

Bazı Yabani Kuşların Beyin Dokularında *Toxoplasma gondii* ve *Neospora caninum*'un Moleküler Tanısı

Mustafa Necati MUZ¹  Özlem ORUNÇ KILINÇ² Cafer Tayer İŞLER³
Enes ALTUĞ³ Muhammet KARAKAVUK⁴

¹ Namık Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, TR-59030 Tekirdağ - TÜRKİYE

² Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Özalp Meslek Yüksekokulu, TR-65800 Van - TÜRKİYE

³ Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, TR-31001 Hatay - TÜRKİYE

⁴ Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, TR-35040 İzmir - TÜRKİYE

Article Code: KVFD-2014-11983 Received: 15.07.2014 Accepted: 01.10.2014 Published Online: 09.10.2014

Özet

Çiftlik hayvanlarının ekonomik öneme sahip protozoonlarından *Toxoplasma gondii* ve *Neospora caninum*'un ara konak yabani kuşlardaki moleküler tanısı hakkında az sayıda araştırma bulunmaktadır. Türkiye'de bu parazitlerin yabani kuşların beyin dokularındaki moleküler prevalansı bilinmemektedir. Bu çalışmada, Türkiye'nin iki farklı ekolojyasında bulunan 20 yabani kuş türüne ait 101 adet beyin dokusunda *T. gondii* ve *N. caninum*'un varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) metodu ile araştırılmıştır. Araştırma sonucunda yabani kuşların beyin dokularında *T. gondii* %9, *N. caninum* %14, her iki türe aynı anda rastlanma oranı ise %4 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen verilere Ki kare testi uygulanmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada *T. gondii*'nin *Corvus corone* (Gri leş kargası), *Melanitta fusca* (Kadife ördek), *Aquila heliaca* (Şah kartal), *Aquila pomarina* (Küçük orman kartal), *Buteo rufinus* (Kızıl şahin), *Accipiter nisus* (Bayağı atmaca), *Strix aluco* (Alaca baykuş)'un beyin dokularında ve *N. caninum*'un *Larus genei* (İnce gagalı martı), *Corvus corone*, *Melanitta fusca*, *Anas clypeata* (Bayağı kaşık gaga), *Perdix perdix* (Çil keklik), *Aquila heliaca* ve *Buteo rufinus*'un beyin dokularında PZR metoduyla dünya'da ilk tespiti yapılmıştır. Araştırma Türkiye'deki yabani kuşlarında *T. gondii* ve *N. caninum*'un moleküler tanısı amacıyla yapılan ilk çalışmadır.

Anahtar sözcükler: *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, Yabani Kuş, Beyin, PZR

Molecular Diagnosis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Brain Tissues of Some Wild Birds

Abstract

There are limited molecular studies about *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* which are economically important livestock protozoons in wild birds investigated by polymerase chain reaction (PCR) method. Molecular prevalence of both parasites in brain tissues of wild birds in Turkey is unknown. Prevalance of *T. gondii* was 7%, *N. caninum* was 14% and mix infection was found 4% in brain tissues of 101 wild birds under 20 species from two different regions of Turkey. The chi-square test has been applied to the acquired data. This is the first molecular biologic investigation for the aim of PCR diagnosis of *T. gondii* in brain tissues of *Corvus corone*, *Melanitta fusca*, *Aquila heliaca*, *Aquila pomarina*, *Buteo rufinus*, *Accipiter nisus*, *Strix aluco* and *N. caninum* in brain tissues of *Larus genei*, *Corvus corone*, *Melanitta fusca*, *Anas clypeata*, *Perdix perdix*, *Aquila heliaca*, *Buteo rufinus* in the world. This also is the first molecular diagnostic investigation of *T. gondii* and *N. caninum* in brain tissues of wild birds in Turkey.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, Wild bird, Brain, PCR

GİRİŞ

Toxoplasma gondii ara konak insan dahil tüm sıcak kanlı canlılarda ve kuşlarda görülen, gebelerde abortlara yol açabilen, kedigillerin son konak olduğu sistemik protozoal bir enfeksiyon etkenidir. *Neospora caninum* ise son konak köpeklerde sinirsel bozukluk ve felç semptomlarına, ara

konak sığır ve atlarda değişen oranlarda aborta neden olabilen protozoal bir enfeksiyon etkenidir^[1,2]. Her iki parazit türünün dünyadaki prevalansı yüksektir. Özellikle evcil çiftlik hayvanlarında neden oldukları verim kayıpları ciddi ekonomik zarara yol açmaktadır^[3].

Yabani kuş türleri *N. caninum* ve *T. gondii*'nin enfektif formlarını, avladıkları küçük hayvanlar, yedikleri leş, bit-



İletişim (Correspondence)



+90 282 2504714; Mobile: +90 532 5481532



mustafamuz@nku.edu.tr

kisel besin veya su gibi kontamine gıdalarla alırlar. Yırtıcı memelilerin besin zincirinde bulunan yabani kuş türleri *T. gondii* ile *N. caninum*'a konaklık yaparlar. Son yıllarda yapılan araştırmalar, kuş türlerinin *N. caninum* ve *T. gondii*'nin epidemiyolojisinde aldığı role dikkat çekmektedir^[3,4]. Bildirgin, keklilik ve tavuklarda *N. caninum* ile yapılan deneysel enfeksiyon çalışmalarında kekliliklerde mortalite oranı %100 olarak tespit edilirken bildirgin ve tavuklarda sinirsel semptomlar ve doza bağlı değişen mortalite oranları bildirilmiştir^[5-7]. Yabani kuşların beslenme ve üreme amacıyla farklı ekocoğrafyalarda bulunmaları, avlanan kuşların kısmen ya da tamamen doğaya atılması gibi faktörler *T. gondii* ve *N. caninum*'un epidemiyolojisinde önem kazanmaktadır^[8-12].

Dünya'da *T. gondii* ve *N. caninum*'un yabani kuşlardaki moleküler tanısı ve prevalansı hakkında az sayıda araştırmaya rastlanırken Türkiye'ye ait moleküler tanı kaydına rastlanmamıştır. İspanya'da yapılan bir araştırmada 14 farklı kuş türüne ait 200 adet örnek incelenmesi sonucunda *T. gondii* %6, *N. caninum* %1.5 oranında PZR pozitif olarak bildirilmiştir^[4]. İtalya'da üç farklı ördekgil türüne ait 103 örnekten üçünde *T. gondii* PZR pozitifliği saptanmıştır^[13]. *Toxoplasma gondii* ve *N. caninum*'un kuşlardaki teşhisi genellikle parazitin konvansiyonel teknikler ile izole edilmesi veya serolojik metotlar ile yapılmaktadır. Araştırma konusu hakkında az sayıda moleküler biyolojik tanı çalışması bulunmaktadır. Bu araştırmada 20 farklı kuş türünün beyin dokularında *T. gondii* ve *N. caninum*'un moleküler tanısı PZR metodu ile araştırılarak bazı yabani kuş türlerine ait dünyadaki ilk veriler elde edilmiştir.

MATERYAL ve METOT

Çalışma Alanlarının Özellikleri

Ilıman Akdeniz iklimine sahip olan Hatay ili, 36°14 Kuzey ve 36°10 Doğu koordinatlarında yaklaşık 6.000 km² yüzölçümüne sahiptir. Cebelitarık boğazından sonra dünyada ikinci önemli göçmen kuş güzergahı üzerinde yer alan Hatay ilinde bulunan Amik Gölü ve Asi Nehri çevresinde çok sayıda ve dağınık sulak alanlar bulunmaktadır. Van ili karasal iklime sahip Doğu Anadolu bölgesinde, 38°29 Kuzey ve 43°40 Doğu koordinatlarında yaklaşık 19.000 km² yüzölçümüne sahiptir. Van ilinde yer alan dünyanın en büyük sodalı gölü olan Van Gölü çevresinde çok sayıda sulak alanlar bulunmaktadır. Her iki il sahip oldukları ekocoğrafya ile çok sayıda ve türde, yerli ve göçmen kuşun yaşamasına uygun habitat sağlamaktadır.

Çalışma Materyalini Oluşturan Kuşların Toplanması ve Türlerinin Tanımlanması

Bu araştırmada incelenen örnekler Hatay ve Van illerini temsil etmektedir. Hatay ilinde 2007-2014 yılları arasında ateşli silah ya da travma sonucu yaralanan 79 adet yabani kuş Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Hayvan Sağlığı Araştırma ve Uygulama Merkezinin cerrahi kliniğine getirilmiştir. Bu kuşlardan acil olarak müdahale edilen

ancak tedavi ve operasyonlara rağmen kurtarılamayan 24 adeti araştırmaya dahil edilmiştir. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Yaban Hayatı Koruma ve Rehabilitasyon Merkezine acil tıbbi yardım amacıyla getirilen yabani kuşlardan tedavi ve operasyonlara rağmen kurtarılamayanlar ile ölü olarak bulunan *Anas clypeata*, *Melanitta fusca*, *Anser anser* türleri ve 2012-2013 yılı av sezonunda yakalanan yabani kuşlara ait toplam 77 adet kuşun baş kısımları araştırmaya dahil edilmiştir. Kuş türlerinin teşhisinde ilgili literatürlerden faydalanılmıştır^[14-18]. Araştırmada yer alan türlerin sayısal dağılımı şöyledir. Van iline ait yabani kuş türü sekiz, örnek sayısı 77 olup, *Perdix perdi* (n=14), *Anser anser* (n=7), *Columba oenas* (n=5), *Pica pica* (n=1), *Anas clypeata* (n=9), *Melanitta fusca* (n=3), *Corvus corone* (n=21), *Larus genei* (n=17) dir.

Hatay iline ait yabani kuş türü 12, örnek sayısı 24 olup, *Aquila heliaca* (n=3), *Hieraetus pennatus* (n=2), *Aquila pomarina* (n=1), *Buteo rufinus* (n=5), *Buteo buteo* (n=4), *Accipiter nisus* (n=1), *Phoenicopterus roseus* (n=1), *Ciconia ciconia* (n=3), *Caprimulgus europaeus* (n=1), *Apus apus* (n=1), *Strix aluco* (n=1) ve *Merops apiaster* (n=1)'dir.

Genomik DNA Ekstraksiyonu ve PZR

Araştırmada kullanılan örnekler -24°C'de ya da %70'lik etil alkol içerisinde muhafaza edilmiştir. Kuş kafalarının makroskopik temizliğinden sonra kafatasına yapılan ensizyon ile beyin dokusuna ulaşılmıştır. Her kuştan alınan 20 mg beyin dokusu örneği genomik DNA (gDNA) eldesinde kullanılmıştır. gDNA eldesi, bir ticari kitin (Thermo, GeneJET Genomic DNA Purification Kit) kendi kullanma kılavuzu araştırmaya uyarlanarak gerçekleştirilmiştir. Steril 1.5 ml hacimli şeffaf tüp (1.5 ml) içerisine alınan beyin dokusu örneğine, kit içeriğinde bulunan *digestion solution* 'dan 180 µl eklenerek steril çubuk ile ezilmiştir. Tüp içerisine 0.5 mm çapında steril cam boncuklardan 30 mg eklenerek, beyin dokusu parçacıklarının tamamen homojen hale gelmesi amacıyla tüpler 2 dk süre ile kuvvetli şekilde vortekslenmiştir. Her tüp oda ısısında bir dakika süre bekletilerek, üstteki sıvı steril tüp içerisine aktarılmış, kit içerisine bulunan ve -24°C'de muhafaza edilen *Proteinaz K* enziminden 20 µl eklenen tüpler vortekslenerek, 56°C'de 6 saat süre ile ısı bloğunda bekletilmiş, saat başı vortekslenmiştir. Kit protokolü takip edilerek sırasıyla 20 µl *RNase A* solüsyonundan eklenmiş oda ısısında 10 dk bekletilmiştir. Kit içeriğinde bulunan *lysis buffer*'dan 200 µl eklenip 15 sn vortekslemeden sonra %50'lik etil alkolden 400 µl eklenerek vortekslenmiştir. Karışımın tamamı kit içeriğinde bulunan *GeneJet Genomic DNA purification column*'a aktarılarak mikrosantrifüjde 1 dk süre ile 6.000 g/dk. devirde santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda dolan sıvı toplama haznesi yenisi ile değiştirilmiştir. Kit içeriğinde bulunan *wash buffer* 'den tüplere 500 µl eklenerek 8.000 g/dk devirde tekrar santrifüj edilmiştir. Sıvı toplama haznesi yenisi ile değiştirilerek tüplere 500 µl *wash buffer*'ll eklenerek 12.500 g/dk'da 3 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Tüpler yeni 1.5 ml hacimli steril tüplere yerleştirildikten sonra 200 µl *elution buffer* eklenerek oda ısısında 5 dk süre bekletilmiş ve 10.000

g/dk'da 1 dk süre santrifüj edilerek genomik DNA örnekleri elde edilmiştir. Örnekler -24°C'de muhafaza edilmiştir.

Toxoplasma gondii'nin moleküler tanısı amacıyla nested PZR metodu kullanılmıştır. Hedef gen bölgesinin iki aşamalı eldesini sağlayan bu metod konvansiyonel PZR'dan daha özgün olduğu için tercih edilmiştir. Araştırmada *T. gondii* DNA sınıfın 18S ssrRNA bölgesindeki B1 genini hedefleyen ve daha önce bildirilen primer çiftleri kullanılmıştır^[19]. *Neospora caninum*'un moleküler tanısı tek aşamalı Nc5 genine spesifik primerlerin kullanıldığı konvansiyonel PZR metodu ile gerçekleştirilmiştir^[20]. PZR koşulları ilgili literatürlere göre bazı değişiklikler yapılarak uyarlanmıştır^[19,20]. Buna göre *T. gondii* spesifik nested PZR nin birinci aşamasında 5 µl 10xTaq bufer, 2.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP (Fermentas, Litvanya), 1.5U Taq DNA polimeraz (Fermentas, Litvanya), 0.3 µM forward ve reverse primerleri, 3 µl gDNA olarak toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde moleküler biyolojik kalitede su ile tamamlanarak hazırlanan karışım kullanılmıştır. PZR koşulları; 95°C de 5 dk, 94°C'de 1 dk, 50°C de 1 dk, 72°C de 1 dk kullanılarak toplam 35 döngü gerçekleştirilmiş ve son olarak 72°C de 5 dk tutularak birinci aşama tamamlanmıştır. Birinci aşama sonucunda elde edilen PZR ürünü ikinci aşama PZR'de kalıp DNA kaynağı olarak kullanılmıştır. İkinci aşamada PZR koşulları ve konsantrasyonları birinci basamak ile aynı, farklı olarak P3-P4 primerleri kullanılarak çalışılmıştır. *Neospora caninum* spesifik Np6 ve Np21 oligonükleotid primerlerin kullanıldığı reaksiyonda ise yukarıdaki hacimlerin aynıları kullanılarak bağlanma ısısı 59°C'de 1 dk olarak uygulanmıştır.

Amplifikasyon ürünleri elektroforezde, 0.5 µg/ml ethidium bromide içeren %1'lik agaroz jelde yürütülüp, UV transillimünatörde görüntülenerek, ampikon büyüklüklerine göre değerlendirilmiştir. *Toxoplasma gondii*'nin moleküler tanısı amacıyla yapılan nested PZR'in birinci turunda kullanılan P1-P2 olügonükleotid primerleri ile 194 bp'lik bölgenin, ikinci turunda kullanılan P3-P4 primerleri ile 97 bp'lik kısmı ampliyeye edilmiştir^[19]. *Neospora caninum* 337 bp bölgesi önceden bildirilen^[20] Np6 ve Np21 oligonükleotid primerler kullanılarak amplifiye edilmiştir (Tablo 1).

İstatistik Analiz

Bu araştırmada Van ilinden sekiz kuş türüne ait 77 adet örnek, Hatay ilinden ise 12 kuş türüne ait 24 adet

örnek kullanılmıştır. Toplam kuş türü 20, toplam örnek sayısı ise 101 dir. Bu kuşların beyin dokularındaki varlığı tek ve miks olarak araştırılan *T. gondii* ve *N. caninum*'a rastlanma oranları arasındaki farklılıklar ki kare test istatistiği ile değerlendirilerek, tartışma bölümünde gerekli açıklamalara yer verilmiştir.

Yasal İzin

Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünden 72784983-488.04-171653 sayılı yasal izni alınmıştır.

BULGULAR

Hatay ilinden örneklenen 12 tür yaban kuşunun iki türünde *N. caninum* (Şekil 1), beş türünde *T. gondii* (Şekil 2) bir türde ise her iki parazit birlikte tespit edilmiş, yedi kuş türünde bu parazitler tespit edilememiştir.

Van ilinden örneklenen sekiz tür yaban kuşunun beş türünde *N. caninum*, iki türünde *T. gondii* ayrı ayrı, iki türde ise her iki parazit birlikte tespit edilmiş, üç kuş türünde bu parazitler tespit edilememiştir.

Bu araştırmada *Neospora caninum*'un *Larus genei*, *Corvus corone*, *Melanitta fusca*, *Anas clypeata*, *Perdix perdix*, *Aquila heliaca*, *Buteo rufinus* türü yabani kuşlara ait beyin örneklerinde dünyadaki ilk moleküler tanısı yapılmıştır.

Toxoplasma gondii'nin ise *Corvus corone*, *Melanitta fusca*, *Aquila heliaca*, *Aquila pomarina*, *Buteo rufinus*, *Accipiter nisus*, *Strix aluco* türü yabani kuşlara ait beyin örneklerinde dünyadaki ilk moleküler tanısı gerçekleştirilmiştir.

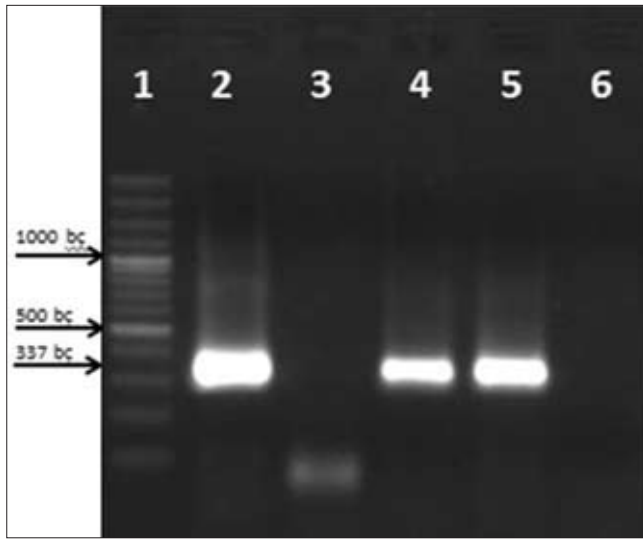
Her iki parazite *Corvus corone*, *Melanitta fusca* ve *Buteo rufinus* türü yabani kuşlara ait beyin dokularında birlikte dünyada ilk defa rastlanmıştır.

Buna göre 20 farklı kuş türünün yedisinde *N. caninum*, yedisinde *T. gondii* tespit edilmiş, üçünde her iki parazit birlikte tespit edilmiş, 10 türde ise hiç birisi tespit edilememiştir (Tablo 2). Van ve Hatay illerinde örneklenen 20 türe ait 101 adet yabani kuş türünde tek ya da miks olarak *T. gondii*, *N. caninum*'a rastlanma oranları arasında her üç grup için de istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur (her üç grup P<0.05).

Tablo 1. Primerlerin özellikleri

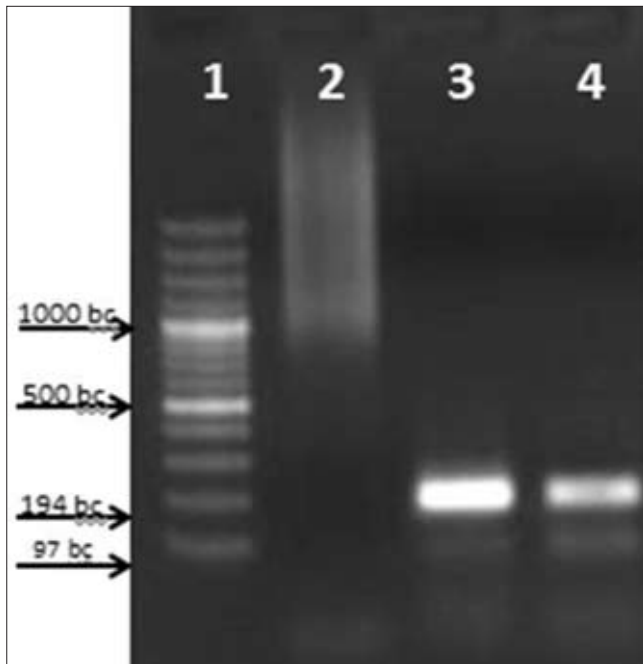
Table 1. Characteristics of the Primers

Oligonükleotid Primerler	Dizilişi (5'-3')	Dizinin Yeri
P1 Outer primer (sense strand)	GGAAGTCATCCGTTTCATGAG	694-714
P2 Outer primer (antisense strand)	TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC	887-868
P3 Inner primer (sense strand)	TGCATAGGTTGCAGTCACTG	757-776
P4 Inner primer (antisense strand)	GGCGACCAATCTGCGAATACACC	853-831
Np6 Forward primer (sense strand)	CTCGCAGTCAACCTACGTCTTCT	806-824
Np21 Reverse primer (antisense)	CCCAGTGCCTCAATCCTGTAAC	550-568



Şekil 1. *Neospora caninum* jel elektroforezi sonucu elde edilen bantlar
1- DNA merdiveni, 2, 4- *N. caninum* pozitif bulunan örnekler, 3- *N. caninum* negatif bulunan örnek, 5- *N. caninum* pozitif kontrol, 6- Negatif kontrol

Fig 1. *N. caninum* bands on gel electrophoresis
1- Gene ruler DNA ladder, 2, 4- *N. caninum* positive samples, 3- *N. caninum* negative samples, 5- *N. caninum* positive control, 6- Negative control



Şekil 2. *Toxoplasma gondii* için yapılan elektroforez sonucu elde edilen bantlar

1- DNA merdiveni, 2- *T. gondii* negatif bulunan örnek, 3- *T. gondii* pozitif bulunan örnek, 4- *T. gondii* pozitif kontrol örnek

Fig 2. *T. gondii* bands on gel electrophoresis
1- Gene ruler DNA ladder, 2- *T. gondii* negative samples, 3- *T. gondii* positive samples, 4- *T. gondii* positive control

TARTIŞMA ve SONUÇ

Tıp ve veteriner hekimliğindeki önemi nedeniyle çok sayıda araştırmaya konu olan toksoplazmozis, Sağlık Bakanlığının bildirimine esas bulaşıcı hastalıklar listesinde

“Grup C hastalıklar” bölümünde yer almaktadır. Hayvanlarda *T. gondii*'nin neden olduğu abortlar özellikle koyun ve keçilerde ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Süt sığırlarının en önemli paraziter abort etkeni *N. caninum*'un A.B.D.'inde yol açtığı ekonomik kayıp miktarı yılda 2.38 milyar dolardır [3]. İspanya'da *T. gondii* ye bağlı koyun abortları 4/74, *N. caninum*'a bağlı olanlar ise 5/74 oranında tespit edilmiştir. Keçilerde görülen abortlarda *N. caninum*'a 3/26, *T. gondii*'ye ise 1/26 oranında rastlanmıştır [24]. İnsanlar ve evcil hayvanlar açısından önemi oldukça fazla olan her iki parazitin de doğal yaşam döngüsünde yer alan yabani kanatlılar hakkında yapılan moleküler tanı ve prevalans çalışması çok azdır.

Bu araştırmada *T. gondii* ve *N. caninum* PZR ile dünyada ilk defa yedişer farklı kuş türünün beyin dokularında tek olarak, üç kuş türünde ise ikisi birlikte tespit edilmiştir. *Neospora caninum*'a en fazla oranda *Buteo rufinus*'ta, *T. gondii*'ye *Aquila pomarina*, *Accipiter nisus* ve *Strix aluco*'da rastlanmıştır. *Neospora caninum* ve *T. gondii*'ye en az oranda *Corvus corone*'da rastlanmıştır.

Benzer bir araştırma 2012 yılında İspanya'da yapılmış, on beş farklı türe ait toplam 201 adet yabani kuşun beyin dokusunun %6'sında *T. gondii* DNA'sı, %1.5'inde *N. caninum* DNA'sı tespit edilmiştir [4]. Mevcut araştırmada ise 20 farklı türe ait 101 adet yabani kuşun beyin dokusunun %7'sinde *T. gondii*, %14'ünde ise *N. caninum* DNA'sı tespit edilmiştir. İspanya'da *N. caninum* DNA'sının tespit edildiği iki kuş türü *Buteo buteo* ve *Pica pica* olup Türkiye'de her iki parazite ait DNA'ya bu kuşlarda rastlanmamıştır. İtalya'da yapılan bir araştırmada *Anas crecca*, *Anas platyrhynchos* ve *Anas clypeata* türü yabani kuşlarının beyinlerinde nested PZR metodu ile *T. gondii* pozitifliği tespit edilmiştir [13]. Mevcut araştırmada ise *Anas clypeata* türünde sadece *N. caninum* DNA'sı tespit edilmiştir.

Yırtıcı kuşların besin zincirinde yer alan fare gibi kemirgenler her iki parazit türü için konaklık yapabilen canlılardır. İngiltere'de PZR metodu ile beyin dokuları incelenen ara konak farelerde *N. caninum* %3, *T. gondii* %53, ratlarda ise *N. caninum* %4.4, *T. gondii* %42.2 oranında tespit edilmiştir [22]. İtalya'da *N. caninum* DNA'sına ratlarda %13.6, farelerde ise %3.6 oranında rastlanmıştır [23]. Her iki parazitin yaşam döngüsünde yer alan bu kemirgenler de tıpkı kuşlar gibi kedilerin besin zincirinde yer almaktadır.

Sulak alanlarda yaşayan kuşlar da beslenmeleri esnasında bu parazitlere ara konak olabilecek böcek ve diğer küçük canlıları bol miktarda tüketir. Bu kuşları ve kemirgenleri avlayan yırtıcılardan olan kediler sulak alanlara yakın yerlere dışkılayarak *T. gondii* nin doğal döngüsüne katkı sağlar. Böylece dışkı parçalarının yağmur suları ya da diğer doğa etkenlerine bağlı olarak su ve yaşam kaynaklarını kontamine etmesi mümkün olur. Karadeniz Bölgesindeki dere ve içme suyu kaynaklarının *T. gondii* DNA'sı yönünden PZR metodu ile analiz edildiği bir araştırmada dere sularında *T. gondii* DNA'sına rastlanma oranı

Tablo 2. Yabani kuşlarda *T. gondii* ve *N. caninum*'un moleküler prevalansı**Table 2.** Molecular prevalence of *T. gondii* and *N. caninum* in wild birds

Yörelere Göre Kuş Türleri			PZR Pozitif Örnek Sayısı		
Van İli Yaban Kuşları	Türkçe Karşılığı	Örnek Sayısı	<i>T. gondii</i>	<i>N. caninum</i>	Miks
<i>Larus genei</i>	İnce Gagalı Martı	17	-	3	-
<i>Corvus corone</i>	Gri Leş Kargası	21	1	1	1
<i>Melanitta fusca</i>	Kadife Ördek	3	1	2	1
<i>Pica pica</i>	Saksağan	1	-	-	-
<i>Anas clypeata</i>	Bayağı Kaşık Gaga	9	-	3	-
<i>Columba oenas</i>	Gökçe Güvercin	5	-	-	-
<i>Anser anser</i>	Boz Kaz	7	-	-	-
<i>Perdix perdix</i>	Çil Keklik	14	-	1	-
Hatay İli Yaban Kuşları					
<i>Aquila heliaca</i>	Şah Kartal	3	1	1	-
<i>Hieraetus pennatus</i>	Küçük Kartal	2	-	-	-
<i>Aquila pomarina</i>	Küçük Orman Kartalı	1	1	-	-
<i>Buteo rufinus</i>	Kızıl Şahin	5	1	3	1
<i>Buteo buteo</i>	Bayağı Şahin	4	-	-	-
<i>Accipiter nisus</i>	Bayağı Atmaca	1	1	-	-
<i>Strix aluco</i>	Alaca Baykuş	1	1	-	-
<i>Caprimulgus europaeus</i>	Çoban Aldatan	1	-	-	-
<i>Ciconia ciconia</i>	Leylek	3	-	-	-
<i>Merops apiaster</i>	Arı Kuşu	3	-	-	-
<i>Apus apus</i>	Ebabil	1	-	-	-
<i>Phoenicopterus roseus</i>	Flamingo	1	-	-	-

%35.7 olarak tespit edilmiştir [21]. Yabani kuşlar *T. gondii* ve *N. caninum*'a ait sporlanmış ookistleri ya da doku bradizoitlerini beslenme yolu ile alarak enfekte olabilmekte ve bu parazitlere ait DNA'ların, beyin dokusu gibi vücudun fizyolojik olarak korunaklı bölgelerinde PZR metodu ile tespit edilmesi tanıda değerli kabul edilmektedir.

Türkiye'de Niğde yöresinde evcil (*Columba livia domestica*) ve yabani (*Columba livia livia*) güvercinlerde *T. gondii*'nin seroprevalansının Sabin Feldman boya testi ile yoklanması amacıyla yapılan bir çalışmada sırasıyla %0.95 ve %0.90 oranlarında seropozitiflik tespit edilmiştir [25]. Kayseri yöresinde ise Sabin Feldman boya testi ile serolojik yoklaması yapılan yırtıcı kuşlardan 10 şahinin 1'inde (%10.00), 9 doğanın 1'inde (%11.11), 8 baykuşun 1 (%12.50) ve 9 atmancının 1'inde (%11.11) olmak üzere toplam 44 yırtıcı kuşun 4'ünde (%9.09) *T. gondii* spesifik antikorları tespit edilmiştir. Buna karşılık 7 kartal ve 1 balıkçılada seropozitiflik saptanamamıştır [26].

Yabani kuşlar, evcil kanatlılara göre birçok patojene karşı daha dayanıklıdır. Özellikle yabani göçmen kuşlar, taşıdıkları hastalık etkenlerini gittikleri yerlerdeki kanatlılara bulaştırarak, ekonomik kayıplara neden olabilmektedirler [27]. Sulak alanların yoğun olarak bulunduğu göl ve benzeri coğrafik yerler, bulaşıcı hastalıklar ve konta-

minasyon tehlikesi açısından yüksek riskli noktalar arasında gösterilmektedir. Yabani kuşların önemli göç yolları üzerinde bulunan, sulak alan ve kuş türü zengini olan Türkiye'nin de bu açıdan değerlendirildiğinde önemli risk noktalarına sahip olduğu görülmektedir [28-31].

Yırtıcı kuşlar ya da nesli tükenmekte olan kuşların da yer aldığı çalışmalarda, kullanılacak örneklere ait kesin rakamların önceden belirlenmemesi yaban hayatı dengesi ve yasal araştırma izinleri açısından önemlidir. Çünkü yaban hayatından elde edilen tür ve örnek sayıları arasında kesin bir denge kurulması kolay değildir. Bu nedenle benzer araştırma sonuçlarının istatistiki olarak değerlendirilmesi de bilimsel açıdan kolay olmamaktadır. Bu çalışmada enfeksiyonlara rastlanma oranları anlamlı çıkmış olsa da, yabani kuş türleri ve örnek sayılarının dengeli olmaması, bu sonuçların farklılıklara göre değerlendirilmesine engel olmaktadır. Örneğin bu çalışmada sadece bir adet rastlanan *A. pomarina* da *T. gondii* ye rastlanma oranı 1/1 olarak belirlenirken 17 adet örneklenen *L. genei* de *T. gondii*'ye rastlanma oranı 17/0 olarak bulunmuştur. Bu durum enfeksiyona rastlama yüzdesini %100 ya da %0 olarak ifade edilmesine neden olacaktır. Tablo 2 incelendiğinde benzer örnekler olduğu görülmektedir. Ayrıca bu çalışmada yer alan Hatay ve Van illerine ait örnekler arasında tür benzerliği de bulunmamaktadır. Bu tip verilerin tür ve örnek

sayıları arasında tam bir denge kurulmadan istatistiksel değerlendirmeye tabi tutulması farklı deneysel hatalara ve bilimsel yanlışlıklara yol açacaktır. Bu nedenle verilerin istatistiki değerlendirilmesi araştırmayı inceleyecek bilim insanlarının değerlendirmesine bırakılmıştır.

Bu araştırma göçmen kuşların kuzey-doğu ve güney göç yollarında yer alan en önemli dinlenme, beslenme ve üreme alanlarından Van ve Hatay illerinde gerçekleştirilmiştir. Yabani kuşların tercih ettiği doğal sulak alanlar belli mevsimlerde göçmen kuşlar tarafından da tercih edilebilmektedir. Bu durum *T. gondii* ve *N. caninum*'un göçmen kuşlar, kanatlı kuş türleri ve diğer canlılar arasındaki bulaşma olasılığını yükseltmektedir.

Sonuç olarak yabani kuşların *T. gondii* ve *N. caninum*'un doğal yaşam döngüsü içerisinde önemli yeri olduğu ancak konu hakkında ileri araştırmalar gerektiği görülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmada Namık Kemal Üniv., Veteriner Fak., Bioistatistik Anabilim Dalı Başkanı Yrd.Doç.Dr. Doğan NARINÇ'e istatistiki analiz katkıları, Yüzüncü Yıl Üniv., Veteriner Fak., Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd Doç.Dr. Serkan YILDIRIM'a nekropsi çalışması, 19 Mayıs Üniv., Veteriner Fak., Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd Doç.Dr. Yonca BETİL KABAK'a *Toxoplasma gondii* örneği, Kırıkkale Üniv., Veteriner Fak., Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Oğuz KUL'a *Neospora caninum* örneği gönderdikleri için teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Altay K, Dumanlı N:** Neosporosis, Toxoplasmosis. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*, 3 (2): 21-26, 2012.
- Leon A, Richard E, Fortier C, Laugier C, Fortier G, Pronost S:** Molecular detection of *C. burnetii* and *N. caninum* in equine aborted fetuses and neonates. *Prev Vet Med*, 1 (1-2): 179-183, 2012. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2011.11.001
- Reichel MP, Alejandra Ayanegui-Alcérrec M, Gondim LF, Ellis JT:** What is the global economic impact of *N. caninum* in cattle - The billion dollar question. *Int J Parasitol*, 43 (2): 133-142, 2013. DOI: 10.1016/j.ijpara.2012.10.022
- Darwich L, Cabezón O, Echeverría I, Pabón M, Marco I, Molina López R, Alarcia-Alejos O, López-Gatius F, Lavín S, Almería S:** Presence of *T. gondii* and *N. caninum* DNA in the brain of wild birds. *Vet Parasitol*, 10 (3-4): 377-381, 2012. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.07.024
- Mansourian M, Namavari M, Khodakaram-Tafti A, Rahimian A:** Experimental *N. caninum* infection in domestic bird's embryonated eggs. *J Parasitic Dis*, 37, 1-4. 2013. DOI: 10.1007/s12639-013-0327-0
- Mansourian M, Khodakaram-Tafti A, Namavari M:** Histopathological and clinical investigations in *N. caninum* experimentally infected broiler chicken embryonated eggs. *Vet Parasitol*, 23 (3-4): 185-190, 2009. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.09.041
- Furuta PI, Mineo TW, Carrasco AO, Godoy GS, Pinto AA, Machado RZ:** *N. caninum* infection in birds: Experimental infections in chicken and embryonated eggs. *Parasitology*, 134 (14): 1931-1939, 2007.
- Bartels CJ, Wouda W, Schukken YH:** Risk factors for *N. caninum* associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology*, 15 (2): 247-257, 1999. DOI: 10.1016/S0093-691X(99)00126-0
- Otranto D, Llazari A, Testini G, Traversa D, Frangipane di Regalbano A, Badan M, Capelli G:** Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Vet Parasitol*, 1 (1-2): 7-18, 2003. DOI: 10.1016/j.

vetpar.2003.10.008

- McGuire AM, McAllister M, Wills RA, Tranas JD:** Experimental inoculation of domestic pigeons (*C. livia*) and zebra finches (*P. guttata*) with *N. caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol*, 29 (10): 1525-1529, 1999. DOI: 10.1016/S0020-7519(99)00103-4
- Mineo TW, Carrasco AO, Raso TF, Werther K, Pinto AA, Machado RZ:** Survey for natural *N. caninum* infection in wild and captive birds. *Vet Parasitol*, 15 (2-4): 352-355, 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.05.022
- Elmore SA, Jones JL, Conrad PA, Patton S, Lindsay DS, Dubey JP:** *Toxoplasma gondii*: Epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol*, 26 (4): 190-196, 2010. DOI: 10.1016/j.pt.2010.01.009
- Mancianti F, Nardoni S, Mugnaini L, Poli A:** *T. gondii* in Waterfowl: The First Detection of this parasite in *A. crecca* and *A. clypeata* from Italy. *J Parasitol*, 99 (3): 561-563, 2013.
- Heinzel H, Fitter R:** Türkiye ve Avrupa'nın Kuşları. Doğal Hayatı Koruma Derneği Yayınları, İstanbul, 1995.
- Kızıroğlu İ:** Türkiye Kuşları Cep Kitabı. GeoTurka, İstanbul, 2013.
- Kızıroğlu İ:** Türkiye Kuşları. Orman Genel Müdürlüğü Yayınları. Ankara, 1989.
- Porter RF, Christensen S, Schiermacker-Hansen P:** Türkiye ve Orta-doğu'nun Kuşları. Uzerler Matbaası, Ankara, 2009.
- Svensson L, Mullarney K, Zetterström D, Grant PJ:** Collins Bird Guide, 2nd ed., Harper Collins Publishers Ltd, Printer, Trento, Italy. 2010.
- Jones CD, Okhravi N, Adamson P, Tasker S, Lightman S:** Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41 (3): 634-644, 2000.
- Müller N, Zimmermann V, Hentrich B, Gottstein B:** Diagnosis of *N. caninum* and *T. gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. *J Clin Microbiol*, 34 (11): 2850-2862, 1996.
- Koloren Z, Demirel E:** Detection of *T. gondii* in Turkish river and drinking water samples by different PCR and LAMP methods. *Clean - Soil Air Water*, 41 (10): 963-968, 2013. DOI: 10.1002/clen.201200468
- Hughes JM, Williams RH, Morley EK, Cook DA, Terry RS, Murphy RG, Smith JE, Hide G:** The prevalence of *N. caninum* and co-infection with *T. gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. *Parasitology*, 1328 (1): 29-36, 2006. DOI: 10.1017/S0031182005008784
- Ferroglio E, Pasino M, Romano A, Grande D, Pregel P, Trisciuglio A:** Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. *Vet Parasitol*, 30 (148): 346-349, 2007. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.06.031
- Moreno B, Collantes-Fernández E, Villa A, Navarro A, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM:** Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Vet Parasitol*, 8 (1-2): 312-318, 2012. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.12.034
- Karatepe M, Kılıç S, Karatepe B, Babür C:** Niğde yöresinde evcil (*Columba livia domestica*) ve yabani güvercinlerde (*Columba livia livia*) *Toxoplasma gondii* antikorlarının prevalansı. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 35, 23-26, 2011. DOI: 10.5152/tpd.2011.06
- İnci A, Babür C, Çam Y, İça A:** Kayseri yöresinde bazı yırtıcı kuşlarda Sabin-Feldman boya testi ile *Toxoplasma gondii* (Nicolle ve Manceaux, 1908) seropozitifliğinin araştırılması. *F Ü Sağlık Bil Derg*, 2, 177-179, 2002.
- Sentürk B, Güler H:** Financial effects of HPAI H5N1 cases on backyard poultry in the Kızılırmak Delta. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 20 (1): 73-78, 2014. DOI: 10.9775/kvfd.2013.9454
- Boynukara B, Gulhan T, Adizel O, İlhan Z, Aksakal A, Durmus A, Ekin IH, Ogun E, Coven F, Solmaz H:** Determination of Avian Influenza A Viruses in some avian species in Van Lake basin by Real Time-PCR, isolation and subtyping. *J Anim Vet Adv*, 10 (4): 502-510, 2011. DOI: 10.3923/javaa.2011.502.510
- Hénaux V, Samuel MD:** Avian influenza shedding patterns in waterfowl: Implications for surveillance, environmental transmission, and disease spread. *J Wildl Dis*. 47(3): 566-578, 2011.
- Mehrabanpour MJ, Rahimian A, Shirazinezhad A, Moein H, Shayanfar MA:** Avian influenza virus in migratory and resident birds during migratory season in Boushehr, Iran. *Turk Vet Anim Sci*, 36 (4): 446-450, 2012. DOI: 10.3906/vet-1105-25
- Hénaux V, Samuel MD, Dusek RJ, Fleskes JP, Ip HS:** Presence of avian influenza viruses in waterfowl and wetlands during summer 2010 in California: Are resident birds a potential reservoir? *PLoS One*, 7 (2): 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0031471