

Toxoplasma gondii İnfeksiyonu Tanısında İki Turlu Gerçek Zamanlı (Real-Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yönteminin Kullanılması

Sibel AYDOĞAN¹, Funda DOĞRUMAN AL¹, Ayşe EREN¹, Ayşe KALKANCI¹,
Semra KUŞTİMUR¹, Aydan BİRİ²

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi ¹Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ²Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Ankara

ÖZET: Bu çalışma çeşitli kliniklerden laboratuvarımıza gönderilen değişik örneklerdeki *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) DNA'sının gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle araştırılması amacıyla yapılmıştır. Toplam 80 örnekten, *T. gondii* DNA'sı elde edildikten sonra, DNA çoğaltılması *T. gondii* için düzenlenen B1 gen bölgesine spesifik primer ve probalar kullanılarak yapılmıştır. Çalışmaya alınan 80 örnekten üç örnekte *T. gondii* DNA'sı pozitif bulunmuştur. Bunlardan ikisi kadın doğum kliniğinden gönderilen amnion sıvısı örneği ile biri yeni doğan kliniğinden gönderilen beyin omurilik sıvısı (BOS) örneği olup, BOS örneği pozitif olan bu hastanın kan örneğinde *T. gondii* DNA'sı saptanmamıştır. Diğer 77 hasta örneğinde de *T. gondii* DNA'sı tespit edilememiştir.

Anahtar kelimeler: *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmosis, gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesi

The Use of the Nested Real-Time Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infections

SUMMARY: This study was performed in order to investigate the presence of *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) DNA, in various clinical specimens, obtained from different clinics, using the real-time polymerase chain reaction. Investigation of a total of 80 specimens was carried out using B1 gene region specific primers and probes after the extraction of *T. gondii* DNA. *T. gondii* DNA was found in three out of 80 specimens. Out of the three specimens found to be positive for *T. gondii* DNA, two were amniotic fluid specimens obtained from the Obstetrics and Gynecology Department and one, a cerebrospinal fluid specimen obtained from the Neonatology Department. *T. gondii* DNA was not found in the blood of a CSF-positive case. DNA was not found in the specimens of the remaining 77 patients.

Key words: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis, Real-Time polymerase chain reaction

GİRİŞ

Toxoplasmosis zorunlu hücre içi paraziti olan *T. gondii*'nin neden olduğu, bütün dünyada yaygın olarak tüm memeli ve kanatlılarda görülen bir enfeksiyondur. Edinsel Toxoplasmosis genellikle asemptomatik seyir gösterirken, konjenital yol ile bulaşan enfeksiyonlar, abortus, ölü ve anomalili doğumlara neden olabilmekte, özellikle gebelik döneminde gelişen akut enfeksiyonların fetusa geçme riski artmaktadır. Bu durumda hastalığın karakteristik semptomları olan koriyoretinit, serebral kalsifikasyonlar, hidrosefali, mental gerilik, epilepsi, görme kaybı, sarılık, hepatosplenomegali, nörolojik bulgular, döküntü, kanama ve ensefalomyelit gibi patolojilere neden

olabilmektedir. İmmun yetmezlik ise reaktivasyon riski taşıması bakımından önemli olmakta ve bu kişilerde de ensefalit, pnömoni, koriyoretinit, miyokardit gelişebilmektedir (5, 9, 12, 23). Gebelikleri sırasında toxoplasmosise yakalanan annelerin bebeklerinden yaklaşık 1/3'ünün enfekte doğduğu bilinmektedir. Konjenital enfeksiyon insidansı annenin enfekte olduğu trimestere göre değişmektedir. En düşük insidans birinci trimesterde (%15-25), en yüksek insidans ise üçüncü trimesterde (%60-65) görülmektedir. Enfekte bebeklerin çoğu doğumda asemptomatiktir. Bununla birlikte konjenital hastalığın ciddiyeti gestasyon yaşıyla ters orantılıdır.

Geliş tarihi/Submission date: 30 Aralık/30 December 2004

Düzeltilme tarihi/Revision date: -

Kabul tarihi/Accepted date: 11 Şubat/11 February 2005

Yazışma /Corresponding Author: Funda Doğruman Al

Tel: (+90) (312) 202 46 25 Fax: (+90) (312) 202 69 79

E-mail: alfunda@gazi.edu.tr

Toxoplasmosisin seropozitifliği dünya genelinde %5-90 olarak değişmektedir (12). Ülkemizde yapılan çalışmalarda toxoplasmosis prevalansının %12-65 arasında değiştiği bildirilmiştir (10, 20, 25, 26).

Toxoplasmosis enfeksiyöz ve non-enfeksiyöz birçok enfeksiyonla karışabildiği için tanısı zordur. Tanı serolojik testler, biyopsi örneklerinin incelenmesi veya parazitin izolasyonuna dayanır. *T. gondii* hücre kültürü veya deney hayvanlarında üretilebilmesine karşılık izole edilmesinin güç olması nedeniyle tanıda temel olarak serolojik testlerden faydalanılır. Serolojide canlı takizoitlerin kullanıldığı Sabin-Feldman Dye testi en spesifik referans test olarak kabul edilmektedir. Fakat dye testinde canlı takizoit gereksinimi bu testin rutin laboratuvarlarda kullanım imkanını kısıtlamaktadır. Ancak günümüzde uygulama kolaylığı, maliyeti ve yüksek duyarlılık ve özgüllüğü nedeniyle rutin laboratuvarlarda özgül antikorlar ELISA yöntemiyle çalışılmaktadır. Parazite karşı oluşmuş spesifik IgG ile IgM antikorlarının yanı sıra son yıllarda özellikle IgA, IgE antikorlarının saptanması ile IgG avidite testleri tanıda kullanılmaktadır. Bununla birlikte IgM antikor düzeyinin iki yıla yakın yüksek saptanabilmesi ayrıca romatoid faktör ve antinükleer antikor düzeylerindeki yüksekliklerin yanlış pozitifliğe neden olması, spesifik IgM titresindeki yüksekliğin her zaman akut enfeksiyonu ifade etmediğini göstermektedir (3, 14, 16, 17). Bununla birlikte serolojik testlerin kullanımında spesifik antikorların parazitemiden birkaç hafta sonra yükseldiğinin saptanabilmesi, özellikle konjenital Toxoplasmosis açısından gebelerde hastalığın aktif döneminin belirlenememesine ve fetusta hastalık açısından yüksek riskin meydana gelmesine neden olmaktadır. Bağışık yetmezliği olan kişilerde antikor oluşturamama veya düşük titrelili antikor oluşturma serolojik tanı yöntemlerinde değerlendirme zorluklarına yol açmaktadır. Bu nedenle alternatif metod olarak fare inokülasyonu veya doku kültürü yapılabilir. Fakat bu yöntemlerin zaman alıcı olması ve uygulama kolaylığının olmaması nedeniyle, enfeksiyonun belirlenebilmesi için hızlı, güvenilir, kantitatif sonuç verebilen testlerin arayışını gündeme getirmiştir.

Vücut sıvısı ve dokularda *T.gondii* DNA'sının tespitine dayanan PZR konjenital, oküler ve dissemine Toxoplasmosis tanısında, başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. PZR hızlı tanı sağlayabilme, materyallerde mikrogram düzeyindeki DNA miktarlarını saptayabilme özelliği taşımaktadır (2, 9, 11). Konjenital Toxoplasmosis prenatal tanısında ultrasonografi ve seroloji temel alınmakla birlikte, gebeliğin onsekizinci haftasından sonra yapılan PZR yöntemiyle amniotik sıvıda DNA aranması faydalı olmaktadır. Daha erken yapılan incelemelerin güvenilirliği bilinmemektedir (20)

PZR duyarlılığı; amniotik sıvıda %65-80, plasenta örneklerinde %60, BOS'ta %<17-100, oküler Toxoplasmosis aköz humorde %15-53, dissemine Toxoplasmosis akciğer tutulumunda BAL incelemelerinde %100 arasında belirtilmiştir (4, 20)

GEREÇ VE YÖNTEM

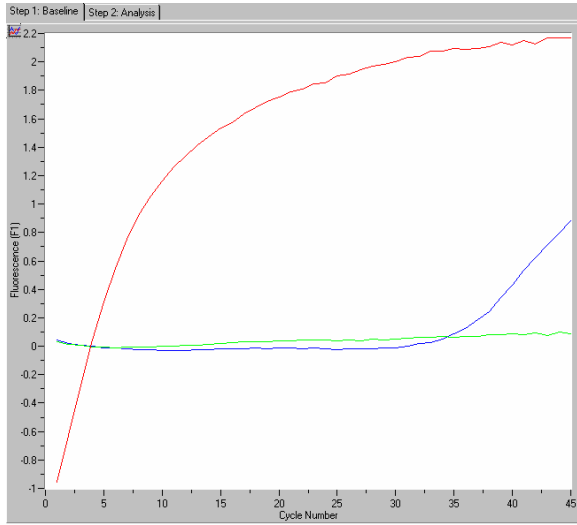
Çalışmamızda 01.01.2003-15.04.2004 tarihleri arasında hastanemizin çeşitli kliniklerinden gönderilen değişik örneklerden *T. gondii* DNA'sı gerçek zamanlı PZR yöntemiyle araştırılmıştır.

Kadın hastalıkları ve Doğum kliniğinden 62, pediatri yenidoğan kliniğinden 14, nöroşirurji kliniğinden iki, ayrıca Sami Ulus Çocuk Hastanesi yenidoğan kliniğinden iki olmak üzere; 54'ü amnion, 17'si kan, altısı BOS, ikisi doku (akciğer ve beyin biyopsileri), biri idrar olan toplam 80 örnekten *T. gondii* DNA'sı High Pure Viral Nucleic Acid kiti (Roche, Almanya) ile elde edildikten sonra, birinci tur çoğaltma için B1 gen bölgesine spesifik primerler (5'-TCA AGC AGC GTA TTG TCG AG-3'), (5'CCG CAG CGA CTT CTA TCT CT 3') içeren amplifikasyon karışımı (Metis Biyoteknoloji LTD. Ankara) hazırlanarak ependorf tüplerine test başına 20 µl olacak şekilde dağıtılıp, üzerine ekstraksiyonu yapılan örnekten 5 µl eklenmiştir. Tüpler termal döngü cihazına (ThermoHybaid, UK) yerleştirilmiştir. Termal döngü cihazında 94 °C'de 3 dakika tutulduktan sonra, denatürasyon için 94 °C'de 20 saniyelik, yapışma için 55 °C'de 35 saniyelik , uzama için 72 °C'de 45 saniyelik 20 siklus takip edilmiştir. İkinci tur çoğaltma gerçek zamanlı PCR cihazında yapılmıştır. Bu işlem için yine *T. gondii* DNA'sının B1 gen bölgesine spesifik primerler , (5'-GGA ACT GCA TCC GTT CAT GAG-3'), (5'- TCT TTA AAG CGT TCG TGG TC-3'), (TG-TmanF TCC CCT CTG CTG GCG AAA AG), (TG-TmanR AGC GTT CGT GGT CAA CTA TCA TTG) ve prob (FAM-TCT GTG CAA CTT TGG TGT ATT CGC A- TAMRA), (Metis Biyoteknoloji LTD. Ankara) içeren karışım hazırlanarak kapiller tüplere test başına 8 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Daha sonra üzerine birinci tur ürününden 2 µl eklenerek Light Cycler (Roche, Almanya) cihazında çalışılmıştır. Sonuçlar F₂/ F₁ floresan kanalında okunarak, 95°C'deki erime noktası (Tm) değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 80 örnekten üç örnekte (%3,75) *T. gondii* DNA'sı pozitif bulunmuştur. Bunlardan biri yenidoğan kliniğinden gönderilen bebeğe ait BOS örneği (Şekil.1) ile ikisi kadın doğum kliniğinden gönderilen gebe kadınlardan alınan amnion sıvısı örneği idi. BOS örneği pozitif sonuç veren bebeğin kan örneğinde *Cytomegalovirus* DNA'sı da gerçek zamanlı PZR yöntemi ile pozitif, *T. gondii* DNA'sı negatif olarak saptanmıştır. Aynı hastanın yapılan serolojik incelemelerinde anti- *T. gondii* IgM negatif, anti- *T. gondii* IgG pozitif (>539 IU/ml), Sabin-Feldman Dye testi pozitif (1/1024), anede yapılan IgG avidite testi yüksek (>%30) olarak tespit edilmiştir. Klinik olarak hastada hidrosefali ve retinopati bulguları saptanmış, yapılan radyolojik incelemelerde serebral kalsifikasyonlar tespit edilmiş ve tedavisinde primetamin (1mg/kg/gün) ile leucovorin (10 mg/kg/gün) kullanılmıştır. Olgu pediatri kliniği tarafından takibe alınmıştır. Amnion örneğinde *T. gondii* DNA'sı pozitif saptanan gebe kadınların, serolojik incelemelerinde anti-*T. gondii* IgM değerleri negatif, kadınlardan birinin anti-*T. gondii* IgG değeri pozitif (47 IU/ml), diğerinin anti- *T. gondii* IgG değeri düşük titrede pozitif (5.9 IU/ml) olarak saptanmıştır. Bu hastaların avidite testleri yapılmamıştır. Her iki hastanın doğumdan sonra be-

beklerinde yapılan serolojik incelemede anti- *T. gondii* IgM değerleri negatif olarak tespit edilmiştir. Bu olguların ilkinde 20. haftadan doğuma kadar spiramisin (3gr/gün) tedavisi verilmiş, gebelik süresi boyunca yapılan ultrasonografik incelemelerde fetüste anomaliye rastlanmamıştır. Doğumdan sonra da bebekte herhangi bir klinik bulgu tespit edilmemiş ve pediatri kliniği tarafından uzun süreli takibe alınmıştır. İkinci olgu hastanemizde takip edilmediği için bilgilerine ulaşılamamıştır. Diğer 77 hasta örneğinde *T. gondii* DNA'sı negatif olarak tespit edilmiştir.



Şekil 1. *T. gondii* DNA'sı tespit edilmiş örneğin Light Cycler cihazının bilgisayar ekranındaki görüntüsü (Mavi çizgi: Hasta örneği, Yeşil çizgi: Negatif kontrol, Kırmızı çizgi: Pozitif kontrol)

TARTIŞMA

Son yıllarda PZR teknikleri arasında ümit verici olarak gelişen gerçek zamanlı PZR yöntemi toxoplasmosis tanısında da kullanılmaya başlamıştır. Gerçek zamanlı PZR; nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalinin ölçülmesiyle kantitatif sonuç alınabilen spesifik tedavi seçeneğine olanak sağlayan bir PZR yöntemidir. Aynı zamanda hızlı tanı sağlaması ve tüpler açılmadan testin tamamlanması nedeniyle kontaminasyon riskini azaltan ve yanlış pozitif sonuçların ortaya çıkmasını engelleyen bir yöntemdir (15, 22).

T. gondii DNA'sını tespit etmek için PZR yöntemiyle yapılan çeşitli çalışmalarda yanlış negatif sonuçlara ve immün yetmezlikli hastalar arasında belirli yöntemlerle yapılan çalışmalar arasında büyük farklılıklara rastlanmıştır. Bu durumun hastalığın patofizyolojisinden kaynaklandığı gibi aynı zamanda parazitin materyallerde çalışma sırasında bulunmamasının da testin performansını olumsuz etkilediği gözlenmiştir. Duyarlılıktaki değişkenlik amniosentezin farklı gebelik dönemlerinde yapılmasına ve araştırmacıların kullandıkları farklı

primerlere bağlanmıştır. Bu sorunun çözülmesi için daha fazla tekrarlayan ve polimorfik olmayan DNA hedeflerinin kullanılmasının yardımcı olabileceği belirtilmiştir (15). P30 ve ribozomal DNA hedefleriyle yapılan çalışmalara göre, tekrarlayan B1 gen bölgesini hedef alan çalışmalarda duyarlılık (0.05 parazit/reaksiyon) yüksek bulunmuştur (4, 6, 18). Bu amaçla Reischl ve ark. (22) 230-330 arasında tekrarladığı belirtilen 529 bç'lik yeni bir DNA parçasını hedef olarak kullanarak gerçek zamanlı PZR yönteminde çalışmışlar ve B1 genine göre on kat daha fazla sulandırımında ve 3.5 siklus öncesinde parazitini saptanabildiğini göstermişlerdir.

Çalışmamızda 54 amnion örneğinin ikisinde, altı BOS örneğinin birinde *T. gondii* DNA'sı pozitif olarak saptanmıştır. Amnion örneği alınan hastaların eş zamanlı yapılan ELISA incelemelerinde IgM antikor titrelere negatif, IgG antikor titresi bir hastada yüksek (47 IU/ml), diğer hastada düşük titrede pozitif (5.9 IU/ml) olarak belirlenmiştir. BOS örneğinde *T. gondii* DNA'sı pozitif belirlenen hastanın kan örneğinde DNA saptanamamıştır. Yapılan Sabin-Feldman Dye testi pozitif (1/1024) ve IgG titrelere yüksek (>539 IU/ml), IgM negatif, anne IgG aviditesi yüksek(>%30) olarak tespit edilmiştir.

Kurdova ve ark. (17) çalışmalarında 10 amniotik örneğin ikisinde, 85 serum örneğinin üç tanesinde PZR yöntem ile pozitiflik saptamışlar ve sonuçlarının serolojik testlerle de uyumlu olduğunu göstermişlerdir. Primer olarak B1 geninden amplifiye ettikleri kısmı kullanmışlardır. Fuentes ve ark. (11) konjenital Toxoplasmosis şüpheli hastaların kan, BOS ve idrar örneklerinden PZR ile DNA araştırmışlar ve örneklerin bazılarında negatif sonuç elde ettiklerini, bu nedenle aynı hastaya ait farklı örneklerin birlikte çalışılmasının DNA izolasyon oranını artırabileceğini belirtmişlerdir. Primer olarak B1 geninden amplifiye ettikleri kısmı kullanmışlardır. Antsaklis ve ark. (1) Gebelikleri sırasında *T. gondii* açısından serokonversiyon gösteren 93 gebede fetal infeksiyon tanısını çeşitli yöntemlerle araştırdıkları çalışmalarında amnion sıvısının fare inokülasyonunda duyarlılığını %61.1, PZR ile DNA izolasyonunun duyarlılığını %83,3, her iki testin birlikte kullanılmasında %94,4, kord kanında spesifik IgM aranmasında ise negatif sonuç elde ettiklerini bildirmişlerdir. Romand ve ark. (23) 270 toksoplazmosisli gebeyi kapsayan çok merkezli çalışmalarında, konjenital toksoplazmosisli 75 yenidoğanın prenatal dönemde annelerinden alınan amnion sıvılarının 48'inde DNA pozitif olarak tespit etmişler, böylelikle amniotik sıvının PZR ile incelenmesinin duyarlılığını %64, özgüllüğünü %100 olarak belirlemişler, en yüksek duyarlılık oranlarını gebeliğin 17-21 haftaları arasında yaptıkları amniosentez incelemesinde elde ettiklerini belirtmişlerdir. Foulon ve ark. (12) yaptıkları çok merkezli çalışmalarında gebelikleri boyunca serokonversiyon gösteren 122 gebenin amniotik sıvısında fare inokülasyonu, hücre kültürü, PZR ile DNA izolasyonu, fetal kandan fare inokülasyonu, spesifik IgM ve IgA araştırmışlardır. En yüksek duyarlılığı (%81) (özgüllük %96) PZR yöntemiyle elde etmişler, fare inokülasyonu ile

kombinasyon sonucunda duyarlılığı %91 olarak belirlemiştir. Fetal kandaki spesifik IgM ve IgA duyarlılıklarını ise %47 ile %38 olarak saptamışlardır. Bou ve ark. (7) oküler toksoplazmosisli hastalarda PZR yönteminin duyarlılığını araştırdıkları çalışmalarında 56 immun yeterli olgudan IgG düzeyi yüksek, IgM düzeyi negatif olan 15 olgu ile diğer 41 olgunun kan ve aköz sıvı örneklerinde DNA araştırmışlar, belirtilen yöntemin duyarlılığını %53,3, özgüllüğünü %83 olarak bildirmişlerdir. Her iki materyalden alınan sonuçların aynı olması nedeniyle, oküler Toxoplasmosis tanısında, örnek almak için göze invaziv girişim yapılamaksızın sadece kanla çalışılabileceğini savunmuşlardır. Costa ve ark. (8) kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda Toxoplasmosis reaktivasyonunun tanısında gerçek zamanlı PZR yöntemini kullanmışlar, hem tanıda hem de kantitatif sonuçlarla tedavi takibinde faydalı bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Yine Menotti ve ark. (19) kemik iliği transplantasyonu geçiren bir vakada gelişen serebral Toxoplasmosis tanısını gerçek zamanlı PZR yöntemiyle tanımlamışlar, ELISA sonuçlarıyla uyumlu olduğunu saptamışlardır. Parazitin buffy coat örneklerinde, kan, serum ve BOS örneklerinden daha erken izole edildiğini belirtmişlerdir.

Sonuç olarak immun yetmezlikli hastalarda ve gebe kadınların aktif enfeksiyonunda hızlı ve doğru tanı, tedaviye başlamak için gereklidir. Bu nedenle aktif enfeksiyonun serolojik tanısında IgM varlığı, yakın geçirilmiş enfeksiyonu her zaman göstermemesi ve reaktivasyona her zaman antikor değişikliklerinin eşlik etmemesi nedeniyle yetersiz kalabilmektedir. Bu nedenle gerçek zamanlı PZR uygulamasının duyarlı, spesifik ve de çeşitli vücut sıvıları ile doku örneklerinden DNA izolasyonunu sağlayan, yeni gelişen bir tanı yöntemi olduğu ve fetusa invaziv girişimler yapılmasını önleyerek büyük bir gelişme sağladığı kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Antsaklis A, Daskalakis G, Papantoniou N, Mentis A, Michalas S, 2002. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenat Diagn.*, 22(12):1107-11.
2. Araz R E, Babür C, Tanyüksel M, 2000. Toxoplasmosis tanısında kullanılan test kitlerinin (ELISA, IFA) hazırlanması, PCR kullanımının geliştirilmesi. *T Parazitol Derg*, 24(4):337-342.
3. Bahar İ H, Kırdar S, Celiloğlu M, Karaman M, Yılmaz Ö, 2003. *Toxoplasma gondii* tanısında özgül IgA antikorlarının tanimsal değeri. *T Parazitol Derg*, 27(3):165-169.
4. Bastien P, 2002. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 96(Suppl1):205-215.
5. Beaman MH, McCabe RE, Wong SY, Remington JS, 1995. *Toxoplasma gondii*. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practise of infectious diseases. Fourth edition, Churchill, Livingstone, p.2455-2475.
6. Buchbinder S, Blatz R, Rodloff AC, 2003. Comparison of real-time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii*. *Diag Microbiol Infect Dis*, 45:269-271.
7. Bou G, Figueroa MS, Marti-Belda P, Navas E, Guerrero A, 1999. Value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor and blood samples from immunocompetent patients with ocular toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*, 37(11):3465.
8. Costa JM, Pautas C, Ernault P, Foulet F, Cordonnier C, Bretagne S, 2000. Real-time PCR for diagnosis and follow-up of toxoplasma reactivation after allogenic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *J Clin Microbiol*, 38(8):2929-2932.
9. Çetin ET, Anğ Ö, Töreci K, 1995. *Tıbbi Parazitoloji*. 5.baskı İstanbul İ.Ü Basımevi, s.143-153.
10. Demirci M, Cicioğlu Arıdoğan B, Can R, Kaya S, 2001. Isparta'da değişik gruplarda Toxoplasmosis seroprevalansı. *T Parazitol Derg*, 25(2):107-109.
11. Fuentes I, Rodriguez M, Domingo CJ, Castillo F, Juncosa T, Avlar J, 1996. Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol*, 2368-2371.
12. Foulon W, Pinon JM, Stray-Pedersen B, Pollak A, Lappalainen M, Decoster A, Villena I, Jenum PA, Hayde M, Naessens A, 1999. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: a multicenter evaluation of different diagnostic parameters. *Am J Obstet Gynecol*, 181(4):843-7.
13. Garcia LS, 2001 *Diagnostic Medical Parasitology* Fourth Edition . ASM Pres. p.132-142.
14. Gürüz Y, Dayangaç N, Korkmaz M, 2002. Toxoplasmosis tanısında "yakalama" ELISA IgM yönteminin geliştirilmesi ve ticari kit ile karşılaştırılması. *T Parazitol Derg*, 26(4):342-346
15. Işık N, Ağaçfidan A, 2004. Enfeksiyon hastalıklarının tanısında "real-time polimeraz zincir reaksiyonunun kullanımı. *İnfek Derg.*, 18(1):125-130.
16. Keçeci T, Handemir E, Koşan E, Kaya N, 2001. Toxoplazmosisin insanlardaki bazı hematolojik ve biyokimyasal değerler üzerindeki etkisi. *T Parazitol Derg*, 25(1):9-12.
17. Kurdova R, Krüger D, Janitschke K, 1998. Polymerase chain reaction (PCR) in the laboratory diagnosis of acute toxoplasmosis. *ExpPathol Parasitol*, 1:55-61.
18. Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP, 2000. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol*, 38(11):4121-4125.
19. Menotti J, Vilela G, Romand S, Garin YJF, Ades L, Gluckman E, Derouin, Ribaud P, 2003. Comparison of PCR – Enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of an unusual case of cerebral toxoplasmosis in a stem cell transplant recipient. *J Clin Microbiol*, 41(11):5313-531.
20. Montaya JG, 2002. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *JID*, 185(Suppl 1):873-82.
21. Polat E, Aslan M, Isenkul R, Aygün G, Aksın N, Çepni İ, Altaş K, 2002. Gebe kadınlarda *Toxoplasma gondii* IgM ve IgG antikorlarının ELISA yöntemi ile araştırılması. *T Parazitol Derg*, 26(4):350-351.

22. **Reischl U, Bretagne S, Krüger D, Ernault P, Costa JM**, 2003. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect Dis*, 3:7.
23. **Romand S, Wallon M, Franck J, Thulliez P, Peyron F, Dumon H**, 2001. Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. *Obstet Gynecol*, 97(2):296-300.
24. **Saygi G**, 2002. *Temel Tıbbi Parazitoloji*. 2. baskı Sivas Es-Form Ofset Ltd. Şti. s.87-90
25. **Türk M, Güngör S, Bayram D, Bilgin N, Er Hakan, Kurultay N, Türker M**, 2004. İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesine bir yılda başvuran toksoplazmosis şüpheli hastaların ELISA yöntemiyle taranması. *T Parazitol Derg*, 28(2):80-82.
26. **Yolaşğmaz A, Şakru N, Yazar S, Aküsü Ç, Gürüz AY, Kuman HA, Altıntaş N**, 2003. Investigation of anti-toxoplasma antibodies in residence of urban and rural areas. *T Parazitol Derg*, 27(2):81-84.