

# Kayseri İli Parklarında Bulunan Oyun Alanlarının Askarit Türleri İle Kontaminasyonunun Parazitolojik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması <sup>[1]</sup>

Özlem BOZKURT \*  
Arif ÇİLOĞLU \*

Alparslan YILDIRIM \*   
Zuhal BIŞKIN \*

Abdullah İNCİ \*  
Önder DÜZLÜ \*

[1] Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde yürütülen yüksek lisans tezinden özetlenen bu çalışma ERÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSY-09-964 kodlu proje ile desteklenmiştir

\* Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, TR-38090 Kayseri - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2012-6104

## Özet

Bu çalışma, Kayseri’de toplam 20 mesire alanı ve parktaki çocuk oyun alanlarından toplanan 248 adet toprak örneğinin köpek ve kedi askarit türleri ile kontaminasyon durumunu saptamak amacıyla yürütülmüştür. Bu amaçla 2009 yılının Ağustos ve Ekim ayları arasında her bir parktan toprak örnekleri tekniğine uygun olarak alınmış ve örnekleme sahası köpek ve kedi dışkılarının varlığı yönünden kontrol edilmiştir. Laboratuvarında toprak ve dışkı örnekleri helmint yumurtalarının varlığı yönünden mikroskopik olarak incelenmiştir. Askarit yumurtası belirlenen örneklerden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Askarit türlerini belirleme amacıyla elde edilen genomik DNA’lar *Toxocara canis*, *Toxocara cati* ve *Toxascaris leonina* tür spesifik primerler ile PZR analizine tabii tutulmuştur. Mikroskopik analiz neticesinde 20 parkın 10’u (%50.0) ve 248 adet toprak örneğinin 33’ü (%13.3) askarit ve diğer bazı helmint yumurtaları ile kontamine bulunmuştur. En yaygın tür %7.3 ile *Toxocara sp.* bulunmuş, bunu sırasıyla *Toxascaris leonina* (%4.0), *Spirocerca lupi* (%0.8), *Taenia sp.-Echinococcus sp.* (%0.8) ve *Ancylostoma caninum* (%0.4) izlemiştir. Askarit kontaminasyonu belirlenen toprak örneklerinde moleküler analiz sonuçlarına göre en yaygın tür %12.0 ile *T. canis* bulunmuş, bunu sırasıyla *T. leonina* (%7.5) ve *T. cati* (%3.0) izlemiştir. Türlerin yayılışı arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $P<0.001$ ). Sonuç olarak bu çalışma ile parklardaki oyun alanlarında zoonotik karakterli askarit türlerinin yaygınlığı Türkiye’de ilk kez moleküler olarak ortaya konmuştur.

**Anahtar sözcükler:** Askarit türleri, Park, Oyun alanları, PZR, Kontaminasyon, Kayseri, Türkiye

## Investigation of Contamination with Ascarid Species by Parasitological and Molecular Techniques in Playgrounds in Parks of Kayseri Province

## Özet

This study was designed to determine the contamination status of playgrounds with ascarid species of dogs and cats in Kayseri province of Turkey and was carried out on totally 248 sand samples collected from children playgrounds in 20 picnic areas and parks. For this aim sand samples were collected from each park between August-October 2009 and each sampling area was inspected for the presence of dog and/or cat feces. Sand and feces samples were examined by microscopically for the presence of helmint eggs in the laboratory. Genomic DNA’s were extracted from samples that were positive for ascarid eggs. PCR was performed on obtained genomic DNA’s with primers specific to *Toxocara canis*, *Toxocara cati* and *Toxascaris leonina*. Ten (50.0%) of 20 parks and 33 (13.3%) of 248 sand samples were found to be contaminated with ascarid and some other helmint eggs. *Toxocara sp.* was found as the most prevalent species with the ratio of 7.3% and this was followed by *T. leonina* (4.0%), *Spirocerca lupi* (0.8%), *Taenia sp.-Echinococcus sp.* (0.8%) and *Ancylostoma caninum* (0.4%). Molecular analysis results revealed that *T. canis* was the most prevalent species with the ratio of 12.0% in the ascarid contaminated sand samples, and this was followed by *T. leonina* (7.5%) and *T. cati* (3.0%). The differences among the prevalence rates of species were found statistically significant ( $P<0.001$ ). Consequently, the molecular prevalence of zoonotic ascarid species was designated in the playgrounds of parks for the first time in Turkey with this study.

**Keywords:** Ascarid species, Park, Playground, PCR, Contamination, Kayseri, Turkey



İletişim (Correspondence)



+90 352 2076666/29941



yildirima@erciyes.edu.tr

## GİRİŞ

Hayvanlardan insanlara çok sayıda enfeksiyon etkeni geçmekte ve oluşan bu enfeksiyonlar, "zoonoz" olarak nitelenmektedir<sup>1-3</sup>. Zoonotik enfeksiyonların yayılışında evcil hayvanların önemli rolü bulunmaktadır. Türkiye ve diğer gelişmekte olan ülkeler ile az gelişmiş ülkelerde sahipsiz kedi ve köpek sayısının artış gösterdiği ve sokaklarda başıboş dolaştığı görülmektedir. Zoonotik paraziter enfeksiyonların ortaya çıkabilmesi için hayvanlar tarafından çıkarılan paraziter formların insanlara ulaşması gerekir. Bu açıdan parklardaki oyun alanları önem arz etmektedir. Çoğunlukla etrafı açık olan bu parklara sahipsiz kedi ve köpekler serbestçe girerek buralara dışkılamakta veya evlerinde köpek besleyenler köpeklerini gezdirirken hayvanlar dışkılama ihtiyaçlarını parklarda gidermektedir. Yine son yıllarda çocuk oyun alanı bulunan birçok parkta, özellikle ülkemizde yaygın olan mangal alışkanlığı için alanlar yapıldığı görülmekte olup bu durum da sokak hayvanları için cezbedici bir faktör olarak ortaya çıkmaktadır. Köpek ve kedilerin buralara bıraktığı dışkılarından çeşitli parazitlerin yumurtaları kum veya toprağa karışarak, parklarda oynayan çocuklar için risk oluşturmaktadır. Köpek ve kedilerde yaşamakla beraber insan sağlığı açısından da iç organ ve oküler (göz) larva göçüne sebebiyet veren askarit etkenleri (*Toxocara canis*, *T. cati*) paraziter zoonozlar arasında önemli yer tutmaktadır<sup>2</sup>.

Bu çalışma, Kayseri park ve bahçeleri ile bazı mesire alanlarındaki çocuk oyun alanlarından alınan toprak örneklerinde, kedi ve köpeklerde bulunan askarit türlerine ait yumurtaların saptanması, kontaminasyon oranlarının belirlenmesi, saptanan askarit türlerinin moleküler teşhislerinin yapılması ve çocuk parklarının bulaşma yönünden taşıdığı risk derecesinin belirlenmesi amacıyla planlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Araştırma Sahası

Çalışma Ağustos-Ekim 2009 tarihleri arasında Kayseri merkezde bulunan toplam 20 parkta yürütülmüştür. Örnek toplanan parkların bağlı olduğu merkez, toplanan toprak ve dışkı örneği sayıları kayıt altına alınmıştır.

### Toprak ve Dışkı Örneklerinin Toplanması

Her bir parktan varsa kum havuzu yoksa çocuk oyun alanlarından her 5 metre kare için, 10 cm derinliğinden en az 250-300 gr toprak örneği küçük bahçe kürekleri yardımı ile alınmıştır. Her örnekleme alanı için kürekler temizlenip dezenfekte edilerek kullanılmıştır. Toplanan örnekler naylon poşetlere konularak protokol numarası verilmiş ve laboratuvara getirilmiştir. Her bir parktaki oyun alanı kedi-köpek dışkısı yönünden dikkatlice incelenmiş ve bulunan dışkı örnekleri dışkı kaplarına alınarak protokol numarası verilmiş ve laboratuvara getirilmiştir.

### Toprak ve Kum Örneklerinin İncelenmesi

Parklardan alınan toprak ve kum örnekleri, modifiye Kazacos yöntemi ile incelenmiştir<sup>4</sup>.

### Dışkı Muayenesi

Parklardan toplanan dışkı örnekleri kedi ve köpek helmint yumurtaları yönünden çinko sülfat flotasyon yöntemi ile incelenmiştir<sup>2</sup>.

### DNA İzolasyonu

Toplanan toprak örneklerinden DNA izolasyonu amacıyla iki farklı teknik, etkinlikleri açısından deneysel olarak kontrol edilmiştir.

Toprak örneklerinden direkt DNA izolasyonu yapılan ilk teknikte<sup>5</sup>; örneklenen 250-300 g toprak numunesi iyice karıştırılarak homojen hale getirildikten sonra 50 g tartılarak ayrılmıştır. Ayrılan bu örnekten 2.5 g tartılarak AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kiti (AP-MN-MS-GDNA-250, Axygen Biosciences, USA) ile DNA izolasyonu yapılmıştır.

İkinci teknikte ise Modifiye Kazacos<sup>4</sup> yöntemi ile askarit yumurtaları yönünden pozitif bulunan örneklerden lam üzerinden yumurtalar izole edilmiş ve DNA izolasyonu aynı kit ile yapılmıştır. Lam üzerinde bulunan yumurtaların distile su yardımı ile nitroselüloz membrana aktarıldığı ve DNA izolasyonunun membranda yapıldığı Graczyk ve ark.<sup>6</sup> tarafından bildirilen teknik modifiye edilerek kullanılmıştır. Elde edilen ekstraktlar PZR ile işlenene kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Söz konusu iki tekniğin genomik DNA izolasyonundaki etkinliklerini belirlemek amacı ile önceden mikro dalga fırında steril hale getirilen toprak örneklerinden 250 gramlık porsiyonlar ayrılmış ve sırası ile 50, 100, 250 ve 500 adet olmak üzere Anabilim Dalı'nda %70 alkol içerisinde muhafaza edilen *Toxocara canis* dişilerinden izole edilmiş yumurtalar ilave edilmiştir. Toprak örnekleri 37°C etüvde bekletilerek kuruması sağlanmış ve homojen hale getirmek için steril baget ile karıştırılmıştır. Her konsantrasyon için 4 tekrar yapılmıştır. Daha sonra yukarıdaki teknikler ile DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve sonuçlar PZR işleminden sonra değerlendirilmiştir.

### DNA Amplifikasyonu ve Elektroferez

Toprak örneklerinden elde edilen genomik DNA'lar *T. canis* için ITS-2 gen bölgesinden 330 bp gen bölgesini amplifiye eden YY1 ve NC2; *Toxascaris leonina* için yine ITS 2 gen bölgesinden 350 bp gen bölgesini amplifiye eden YY2 ve NC2, *Toxocara cati* için ise ITS-1 gen bölgesinden 660-bp gen bölgesini çoğaltan JW4 ve NC2 spesifik primerlerle PZR'a tabii tutulmuştur<sup>7</sup>. Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 25 µl konsantrasyonda hazırlanmıştır.

Her üç primer çifti ile PZR reaksiyon karışımı; 10XPCR

buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 pmol her bir primer, 250 mM her bir dNTP, 2U Taq DNA polymerase ve 50 ng template DNA olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra karşım thermal-cyclera yerleştirilmiş ve termal profil initial denaturation: 94°C'de 5 dk; 35 siklus, denaturation: 94°C'de 30 s, annealing: 56°C (*T. canis* ve *T. leonina*), 58°C (*T. cati*) 30 s, extension: 72°C'de 1dk; final extension: 72°C'de 5 dk olacak şekilde ayarlanmıştır <sup>7</sup>.

Pozitif kontrol olarak Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda bulunan *T. canis* ve *T. leonina* olgun parazitlerden elde edilen genomik DNA'lar, *T. cati* için ise Polonya "University of Physical Education, Biology and Environmental Protection Department"dan temin edilen genomik DNA'lar kullanılmıştır. PZR işlemi sonunda elde edilen ürünler (10 µl) %1.5'lük agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

### İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizleri SPSS 13.0 paket programı ile gerçekleştirilmiştir. Parklarda askarit türlerinin dağılımları arasındaki farklılık Pearson Chi Square, mesire alanları ile diğer parkların kontaminasyon durumu arasındaki farklılık ise Fisher's Exact testleri ile araştırılmıştır.

## BULGULAR

### Parazitolojik İnceleme Sonuçları

Çalışmada incelemesi yapılan toplam 20 parktan 10'u (%50), bu parklardan örneklenen toplam 248 adet toprak örneğinin 33'ü (%13.3) askarit ve diğer bazı helmint yumurtaları ile kontamine bulunmuştur. En yaygın tür %7.3 (18/248) ile *Toxocara* sp. bulunmuş, bunu %4.0 (10/248) ile *Toxascaris leonina*, %0.8 ile *Spirocera lupi* (2/248), *Taenia* sp.-*Echinococcus* sp.(2/248) ve %0.4 (1/248) ile *Ancylostoma caninum* izlemiştir. Çalışmada incelemesi yapılan parklarda toplam 6 adet dışkı örneğine rastlanmıştır. Yapılan dışkı muayenesinde dışkı örneklerinin helmint yumurtaları yönünden negatif olduğu belirlenmiştir.

### Moleküler İnceleme Sonuçları

DNA izolasyonunun etkinliği açısından karşılaştırması yapılan iki tekniğin deneysel test sonuçları **Tablo 1**'de verilmiştir. **Tablo 1**'de görüldüğü üzere lam üzerinden yumurta izolasyonu yapılan ekstraksiyon tekniğinin (Y2), toprak örneğinden direkt izolasyon yapılan ekstraksiyon tekniğine (Y1) oranla daha duyarlı olduğu belirlenmiş (P<0.001) ve toprak örneklerinden genomik DNA izolasyonunda bu teknik kullanılmıştır.

Askarit yumurtaları yönünden pozitif bulunan parklar-

**Tablo 1.** DNA izolasyonu amacıyla kullanılan iki tekniğin PZR ile değerlendirilmesi

**Table 1.** The evaluation of two DNA isolation techniques by PCR

Yöntem	Ekilen Yumurta Sayısı																t	df	P
	50				100				250				500						
Y1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-5.292	14	<0.001
Y2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			

t: Paired samples "t" testi

**Tablo 2.** Kontamine parklarda PZR sonuçlarına göre askarit türlerinin dağılımı

**Table 2.** Distribution of ascarid species according to PCR results in contaminated parks

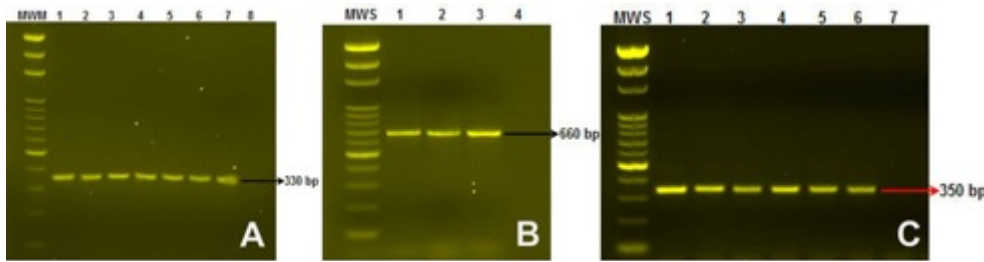
Park No	n	P.Ö.		<i>T. canis</i>		<i>T. leonina</i>		<i>T. cati</i>		İstatistiksel Analiz
		S.	%	S.	%	S.	%	S.	%	
P2	14	3	21.4	-	-	3	21.4	-	-	χ <sup>2</sup> :8.377 df: 9 P=0.497
P3	15	2	13.3	-	-	2	13.3	-	-	
P4	11	2	18.2	-	-	-	-	2	18.2	
P5	10	1	10.0	1	10.0	-	-	-	-	
P6	12	2	16.7	2	16.7	-	-	-	-	
P8	16	6	37.5	5	31.3	1	6.2	-	-	
P9	14	1	7.1	-	-	-	-	1	7.1	
P13	15	5	33.3	3	20.0	2	13.3	-	-	
P15	12	3	25.0	2	16.7	-	-	1	8.3	
P18	14	5	35.7	3	21.4	2	14.3	-	-	
<b>TOPLAM</b>	133	30	22.5	16	12.0 <sup>a</sup>	10	7.5 <sup>b</sup>	4	3.0 <sup>c</sup>	χ <sup>2</sup> : 23.231 df: 2 P<0.001

n: İncelenen örnek sayısı; P.Ö.: Pozitif örnek; S: Sayısı; χ<sup>2</sup>: Pearson's Chi Square

<sup>a,b,c</sup> Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki istatistiksel farklılık önemlidir

da tür spesifik primer çiftleri ile yapılan PZR sonuçlarına göre türlerin dağılımı *Tablo 2*'de verilmiştir. Askarit yumurtaları yönünden pozitif toplam 10 parktan 6'sı tek türle, 4'ü ise iki türle enfekte bulunmuştur. *Toxocara canis* askarit türleri arasında %12.0 ile en yaygın tür olarak belirlenmiş, bunu sırasıyla *T. leonina* ve *T. cati* izlemiştir. Türlerin yayılışı arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $P < 0.001$ ). Kontamine parklar arasında askarit türlerinin dağılımı açısından ise istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır ( $P > 0.05$ ). Kontamine parklarda *T. canis*, *T. cati* ve *T. leonina* PZR pozitiflikleri *Şekil 1*'de gösterilmiştir. Mesire alanlarındaki parklarda saptanan askarit türleri ile kontaminasyon oranı diğer parklara oranla yaklaşık altı kat daha yüksek belirlenmiş ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $P < 0.001$ ).

oranında yaygın bulmuşlardır. Van'da Ayaz ve ark.<sup>14</sup>, çocuk parkları ve okul bahçelerinden alınan 107 toprak örneğinin %25.97'sinde *Toxocara* sp., %11.25'inde *T. leonina* yumurtalarına rastlamışlardır. Aydın'da; Gürel ve ark.<sup>15</sup>, 111 parktan alınan örneklerde *Toxocara* sp. yumurtaları ile kontaminasyonu %18.9 olarak bulmuşlardır. Kırıkkale'de Aydenizöz Özkayhan<sup>16</sup>, 1 yıl süreyle mevsimsel bakışı yapılan 8 parkta *Toxocara* sp., *Toxascaris leonina*, *Taenia* sp. ve *Isoospora* sp. ile kontaminasyon oranlarını sırasıyla %15.6, %1.5, %1.0 ve %0.2 olarak bildirmiştir. Kütahya'da ise Akdemir<sup>17</sup>, 9 parktan topladığı 30 toprak örneğinden 3'ünde (%10) *Toxocara* sp. yumurtaları belirlemiştir. Bu çalışmada ise 20 parktan 10'u (%50), bu parklardan örneklenen toplam 248 adet toprak örneğinin 33'ü (%13.3) askarit ve diğer bazı helmint yumurtaları ile kontamine bulunmuştur.



**Şekil 1.** Kontamine toprak örneklerinde PZR pozitif ürünlerin jel elektroforezde görünümü. A: *T. canis* [MWM: Moleküler ağırlık standartı; 1-6: Pozitif örnekler; 7: Pozitif kontrol; 8: Negatif kontrol] B: *T. cati* [MWS: Moleküler ağırlık standartı; 1,2: Pozitif örnekler; 3: Pozitif kontrol; 4: Negatif kontrol] C: *T. leonina* [MWS: Moleküler ağırlık standartı; 1-5: Pozitif örnekler; 6: Pozitif kontrol; 7: Negatif kontrol]

**Fig 1.** PCR results of the positive amplicons from ascarid contaminated samples on gel electrophoresis. A: *T. canis* [MWM: Marker; 1-6: Positive samples; 7: Positive control; 8: Negative control] B: *T. cati* [MWS: Marker; 1,2: Positive samples; 3: Positive control; 4: Negative control] C: *T. leonina* [MWS: Marker; 1-5: Positive samples; 6: Positive control; 7: Negative control]

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Türkiye'de kedi ve köpek helmint yumurtalarıyla çocuk parkları ve halka açık alanların kontaminasyonuna yönelik çok sayıda araştırma yapılmıştır. Güçlü ve Aydenizöz<sup>8</sup>, Konya'da, bakısını yaptıkları 4 parkta *Toxocara* sp. kontaminasyonunu %4.16 olarak bildirmişlerdir. Ankara'da; Öge ve Öge<sup>9</sup> 46 parkta helmint yumurtaları ile kontaminasyon oranını *Toxocara* sp. için %30.6, *Toxascaris leonina* için %4.1, *Ancylostoma* sp. için %17.62, *Taenia* sp. için %1.82, *Trichuris* sp. için %2.4 ve *Enterobius vermicularis* için ise %1.2 olarak kaydetmişlerdir. Aynı ilde Avcioglu ve Burgu<sup>10</sup>, 45 parktaki kontaminasyon oranını %11.3 olarak saptamışlar, kontamine örneklerde *Toxocara* sp.'nin %82.4, *Taenia* sp.'nin %4.6, *Toxascaris leonina*'nın %1.9 yaygın olduğunu belirtmişlerdir. Bunun yanında *Toxocara* sp. + *Taenia* sp. ve *Toxocara* sp. + *Toxascaris leonina* ile miks kontaminasyonları %0.9 olarak bildirmişlerdir. İstanbul'da, Toparlak ve ark.<sup>11</sup>, 63 parktaki *Toxocara* sp. ile kontaminasyon oranını %15.9 belirlemişlerdir. Elazığ'da, Kaplan ve ark.<sup>12</sup>, çocuk parkı, okul bahçesi ve halka açık alanlar gibi 62 farklı yerden elde ettikleri örneklerde %3.2 oranında *Toxocara* sp. yumurtaları saptamışlardır. Erzurum'da Avcioglu ve Balkaya<sup>13</sup>, 36 parktan örnekleddikleri 214 toprak numunesinde *Toxocara* sp. yumurtalarını %64.28, *Taenia* sp. yumurtalarını ise %3.12

Toprak örneklerinde saptanan helmint yumurtalarının dağılımı incelendiğinde en yaygın tür %7.3 ile *Toxocara* sp. olmuş, bunu %4.0 ile *T. leonina*, %0.8 ile *S. lupi*, %0.8 ile *Taenia* sp.-*Echinococcus* sp. ve %0.4 ile de *A. caninum* izlemiştir. Parazitolojik inceleme sonuçlarına göre elde edilen prevalans oranlarının Avcioglu ve Burgu'nun<sup>10</sup> bildirdikleri oranlarla yakın olduğu diğerlerinden ise düşük olduğu dikkati çekmektedir. Ortaya çıkan bu prevalans farklılıklarında araştırmanın yapıldığı bölgenin sıcaklık, yağış, nem miktarı, toprak/kum yapısı, güneş ışığına maruz kalma süresi gibi çeşitli ekolojik özelliklerinin önemli olduğu düşünülmektedir. Bunun yanında bölgenin sosyo-ekonomik yapısı, kültürel durumu da çalışmalarda sonuçları etkileyebilmektedir. Bölgedeki sahihsiz kedi, köpek popülasyonu, bunların parazitlenme durumu, parklara girip çıkılmalarını engelleyen sınırlamaların olup olmaması, sahipli hayvanların dışkılarının toplanıp toplanmaması da kontaminasyonlarda etkili olduğu düşünülmektedir.

Türkiye'de bugüne kadar parklardaki oyun alanlarının askarit türleri ile kontaminasyonu üzerine moleküler yöntemlerle yapılmış bir araştırma bulunmamaktadır. Bu durum, askarit türleri için yumurta bakısına göre *Toxocara* sp. olarak verilen kontaminasyon oranlarının tür bazlı teşhislerinin gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu çalışmada araştırma alanında kontaminasyona yol açan askarit türlerinin

moleküler olarak belirlenmesi ile hem kontaminasyon derecesinin hem de orijininin (canidae ve/veya felidae) belirlenmesi sağlanmıştır.

Ribozomal DNA'daki (rDNA) genetik markerları kullanan DNA tabanlı tekniklerin cestod<sup>18</sup>, trematod<sup>19</sup> ve nematodları da<sup>20-23</sup> içeren birçok parazit grubuyla ilgili taksonomik problemlerin çözülmesi ve filogenetik analizler amacıyla uygulandığı görülmektedir. Ribozomal DNA'nın internal transcript spacer gen bölgesi (ITS-1 ve ITS-2) parazitik nematodlarda bu amaçla önem arz eden gen bölgelerinin başında gelmektedir<sup>22,24-26</sup>. Jacobs ve ark.<sup>23</sup>, ITS-2 gen bölgesini çoğaltan spesifik primerlerle uyguladıkları PZR neticesinde, bu gen bölgesinin köpek ve kedi askaritlerinin tür identifikasyonlarında oldukça spesifik olduğunu, hayvan ve insan dokularında askarit larvalarının saptanması ve karakterize edilmelerinde PZR tabanlı tekniklerin temel tanı yöntemi olarak kullanılabileceğini kaydetmişlerdir. Fogt-Wyrwas ve ark.<sup>27</sup>, askarit türleri ile kontamine toprak örneklerinden yumurta izolasyonu sonucu ITS-2 gen bölgesini çoğaltan spesifik primerlerle uyguladıkları PZR neticesinde, bu gen bölgesinin yumurtalardan tür identifikasyonunda oldukça spesifik olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde Borecka ve Gawor<sup>5</sup>, askarit yumurtaları ile kontamine toprak örneklerinden genomik DNA izolasyonu sonucu yine ITS-2 gen bölgesini hedef alan aynı primerlerle uyguladıkları PZR ile direkt konatamine toprak örneklerinde tür identifikasyonlarının yapılabileceğini kaydetmişlerdir. Li ve ark.<sup>7</sup>, *T. canis*, *T. cati*, *T. malaysiensis* ve *T. leonina* türlerinin nuclear ribosomal DNA bölgesini (ITS-1 ve ITS-2) amplifiye eden primerler ile moleküler olarak bu parazitlerin identifikasyonlarının duyarlı ve özgül olarak yapılabileceğini ve epidemiyolojik çalışmalarda dahagerçekçi sonuçlar ortaya koyulabileceğini kaydetmişlerdir. Bu çalışmada da ribozomal ITS-2 gen bölgesi sahip olduğu yüksek spesifite ile askarit türlerinin moleküler ayrımı amacıyla tercih edilen gen bölgesi olmuştur.

Genomik DNA izolasyonunda, Borecka ve Gawor<sup>5</sup>, tarafından önerilen toprak örneğinden direkt DNA izolasyonunun yapıldığı yöntemin özellikle yumurta sayısının düşük olduğu örneklerde (<100 yumurta) PZR ile negatif sonuç verdiği belirlenmiştir. Askarit yumurtaları yönünden pozitif örneklerde lam üzerinden yumurtaların izole edildiği tekniğin<sup>6</sup> ise genomik DNA izolasyonunda daha etkin olduğu saptanmıştır (P<0.001). Bu yüzden mevcut çalışmada saha örneklerinin incelenmesinde Graczyk ve ark.<sup>6</sup>'nın bildirdiği teknik modifiye edilerek uygulanmıştır.

Bu çalışmada *T. canis* pozitifliğinin yüksek bulunması, park kontaminasyonlarının epidemiyolojisinde köpeklerin daha önemli olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu çalışmayla zoonotik potansiyeli göz önüne alındığında *T. canis*'in özellikle şehir parklarındaki çocuk oyun alanlarında bilhassa çocuklar için yakın tehlike olarak risk potansiyeli oluşturduğu da ortaya konmuştur. Bu durum, Kayseri'de şehir parklarındaki çocuk oyun alanlarının köpek ve kedi

dişkılarıyla kontaminasyonuna karşı korumasız olduklarını göstermektedir. Diğer yandan bu çalışmada mesire alanlarındaki parklarda saptanan askarit kontaminasyonu diğer parklara oranla yaklaşık altı kat daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durum, mesire alanlarında zoonotik karakterli askarit türlerinin insanlar için yüksek risk potansiyeli oluşturduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile Kayseri parklarındaki çocuk oyun alanlarının askarit türleri ile kontaminasyonu moleküler olarak Türkiye'de ilk kez ortaya konmuştur. Çalışmada özellikle *T. canis* kontaminasyonunun yüksek düzeyde belirlenmiş olması insan sağlığı açısından risk arz etmektedir. Bu açıdan söz konusu enfeksiyonlara karşı gerekli kontrol ve mücadele yöntemlerine ihtiyaç duyulduğu ortaya çıkmıştır. Bunun yanında spesifik moleküler teşhis yöntemlerinin kullanılmasıyla, askarit türleri ile çevresel kontaminasyon çalışmalarında epidemiyolojik verilerin, kontaminasyon derecesi ve kaynaklarının özgün bir şekilde ortaya konabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Soulsby EJJ:** Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. Bailliere and Tindall, London, 1986.
- Kassai T:** Veterinary Helminthology. In, Butterworth-Heinemann, Linnearce House, Jordon Hill, pp. 103-108, Oxford, 1999.
- Öncel T:** İstanbul'da evlerde beslenen köpeklerde *Toxocariosis canis*. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 10 (2): 151-153, 2004.
- Kazacos KR:** Improved method for recovering ascarid and other helminth eggs from soil associated with epizootics and during survey studies. *Am J Vet Res*, 44, 896-900, 1983.
- Borecka A, Gawor J:** Modification of gDNA extraction from soil for PCR designed for the routine examination of soil samples contaminated with *Toxocara* spp. eggs. *J Helminthol*, 82 (2): 119-22, 2008.
- Graczyk TK, Cranfield MR, Fayer R:** Recovery of waterborne oocysts of *Cryptosporidium* from water samples by the membrane-filter dissolution method. *Parasitol Res*, 83, 121-125, 1997.
- Li MW, Lin RQ, Chen HH:** PCR tools for the verification of the specific identity of ascaridoid nematodes from dogs and cats. *Mol Cell Probes*, 21 (5-6): 349-354, 2007.
- Güçlü F, Aydenizöz M:** Çocuk parklarındaki kumların köpek ve kedi helminti yumurtaları ile kontaminasyonunun tesbiti. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 22, 194-198, 1998.
- Öge S, Öge H:** Prevalence of *Toxocara* spp. eggs in the soil of public parks in Ankara, Turkey. *Dtsch Tierarztl Wschr*, 107, 72-75, 2000.
- Avcioglu H, Burgu A:** Seasonal prevalence of *Toxocara* ova in soil samples from public parks in Ankara, Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 8 (3): 345-50, 2008.
- Toparlak M, Gargılı A, Tüzer E:** Contamination of children's playground sandpits with *Toxocara* eggs in Istanbul, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 26, 317-320, 2002.
- Kaplan K, Kuk S, Kalkan A:** Elazığ'daki çocuk parkları ve oyun sahalarında *Toxocara* spp. araştırılması. *Fırat Üniv Sağlık Bil Derg*, 16, 277-279, 2002.
- Avcioglu H, Balkaya I:** 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, 2010.
- Ayaz E, Yaman M, Gül A:** Prevalence of *Toxocara* spp. eggs in soil of public parks in Van, Turkey. *Indian Vet J*, 80, 574-576, 2003.
- Gürel FS, Ertuğ S, Okyay P:** Aydın il merkezindeki parklarda *Toxocara*

spp. yumurta görülme sıklığının araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg*, 29, 177-179, 2005.

**16. Aydenizöz Özkayhan M:** Soil contamination with ascarid eggs in playgrounds in Kırıkkale, Turkey. *J Helminthol*, 80, 15-18, 2006.

**17. Akdemir C:** Visceral larva migrans among children in Kütahya (Turkey) and an evaluation of playgrounds for *T. canis* eggs. *Turk J Pediatr*, 52 (2): 158-62, 2010.

**18. Bowles J, Blair D, McManus DP:** A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. *Parasitol*, 110, 317-328, 1995.

**19. Blair D, Campos A, Cummings MP, Laclette JP:** Evolutionary biology of the parasitic platyhelminths: The role of molecular phylogenetics. *Parasitol*, 12, 66-71, 1996.

**20. Chilton NB, Gasser RB, Beveridge I:** Differences in a ribosomal DNA sequence of the *Hypodontus macropi* complex. *Int J Parasitol*, 25, 647-651, 1995.

**21. Hoste H, Chilton NB, Gasser RB, Beveridge I:** Differences in the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) between five species of *Trichostrongylus* (Nematode: Trichostrongylidae). *Int J Parasitol*, 25, 75-

80, 1995.

**22. Stevenson LA, Chilton NB, Gasser RB:** Differentiation of *Haemonchus placei* from *H. contortus* (Nematode: Trichostrongylidae) by the ribosomal second internal transcribed spacer. *Int J Parasitol*, 25, 483-488, 1995.

**23. Jacobs DE, Zhu X, Gasser RB, Chilton NB:** PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat. *Acta Tropica*, 68, 191-200, 1997.

**24. Gasser RB, Chilton NB, Hoste H, Stevenson LA:** Species identification of trichostrongyle nematodes by PCR-linked RFLP. *Int J Parasitol*, 24, 291-293, 1994.

**25. Gasser RB, Nansen P, Guldberg P:** Fingerprinting sequence variation in ribosomal DNA of parasites by DGGE. *Mol Cell Probes*, 10, 99-105, 1996.

**26. Gasser RB, Stevenson LA, Chilton NB, Nansen P, Bucknell DG, Beveridge I:** Species markers for equine strongyles detected in intergenic spacer rDNA by PCRFLP. *Mol Cell Probes*, 10, 371-378, 1996.

**27. Fogt-Wyrwas R, Jarczyk W, Mrzgajska-Wiktor H:** Utilizing a polymerase chain reaction method for the detection of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs in soil. *J Helminthol*, 81 (1): 75-8, 2007.