

# Giresun'da Su Örneklerinde *Toxoplasma gondii*'nin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve İlmiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon Yöntemleriyle Araştırılması\*

## Investigation on *Toxoplasma gondii* by Polymerase Chain Reaction and Loop-Mediated Isothermal Amplification in Water Samples from Giresun, Turkey

Elif DEMİREL<sup>1</sup>, Zeynep KOLÖREN<sup>1</sup>, Ülkü KARAMAN<sup>2</sup>, Emine AYAZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ordu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu.

<sup>1</sup> Ordu University Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Ordu, Turkey.

<sup>2</sup> Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Ordu.

<sup>2</sup> Ordu University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Ordu, Turkey.

\* Bu çalışma, 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi (29 Eylül-5 Ekim 2013, Denizli)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 27.03.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 12.08.2014

### ÖZET

Toksoplazmoz, immün sistemi yeterli yetişkinlerde çoğu zaman asemptomatik geçirilmekle birlikte, immün sistemi baskılanmış kişilerde ve gebe kadınlarda ciddi tablolara yol açabilir. Ülkemizde genel popülasyondaki ortalama *Toxoplasma gondii* seroprevalansının %40 oranında olması, bu grup olgularda akut toksoplazmoz gelişme riskinin yüksek olduğunu düşündürmektedir. *T.gondii*'nin bulaşma yollarından biri de kontamine suların tüketimidir. Bu çalışmada, çevresel su ve içme suyu örneklerinde, standart polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP) yöntemleri ile *T.gondii*'nin varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Giresun il merkezi ile çeşitli ilçelerindeki (Piraziz, Bulancak, Keşap, Espiye) derelerden alınan 76 çevresel kaynaklı su örneği ile 20 içme suyu örneği olmak üzere toplam 96 örnek dahil edilmiştir. Örnekler alüminyum sülfatla çöktürüldükten sonra sükröz gradient yöntemiyle pellet oluşturulmuş ve DNA izolasyonu yapılarak PCR ve LAMP yöntemleri uygulanmıştır. Her iki yöntemde de parazitin B1 genine özgül F3 ve B3 primerleri kullanılmıştır. Çalışmamızda, içme suyu örneklerinde PCR ve LAMP ile *T.gondii* varlığı saptanmamış; ancak çevresel su örneklerinin %13.2 (10/76)'sinde *T.gondii* DNA pozitifliği tespit edilmiştir. Her iki yöntem ile alınan sonuçların aynı olduğu izlenmiştir. Parazitin tespit edildiği istasyonlar, Giresun merkezinde Aksu; Espiye ilçesinde Gelivera; Keşap ilçesinde Yolağzı, Keşap, Keşap giriş köprüsü; Bulancak ilçesinde Bulancak, Karadere, İncivez; Piraziz ilçesinde Piraziz ve Çayırağzı dereleridir. *T.gondii*'nin kloramaya karşı dayanıklı olması ve

**İletişim (Correspondence):** Yrd. Doç. Dr. Ülkü Karaman, Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Cumhuriyet Yerleşkesi, Ordu, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 553 598 8463, **E-posta (E-mail):** ulkukaraman44@hotmail.com

filtrasyon işlemlerinin yetersiz kalması nedeniyle, bu parazit, nem oranı yüksek yerlerde ve çevredeki dere, deniz ve içme suları ile temas eden insan ve hayvanlar üzerinde ciddi bir tehlike oluşturmaktadır. Yapılan literatür taramasında, ulaşılabildiği kadarıyla, bölgemizde su kaynaklı *T.gondii* konusunda bir çalışmaya rastlanmadığından, bu çalışmanın Karadeniz Bölgesinde bulunan Giresun ilinde su kökenli *T.gondii* hakkında literatüre bir katkı sağladığı düşünülmüştür. Sonuç olarak, gerekli dezenfeksiyon işlemlerinin ve atık su tahliye öncesinde arıtma işlemlerinin yapılmasının, su kaynaklı toksoplazmozı engelleyebileceği kanısına varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** *Toxoplasma gondii*; su kaynakları; PCR; LAMP; Giresun.

## ABSTRACT

Toxoplasmosis is generally asymptomatic in immunocompetent subjects, however serious manifestations of the disease may develop in immunocompromised patients and in pregnant women. The mean *Toxoplasma gondii* seroprevalence which is approximately 40% in Turkish population, indicates the high risk for the development of acute toxoplasmosis in those cases. One of the transmission ways of *T.gondii* is the consumption of contaminated water. The aim of this study was to detect the presence of *T.gondii* in the environmental and drinking water samples by using standard polymerase chain reaction (PCR) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) methods. A total of 96 water samples, of them 76 were environmental water samples collected from creeks in Giresun province center and its various districts (Piraziz, Bulancak, Keşap, Espiye) and 20 from drinking water samples, were included in the study. The samples were precipitated by the aluminium sulfate method and DNAs were isolated from the pellets formed with the sucrose gradient method. PCR and LAMP were applied to the isolated DNAs, by the use of primers F3 and B3 specific to B1 gene of the parasite. In our study, *T.gondii* was detected in none of the drinking water samples by PCR and LAMP, however *T.gondii* DNAs were positive in 13.2% (10/76) of the environmental water samples. Both of the methods yielded the same results in those samples. The stations that were positive for *T.gondii* were Aksu creek in Giresun province center; Gelivera creek in Espiye; Yolağzı, Keşap, Keşap Login Bridge creeks in Keşap; Bulancak, Karadere and İncivez creeks in Bulancak; Piraziz and Çayırağzı creeks in Piraziz counties. Resistance of *T.gondii* to chlorination and the inadequacy of the filtration processes, create a serious threat among people in contact with rivers, sea and drinking waters particularly in areas with high humidity. As far as the national literature was considered, no report about the water-borne *T.gondii* infections were detected in Giresun province of Black Sea region, Turkey. Thus this study will aid to the literature related to water-borne *T.gondii* infections. The results of this study emphasizes the essential need for appropriate disinfection procedures and purification processes before the discharge of waste water to prevent the cases of water-borne toxoplasmosis.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*; water sources; PCR; LAMP; Turkey.

## GİRİŞ

Apicomplexa grubundaki *Toxoplasma* cinsinin, insan, diğer memeliler ve kanatlılarda hastalığa neden olabilen tek türü *T.gondii* olup, son konağı kedi ve kedigiller, ara konağı ise başta insan olmak üzere çeşitli omurgalı canlılardır<sup>1</sup>. Toksoplazmoz seropozitifliği dünya genelinde %5-90 arasında değişmektedir<sup>2</sup>. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise toksoplazmoz prevalansının %12-65 arasında olduğu bildirilmiştir<sup>3</sup>.

Parazit insanlara farklı yollarla bulaşarak enfeksiyona neden olabilir. Kedilerin dışkıları ile saçılan ookistlerin kaza ile alınması, bradizoit formları içeren etlerin çiğ veya az pişmiş yenilmesi en önemli bulaş yolu olarak kabul edilmektedir<sup>1</sup>. Diğer bir bulaş kaynağı ise

sulardır; atıklarla doğrudan temas veya atıkların karıştığı suların tüketimi ile dolaylı olarak gerçekleşmektedir. Yapılan araştırmalarda içme suyu temini ve rekreasyonel kullanıma açık sularda mikrobiyolojik kirlenmenin önemli bir sorun oluşturduğu belirtilmiştir<sup>4,5</sup>.

Toksoplazmoz tanısı farklı yöntemlerle konulabilmektedir. Son yıllarda, polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction; PCR) sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir<sup>4,5</sup>. Yine moleküler yöntemlerden olan ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (Loop-mediated isothermal amplification; LAMP) yöntemi, pek çok viral, bakteriyel, fungal ve protozoal hastalıkları tespit etmek için kullanılmaktadır. Son zamanlarda bu yöntem, yeni gelişen gen çoğaltma yöntemi olarak parazitik enfeksiyonların (malarya, tripanosomiyaz, theilerioz, babesioz, toksoplazmoz, kriptosporidiyoz ve giardiyaz) teşhisinde kullanım alanı bulmuştur<sup>4,6</sup>. Bu çalışmada, çevresel su örneklerinde *T.gondii* varlığının standart PCR ve LAMP yöntemleri kullanılarak saptanması ve yöntemlerin pozitiflik oranlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

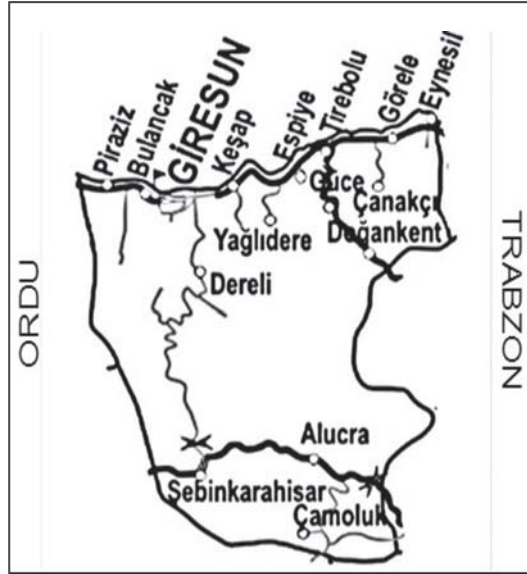
## GEREÇ ve YÖNTEM

### Örneklerinin Toplanması

Çalışma için, Giresun il merkezi ve ilçelerindeki çevre sularından 76 ve içme sularından 20 su örneği toplandı; Giresun ili çalışma bölgesindeki istasyonlar Şekil 1’de gösterildi.

### Ookistlerinin Saflaştırılması

Su örnekleri Giresun il merkezi ve ilçelerinde belirlenen istasyonlardan, 10 litrelik plastik şişelerle toplandı. Karanis ve Kimura’nın<sup>7</sup> çöktürme metodu kullanılarak her bir su örneğinin içine 20 mL alüminyum sülfat çözeltisi eklendi. Daha sonra pH 5.4-5.8 arasın-



Şekil 1. Giresun ili ve örnek alınan istasyonların haritası.

da ayarlanarak 22 saat karanlık ortamda bekletildi. Bekleyen su örneklerinin dibinde 200 ml kalacak şekilde üst kısımdaki su bir hortum yardımıyla boşaltıldı. Seri işlemlerle 5 ml'ye indirilen su örneklerine daha önceden hazırlanan lizis tamponu eklendi ve belli aralıklarla çalkalanarak 1 saat bekletildi. Ayrıca, konsantre su örnekleri Kourenti ve Karanis'in<sup>8</sup> uyguladığı protokole göre sükröz gradiyent yöntemiyle saflaştırılıp, üstteki sıvı atıldı. 1 ml'lik pellet ependorf tüplerine alınarak kısa süreli kullanım için +4°C'de saklandı.

### DNA İzolasyonu ve PCR Yöntemi

Sükröz gradient yöntemiyle saflaştırılan örneklerden DNA izolasyonu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, ABD) protokolü modifiye edilerek yapıldı<sup>9,10</sup>. Buna göre, örneklerin üzerine lizis tamponu eklendikten sonra 15 kez sıvı azot içerisinde dondurma-çözme işlemi uygulandı. Daha sonra örnekler sıvı azot ile kaynama sıcaklığında 1 dakika bekletilerek, ookist duvarlarının tamamen kırılması sağlandı. Son aşamada ise kit protokolü takip edildi.

Klasik PCR reaksiyon karışımı 25 µl son hacimde hazırlandı. Bu amaçla; Hot Start Taq DNA polimeraz kiti (10x PCR tamponu, 5x Q solution, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 U hotstart taq DNA polimeraz) (Qiagen), 25 mM dNTP karışımı, 10 pmol B1 genine özgül F3 ve B3 primerleri ve 1 µl DNA kullanıldı. Amplifikasyon PeqLab PCR cihazında (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Almanya) gerçekleştirildi. Her bir PCR uygulaması için pozitif ve negatif kontroller kullanıldı. Amplifiye ürünler etidyum bromür ile boyandı ve %1.5'lik agaraya yüklendi. Jel elektroforezinde 100 V'ta 60 dakika yürütülerek UV altında (Prizma/Quantum ST4) değerlendirildi.

### DNA'nın LAMP Metoduyla Görüntülenmesi

LAMP reaksiyon tüpü için RM tamponu [(40 mMTris-HCl (pH: 8.8), 20 mM KCl, 16 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.6 M Betaine ve %0.2 Tween 20)] ve primer karışımı (20 pmol FIP ve BIP primerleri ve 2.5 pmol F3 ve B3 primerleri) ile hazırlanan reaksiyon karışımı, toplam hacim 25 µl'de Kolören ve Demirel'in<sup>4</sup> izlediği yöntemle uygulandı. RM tamponu ve primer karışımı dahil 8 U Bst DNA polimeraz (New England Biolabs, Japonya) ve 2 µl DNA örneği kullanılarak LAMP reaksiyon tüpü elde edildi. Bu karışım 65°C'de 1 saat ve 80°C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. DNA'lar etidyum bromür içeren %1.5 agaroz jelde UV ışığı altında gözlemlendi.

### BULGULAR

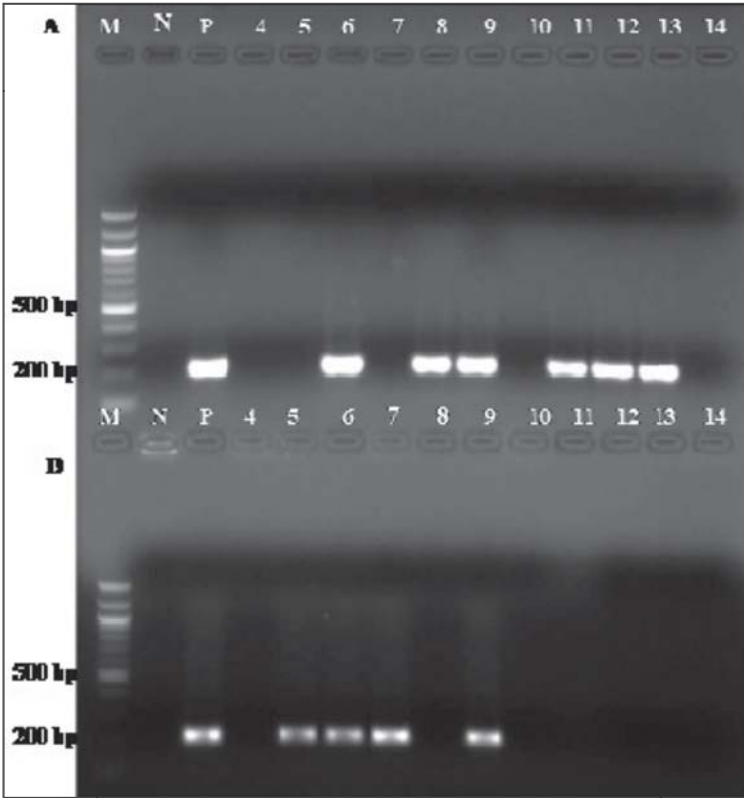
Çalışmada, toplanan içme suyu örneklerinde standart PCR yöntemiyle *T.gondii* tespit edilmemiş; ancak 76 çevresel su örneğinin 10 (%13.2)'unda her iki yöntemle de *T.gondii* pozitifliği saptanmıştır (Tablo I). Çalışmamızda standart PCR yöntemiyle elde edilen agaroz jel görüntüsü Şekil 2'de, LAMP yöntemi ile elde edilen agaroz jel görüntüsü ise Şekil 3'te sunulmuştur.

### TARTIŞMA

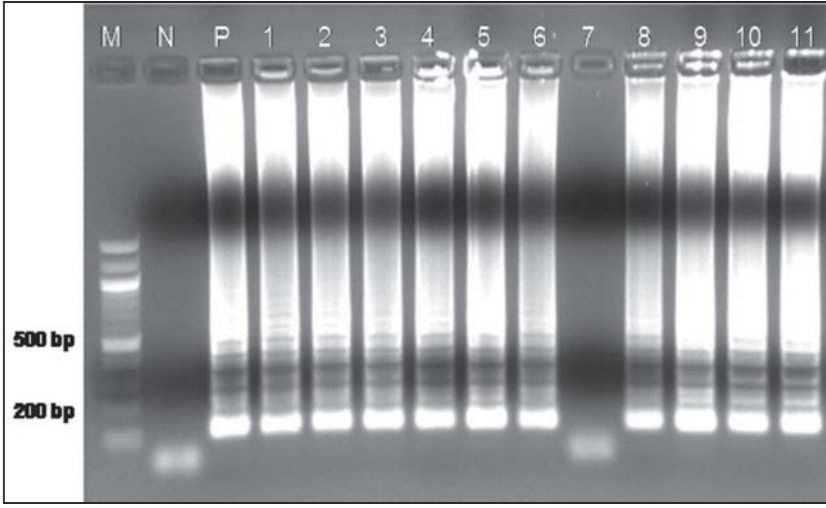
Ülkemizdeki beslenme kültürü (çiğ köfte vb. tüketimi), sosyoekonomik koşullar ve geçim kaynağı olarak hayvancılığın yaygın olması, *T.gondii* enfeksiyonlarının yüksek

**Tablo 1.** Çevresel (Irmak) Su Örneklerinde LAMP ve PCR Yöntemleriyle *T.gondii* Pozitifliğinin Dağılımı

İstasyon (incelenen örnek sayısı)	Örneklerin kaynağı	Pozitif örnek sayısı	Olgu sayısı (%)
Giresun merkez (24)	Aksu deresi	1	1
Piraziz (12)	Piraziz ve Çayırağzı dereleri	2	2
Bulancak (16)	Bulancak, Karadere ve İncivez dereleri	3	3
Keşap (18)	Yolağzı, Keşap ve Keşap Giriş Köprüsü dereleri	3	3
Espiye (6)	Gelivera deresi	1	1
Toplam (76)		10 (%13.2)	10 (%13.2)

**Şekil 2.** Su örneklerinin standart PCR ile elde edilen agaroz jel görüntüleri [Hat M: Moleküler belirteç (100 bp DNA ladder); Hat N: Negatif kontrol; Hat P: Pozitif kontrol; Hat 4-14: Su örnekleri].

seroprevalansını açıklamaktadır<sup>1</sup>. Toksoplazmoz tanısında, rutin laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan serolojik testlerin yanı sıra, PCR ile beyin dokusu, beyin omurilik sıvısı, amniyon sıvısı gibi doku örneklerinde ve kanda parazit DNA'sının saptanması mümkündür. PCR ile *T.gondii*'nin tespitinde rDNA, SAG-1, B1 ve B30 genleri kullanılmaktadır<sup>11</sup>.



Şekil 3. Su örneklerinin LAMP yöntemi ile elde edilen agaroz jel görüntüleri [Hat M: Moleküler belirteç (100 bp DNA ladder); Hat N: Negatif kontrol; Hat P: Pozitif kontrol; Hat 1-11: Su örnekleri].

Bu çalışmada da, daha önce Sotiriadou ve arkadaşları<sup>10</sup> tarafından çalışılan ve duyarlı olduğu bildirilen *T.gondii* B1 geninin amplifikasyonu yapılmıştır. Jones ve Dubey<sup>12</sup> da, su kaynaklarında *T.gondii*'nin saptanmasında PCR testinin yüksek özgüllüğe sahip olduğunu belirtmişlerdir. LAMP yöntemi ise, PCR yönteminin aksine, sabit sıcaklıkta (60-70°C) sonuç vermesi, basit ve kapalı sistem olduğundan kontaminasyon riskinin az olması ve kullanılan primerlerin özelliği nedeniyle duyarlılık ve özgüllüğünün daha yüksek olması gibi nedenlerle protozoonların tanısında umut vadetmektedir<sup>6</sup>. Tek bir yöntemle %100 doğru sonuç alınamamasına rağmen bu testlerin birlikte kullanılması duyarlılığı büyük oranda artırmaktadır<sup>1,4,5</sup>.

Su kaynaklarında *T.gondii* varlığının araştırıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur. Kourenti ve Karanis<sup>8</sup>, 14 aylık süre boyunca topladıkları farklı kalite ve kökenli 60 su örneğinin 4 (%6.7)'ünde *T.gondii* DNA'sını pozitif olarak saptamışlardır. Kolören ve Demirel<sup>4</sup> de çalışmalarında, ırmak, göl ve şebeke sularından alınan toplam 60 su örneğinin 15 (%25)'inde LAMP yöntemiyle *T.gondii* varlığını göstermişlerdir. Yine Kolören ve Demirel<sup>15</sup>, 120 yüzeysel su örneğinin 48 (%40)'ünde *T.gondii* DNA'sını "nested"-PCR ile tespit etmişler; ancak içme suyu örneklerinin hiçbirinde bu parazite rastlamamışlardır. Başka bir çalışmada da, Ordu ili Melet ırmağının üç farklı noktasından alınan toplam 60 su örneğinde "nested"-PCR yöntemi ile *T.gondii* pozitifliği saptanmıştır<sup>13</sup>. Aubert ve Villena'nın<sup>14</sup> çalışmasında, 482 çevresel su örneğinin 27 (%7.7)'sinde PCR yöntemi ile *T.gondii* varlığı tespit edilmiştir. Sroka ve arkadaşları<sup>15</sup>, çiftliklerde, aynı zamanda içme suyu olarak kullanılan kuyu sularının %27.2 (31/114)'sinin *T.gondii* ile kontamine olduğunu PCR ile göstermişlerdir. Zhang ve arkadaşları<sup>16</sup>, su örneklerinde *T.gondii* DNA pozitifliğini standart PCR ve LAMP yöntemleriyle sırasıyla %76.9 ve %85.7 olarak; Sotiriadou ve Karanis<sup>10</sup> ise "nested"-PCR ve LAMP yöntemleriyle sırasıyla %13.5 ve %48 olarak tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da, standart PCR ve LAMP yöntemleri birlikte kullanılarak hem

duyarlılığın artırılması amaçlanmış hem de iki teknik arasında farklılığın olup olmadığı değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda, hem LAMP hem de PCR yöntemi ile toplanan çevresel su örneklerinin %13.2 (10/76)'sinde *T.gondii* pozitifliği tespit edilmiş; her iki yöntemle de aynı sonuçlar alınmıştır (Tablo I).

Türkiye'de, genel popülasyondaki ortalama *T.gondii* seroprevalansının %40 olduğu düşünüldüğünde, immün yetmezliği olan hastalar ile gebelerde akut toksoplazmoz riskinin yüksek olduğu görülmektedir<sup>17</sup>. Dolayısıyla riskli gruplara, kedi temasının önlenmesi, az pişmiş veya çiğ etlerin yenmemesi ve iyi yıkanmamış sebze ve meyvelerin tüketilmemesi gibi konularda bilgi verilirken, çevresel su tüketiminin önemine de dikkatin çekilmesi gerekmektedir. Bu konuda alınması gereken önemli önlemlerden biri de, atık su tahliye borularının direkt olarak alıcı ortama bırakılmadan önce arıtımının yapılmasıdır. Aksi takdirde, arıtılmadan boşaltımı yapılan atıkların bırakıldığı çevresel sularda insana bulaş gerçekleşebilmektedir. Zira, normal derişimlerde yapılan dezenfeksiyon işlemleri, amip kistleri, bazı helmint yumurtaları, bakteri sporları, tüberküloz basilleri ve bazı viruslar üzerinde etki göstermezler. *T.gondii*'nin de klorlamaya karşı dayanıklı olması ve filtrasyon işlemlerinin yetersiz kalması, bu parazitin nem oranı yüksek yerlerde ve yakın çevresindeki dereler, deniz ve kontrolü yapılmayan içme sularıyla temas halindeki insan ve hayvanlar için potansiyel bir risk oluşturmasına yol açmaktadır. Dolayısıyla, paraziter enfeksiyonların bulaşının önlenmesi için, suyla geçen diğer patojenlere karşı uygulanan önlemlere ilave stratejilerin oluşturulması, güvenli su kullanımı için gereklidir<sup>18</sup>. Sonuç olarak bu çalışmanın, Giresun'un yeni bir çalışma alanı olarak tanımlanması ve bölgede araştırılan diğer su kaynaklı protozoonlar üzerinde yapılan moleküler çalışmalara katkı sağlaması açısından önemli olduğu düşünülmüştür.

## KAYNAKLAR

1. Saygı G. *Toxoplasma gondii* ve Toksoplazmoz, s: 71-7. Temel Tıbbi Parazitoloji. 2002. Esnaf Ofset Matbaacılık, Sivas.
2. Gürüz AY, Özcel MA. Toksoplazmozis, s: 141-84. Özcel MA (ed), Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. 2007. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, No: 22, İzmir.
3. Yolasiğmaz A, Şakru N, Yazar S, et al. Investigation of anti-toxoplasma antibodies in residence of urban and rural areas. Türkiye Parazitol Derg 2003; 27(2): 81-4.
4. Kolören Z, Demirel E. Detection of *Toxoplasma gondii* in Turkish river and drinking water samples by different PCR and LAMP Methods. Clean Soil Air Water 2013; 41(10): 963-8.
5. Kolören Z, Demirel E. Investigation on *Toxoplasma gondii* in surface and drinking water samples from Amasya by nested polymerase chain reaction. Journal of Applied Biological Sciences 2013; 7(2): 10-3.
6. Kolören Z, Avcı Ş, Şekeroğlu ZA. Protozoonların tanısında ilmiğe dayalı izotermal çoğaltma yöntemi (LAMP). Türkiye Parazitol Derg 2010; 34(4): 207-11.
7. Karanis P, Kimura A. Evaluation of three flocculation methods for the purification of *Cryptosporidium parvum* oocysts from water samples. Lett Appl Microbiol 2002; 34(6): 444-9.
8. Kourenti C, Karanis P. Evaluation and applicability of a purification method coupled with nested PCR for the detection of *Toxoplasma* oocysts in water. Lett Appl Microbiol 2006; 43(5): 475-81.
9. Plutzer J, Karanis P, Domokos K, Törökne A, Marialigeti K. Detection and characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Hungarian raw, surface and sewage water samples by IFT, PCR and sequence analysis of the SSUrRNA and GDH genes. Int J Hyg Environ Health 2008; 211(5-6): 524-33.

10. Sotiriadou I, Karanis P. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Toxoplasma gondii* in water samples and comparative findings by polymerase chain reaction and immunofluorescence test (IFT). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 62(4): 357-65.
11. Persing DH. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *J Clin Microbiol* 1991; 29(7): 1281-5.
12. Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis- recent developments. *Exp Parasitol* 2010; 124(1): 10-25.
13. Demirel E, Kolören Z. Ordu İli Melet Irmağından alınan su örneklerinde *Toxoplasma gondii* yaygınlığının nested PCR ile tespiti. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2012, İzmir. Kongre Kitabı, s: 1353.
14. Aubert D, Villena I. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne Region France. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(2): 290-5.
15. Sroka J, Wójcik-Fatla A, Dutkiewicz J. Occurrence of *Toxoplasma gondii* in water from wells located on farms. *Ann Agric Environ Med* 2006; 13(1): 169-75.
16. Zhang H, Thekisoe OM, Aboge GO, et. al. *Toxoplasma gondii*: sensitive and rapid detection of infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Exp Parasitol* 2009; 122 (1): 47-50.
17. Hökelek M. Toxoplazmoz. 1. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu, 14-15 Kasım 2006, Ankara. Erişim: <http://ekmud.org.tr/toplantilar/zoonotik-toplantilar/1-zoonozlar/>
18. Ardıç N. İçme sularında parazit ve diğer patojenlere karşı dezenfeksiyon uygulamaları ve ara konaklarla mücadelede kullanılan kimyasallar. 5. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, 4-8 Nisan 2007, Antalya. Kongre Kitabı, s: 353-65.