.038 and entitled "*PCR Detection of Visceral Larvae Migrans in Mice Experimentally Infected with Toxocara canis*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste

Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

Ek-2. Revize edilen etik kurul kararı ve revize gerekçesi.



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/179-17444
KONU :

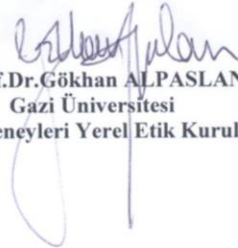
26.09/2011

Sayın

Prof.Dr.Ahmet DOĞANAY
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Parazitoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Daha önce onay alan, G.Ü.ET-10.038 kod numaralı "*Toxocara Canis ile Deneysel Enfekte Farelerde Visceral Larva Migransın PCR ile Teşhisi*" adlı çalışmanız hakkında vermiş olduğunuz 19.09.2011 tarihli dilekçeniz incelenmiş olup, talebiniz Başkanlığımızca uygun görülmüştür.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.


Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI



Sayı: B.30.2.ANK.0.23.12.03/202
Konu: G.Ü.E.T-10.038 No'lu çalışma hk.

19.09.2011

**T.C. Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul
Başkanlığı'na**

Etik kurul'dan alınan G.Ü.E.T-10.038 numaralı "*Toxocara canis* ile Deneysel Enfekte Farelerde Visceral Larva Migransin PCR ile Teşhisi" adlı çalışmada ilgili literatürlere bağlı olarak farelerin 2000 enfektif dönem larvalı yumurta ile enfekte edileceği planlanmış, hayvanların ne tepki vereceğini (14 gün yaşayacağı vs. durumları) saptamak amaçlı 2 fare ile ön çalışma yapılmıştır. Dozun yüksek olduğu belirlenmiş, doz yarı yarıya düşürülerek çalışma 1000 enfektif dönem larvalı yumurta ile tamamlanmıştır.

Gereğini bilgilerinize saygılarımla arz ederim.

Prof. Dr. Ahmet DOĞANAY
Proje Yürütücüsü



T.C.
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı



Sayı: B.30.2.ANK.0.23.12.04/ 226

09/05/2011

PATOLOJİ RAPORU

Protokol No : 178-11
Hayvan sahibi : Gökben Özbakış
Hayvanın kimliği : 3 adet fare, Albino, dişi
Gönderen : Parazitoloji Anabilim dalı, 15.04.2011 tarihli ve 92 nolu yazı
Klinik Tanı :
Öldüğü tarih : 14.04.2011
Nekropsi tarihi : 15.04.2011

NEKROPSİ BULGULARI

Nekropsileri yapılan her üç farenin de bulguları hemen hemen aynı olup; akciğerler şişkin, kanamalı ve oldukça koyu renkteydi. Bağırsakların bazı kısımları koyu yeşilimsi renkteydi. Karaciğer şişkin, kenarları kütleşmişti ve kesitinde hafif kan sızıntısına rastlandı.

HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Nekropsileri yapılan her üç farenin de bulguları hemen hemen aynı olup;

Akciğerler: Alveol, bronş, bronşiyollerin lümenleri eritrositlerle tamamen doluydu. (Doku zor tanımlanabilir haldeydi.)

Bağırsaklar: Lamina epiteliyalisin epitel hücrelerinin yer yer dökülmüş olduğu ve kimi bezlerde nekroz şekillendiği (D1 kodlu farede bu nekroze kısımlarda oval-yuvarlak oluşuma rastlanılmıştır, parazit?) bu nekrozun Tunika seroza'ya kadar ilerlediği dikkati çekti. Nekroz olan kısımlara yakın peritonda yağ hücreleri arasında nötrofil lökosit, lenfosit ve plazma hücrelerine rastlandı.

Karaciğer: V.sentralis ve sinuzoidlerin eritrositler ile dolu olduğu, bazı alanlarda da kanamanın varlığı dikkati çekti. Kimi hepatositlerin pembe homojen renkte boyandığı ve çekirdeklerini kaybettiği görüldü.

PATOLOJİK TANI

- Akciğerlerde şiddetli kanama
- Enteritis subakuta ve peritonitis
- Karaciğerde pasif hiperemi, kanama ve kimi alanlarda koagülasyon nekrozu

Prof. Dr. Rıfki HAZIROĞLU
Patoloji Anabilim Dalı Başkanı

*Anabilim Dallarına, özel veteriner kliniklerine ve şahıslara verilen nekropsi/biyopsi rapor sonuçlarının üçüncü kişiler tarafından kullanımı Patoloji Anabilim Dalı Başkanlığının iznine tabidir

Ek-3. Fare dokularındaki ekstraksiyon sonucu ölçülen nükleik asit konsantrasyonları (ng/μl) ve 260/280 dalga boyu ölçümleri.

Örnek no	Nükleik asit konsantrasyonu (ng/μl)	260/280
Nekropsi 2. Gün		
D1 Karaciğer	31,88	1,86
D1 Akciğer	53,42	1,81
D1 Beyin	10,08	2,46
D1 Ön bacak	48,89	2,49
D1 Arka bacak	10,48	2,34
D2 Karaciğer	35,72	2,66
D2 Akciğer	32,29	2,26
D2 Beyin	9,55	3,07
D2 Ön bacak	28,06	1,76
D2 Arka bacak	12,99	2,10
D3 Karaciğer	19,04	2,50
D3 Akciğer	28,95	2,41
D3 Beyin	15,75	2,31
D3 Ön bacak	24,59	1,65
D3 Arka bacak	19,05	1,52
D4 Karaciğer	32,83	1,95
D4 Akciğer	69,32	1,76
D4 Beyin	18,60	1,78
D4 Ön bacak	20,40	1,70
D4 Arka bacak	33,30	2,14
D5 Karaciğer	42,85	1,73
D5 Akciğer	79,98	1,76
D5 Beyin	35,23	1,81
D5 Ön bacak	23,35	2,05
D5 Arka bacak	20,27	1,67
D6 Karaciğer	54,65	1,40
D6 Akciğer	58,63	1,99
D6 Beyin	21,25	1,92
D6 Ön bacak	124,50	2,39
D6 Arka bacak	16,95	1,47

Örnek no	Nükleik asit konsantrasyonu (ng/μl)	260/280
Nekropsi 4. gün		
D1 Karaciğer	32,1	1,85
D1 Akciğer	154,9	1,83
D1 beyin	11	1,7
D1 Ön bacak	7	1,72
D1 Arka bacak	2,1	1,27
D2 Karaciğer	20,8	1,8
D2 Akciğer	50,5	1,83
D2 Beyin	5,8	2,04
D2 Ön bacak	23,3	1,73
D2 Arka bacak	1,1	1,7
D3 Karaciğer	23,8	1,89
D3 Akciğer	351,8	1,81
D3 Beyin	7,4	1,76
D3 Ön bacak	3	1,97
D3 Arka bacak	4	1,83
D4 Karaciğer	13,3	1,88
D4 Akciğer	61,2	1,84
D4 Beyin	10,5	1,66
D4 Ön bacak	5,1	2,03
D4 Arka bacak	3,5	1,43
D5 Karaciğer	14,4	1,84
D5 Akciğer	35,7	1,91
D5 Beyin	8,2	1,67
D5 Ön bacak	3,8	1,55
D5 Arka bacak	6,5	1,57
D6 Karaciğer	14,5	1,86
D6 Akciğer	12,8	1,89
D6 Beyin	11,2	1,87
D6 Ön bacak	13,8	1,84
D6 Arka bacak	17,5	1,78
K1 Karaciğer	51,20	1,88
K1 Akciğer	45,23	2,11
K1 Beyin	9,95	1,59
K1 Ön bacak	5,77	1,43
K1 Arka bacak	9,14	1,25
K2 Karaciğer	18,31	1,71
K2 Akciğer	61,34	1,92
K2 Beyin	36,07	1,52
K2 Ön bacak	25,51	1,46
K2 Arka bacak	10,96	1,98
K3 Karaciğer	59,44	1,88
K3 Akciğer	107,02	1,97
K3 Beyin	36,19	1,48
K3 Ön bacak	37,33	2,27
K3 Arka bacak	9,50	1,49

Örnek no	Nükleik asit konsantrasyonu (ng/µl)	260/280
Nekropsi 7. Gün		
K1 Karaciğer	31,2	1,81
K1 Akciğer	74,1	1,86
K1 Beyin	24	1,84
K1 Ön bacak	12,1	1,84
K1 Arka bacak	15,6	1,89
K2 Karaciğer	25,2	1,87
K2 Akciğer	44,4	1,88
K2 Beyin	17	1,83
K2 Ön bacak	27,1	1,79
K2 Arka bacak	17,6	1,76
K3 Karaciğer	46,6	1,83
K3 Akciğer	69,4	1,86
K3 Beyin	18,8	1,74
K3 Ön bacak	20,1	1,71
K3 Arka bacak	18,4	1,72

Örnek no	Nükleik asit konsantrasyonu (ng/µl)	260/280
Nekropsi 14. gün		
D1 Karaciğer	27,2	1,81
D1 Akciğer	78,8	1,86
D1 beyin	14,8	1,76
D1 Ön bacak	21,8	1,76
D1 Arka bacak	13,5	1,65
D2 Karaciğer	38	1,82
D2 Akciğer	57,2	1,79
D2 Beyin	17,6	1,83
D2 Ön bacak	31,6	1,81
D2 Arka bacak	15,3	1,71
D3 Karaciğer	40,8	1,81
D3 Akciğer	83	1,84
D3 Beyin	13	1,24
D3 Ön bacak	21,7	1,77
D3 Arka bacak	16,7	1,82
D4 Karaciğer	36,5	1,85
D4 Akciğer	91,2	1,83
D4 Beyin	15,2	1,83
D4 Ön bacak	16,6	1,83
D4 Arka bacak	36	1,84
D5 Karaciğer	36,1	1,80
D5 Akciğer	93,2	1,81
D5 Beyin	15,4	1,70
D5 Ön bacak	17,7	1,71
D5 Arka bacak	17,8	1,76
D6 Karaciğer	41,3	1,81
D6 Akciğer	85	1,86
D6 Beyin	13,4	1,74
D6 Ön bacak	19,2	1,74
D6 Arka bacak	10,9	1,77
K1 Karaciğer	28,3	1,83
K1 Akciğer	365,1	1,82
K1 Beyin	12,9	1,72
K1 Ön bacak	8,3	1,62
K1 Arka bacak	12,3	1,57
K2 Karaciğer	21,9	1,68
K2 Akciğer	86,2	1,82
K2 Beyin	12,5	1,79
K2 Ön bacak	8,6	1,52
K2 Arka bacak	4,4	1,63
K3 Karaciğer	16	1,81
K3 Akciğer	45	1,79
K3 Beyin	11,7	1,73
K3 Ön bacak	6,5	1,70
K3 Arka bacak	9,5	1,65

Ek-4. Hazırlanan larva/morulalı yumurtaların ekstraksiyonu sonrası nükleik asit konsantrasyonları (ng/μl) ve 260/280 dalga boyu ölçümleri.

Örnek no	Nükleik asit konsantrasyonu (ng/μl)	260/280
Yum 1	6,9	1,82
Yum 2	6,6	1,94
Yum 3	8,8	1,76
Yum 4	9,2	1,68
Yum 5	9,3	1,76
Yum 6	5,1	1,58
Yum 7	11,2	1,66
Yum 8	5,6	1,92
Yum 9	5,1	2,06
Yum 10	7,8	1,85

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Gökben
 Soyadı: ÖZBAKIŞ
 Doğum yeri ve tarihi: Samsun- 15.10.1983
 Uyruğu: TC
 Medeni durumu: Bekar
 İletişim adresi ve telefonu: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı (Helmintoloji), Dışkapı Yerleşkesi, 06110, Altındağ/ANKARA

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru)

Lisans: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2001-2007 (Ankara)
 Lise: Kaya Bayazıtıoğlu Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi 1997-2001 (Ankara)
 Ortaokul: Afşin Bey İlköğretim Okulu 1994-1997 (Ankara)
 İlkokul: Kooperatifler İlkokulu 1992-1994 (Ankara)
 Altınova İlkokulu 1989-1992 (Konya)

Yabancı dili: İngilizce

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru)

2007: Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

TİGEM Karacabey Tarım işletmesinde 30 iş günü süre ile büyük baş ve atçılık ünitesinde staj (Bursa, 2003)

İsrail hükümet antlaşması ile Kibbutz Geva'da 2 aylık atçılık ünitesinde staj (Afula, 2005)

Ankara Üniversitesi DPT destekli 2001K120240 kodlu ileri araştırma ve eğitim programları konulu projede proje destek uzmanı (Ankara, 2008)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türkiye Parazitoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları:

AŞTI C, ÖZBAKIŞ G, AZRUG F, ORKUN Ö, NALBANTOĞLU S, ÇAKMAK A, BURGU A (2012). Farklı illere ait buzağı dışkı bakısı sonuçları. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* **18(Suppl-A)**: 209-214.

GÖNENÇ B, ÖGE H, ÖGE S, EMİR H, ÖZBAKIŞ G, AŞTI C (2012). First record of *Lyperosomum longicauda* Rudolphi, 1809 (trematoda: dicrocoeliidae) in northern bald ibis (*Geronticus eremita*) in Turkey. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* **59(3)**: 227-230.

OGE H, OGE S, GONENC B, OZBAKIS G, ASTI C (2012). Coenurosis in the lumbar region of a goat: a case report. *Veterinari Medicina* **57(6)**: 308-313.

ÖGE S, ÖGE H, GÖNENÇ B, ÖZBAKIS G, YILDIZ C (2013). Presence of *Toxocara* eggs on the hair of dogs and cats. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* **60(3)**: 171-176.

ÖGE H, ÖGE S, ÖZBAKIS G, GÜRCAN S (2014). Comparison of *Toxocara* eggs in hair and faecal samples from owned dogs and cats collected in Ankara, Turkey. *Vet Parasitol* **206(3-4)**: 227-231.

Bildirileri

Sözlü

ÖGE S, ÖGE H, GÖNENÇ B, ÖZBAKIS G, AŞTI C. Köpek ve kedi tüylerinde *Toxocara* sp. yumurtalarının zoonoz özelliğinin araştırılması, 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Paraziter Hastalıkları Sempozyumu, Sözlü Sunum, 5-10 Eylül 2011, Kars.

Poster

ÖZBAKIS G, ÖGE H, ÖGE S, TUNÇ AS, AŞTI C. Identification and genetic characterization of cyst hydatid in a wild boar, in Turkey. The 26th World Congress on Echinococcosis Cystic and Alveolar Echinococcosis Old Diseases-New Challenges, Poster sunumu, 1-3 Ekim 2015, Bucharest/Romania.

ÖZBAKIS G, AŞTI C, AZRUG AF, BURGU A. Türkiye’de geviş getiren hayvanlar da askarit sorununa retrospektif bakış, 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Paraziter Hastalıkları Sempozyumu, Poster Sunum, 5-10 Eylül 2011, Kars.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Projeleri

“Ankara yöresi köpeklerinde *E.granulosus*’un varlığının copro-PCR yöntemi ile araştırılması”. Ankara Üniversitesi BAP 08.06.2012-08.04.2015.Yardımcı Araştırmacı.

“Farelerde visceral larva migrans (*Toxocara canis*) tedavisinde albendazol ve çörekotu yağının (thymoquinone) kombinasyonunun etkisi”. Ankara Üniversitesi BAP 14.05.2013-devam ediyor. Yardımcı Araştırmacı.

“Ankara bölgesinde koyunlarda *Fasciola hepatica* enfeksiyonunun dışkı kan ve sütte farklı test kitleri ve excretion/secretion antijeni kullanılarak ELISA yöntemi ile karşılaştırılmalı teşhisi”. BAP 12.03.2015- devam ediyor. Yardımcı Araştırmacı.

VIII- Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve katıldığı eğitim seminerleri

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü 2-D (2 Boyutlu) Jel Elektroforez İle Proteom Analiz Kursu Programı (Kasım-2008).

Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu VII (Aralık-2009).

TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji Yöntemleri Uygulamalı Eğitim Programı (Nisan-2011).

Tarım Bilimleri Alanında TÜBİTAK Proje Yazma, Hazırlama ve Yönetme Eğitimi (Ekim-2014).