



Sığırlarda Hypodermosise Sebep Olan Türlerin Sitokrom Oksidaz I Gen Dizilerinin PCR-RFLP Tekniği ile Araştırılması

Cytochrome Oxidase I Gene Sequences That Cause Hypodermosis Cattle Species by PCR-RFLP Technique Investigation

Bekir Oğuz

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye

ÖZET

Amaç: Sığır sağlığı açısından önemli bir yeri olan Hypodermosis (Nokra) hastalığına neden olan türlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: *Hypoderma* türlerinin belirli dizileri üzerinde bulunan Sitokrom Oksidaz I (COI) (mtDNA) geni PCR-RFLP yöntemiyle moleküler analizi başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Genomik Deoksiribonükleik asit (DNA)'ler ekstraksiyon kit kullanılarak elde edildi, agaroz jelde COI geni için 688bp'lik DNA ürünü veren mitokondrial DNA geninin polimeraz zincir reaksiyonuyla (PCR) amplifikasyonu sağlandı. PCR amplifikasyonu ve HinfI, RsaI ve TaqI restriksiyon enzimleri kullanılarak RFLP tekniği ile mitokondrial DNA gen bölgesi amplifiye edildi.

Sonuç: Mitokondrial COI gen bölgesinin *Hypoderma* cinsinin tür seviyesindeki sorulara yanıt için moleküler tanımlama potansiyel olarak çok yararlı olduğunu gösterir. Bu çalışma, Van şehrinde, *Hypoderma* türlerinin tanımlandığı ilk moleküler çalışma olması açısından da önemlidir. (*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 190-4)

Anahtar Sözcükler: *Hypoderma bovis*, *Hypoderma lineatum*, COI, PCR-RFLP, hypodermosis

Geliş Tarihi: 20.03.2013 **Kabul Tarihi:** 01.07.2013

ABSTRACT

Objective: The importance for the health of cattle *Hypodermosis* (Nokra) species that cause disease by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method was investigated.

Methods: The molecular analysis of *Hypoderma* species specific sequences located on the Cytochrome C Oxidase I (COI) (mtDNA) gene by PCR-RFLP method was successfully carried out.

Results: DNAs were obtained using the extraction kit and Polymerase chain reaction (PCR) for amplification of the mitochondrial DNA gene yielded for 688bp COI gene on agarose gel. Using the PCR amplification and HinfI, RsaI and TaqI restriction enzymes, mitochondrial DNA gene regions were amplified with the RFLP technique.

Conclusion: The mitochondrial COI gene region of the genus *Hypoderma* for the molecular identification of potential answers questions, such as the level, which indicates that it may be very useful. In this study, in the city of Van, it is also important that the *Hypoderma* species be defined in terms of the first molecular study. (*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 190-4)

Key Words: *Hypoderma bovis*, *Hypoderma lineatum*, COI, PCR-RFLP, hypodermosis

Received: 20.03.2013

Accepted: 01.07.2013

GİRİŞ

Sığırlarda hypodermosis, *Hypoderma bovis* ve *H. lineatum* türü sineklerin larvaları tarafından oluşturulan bir deri myiazisidir. Mevsimsel olarak sonbahar, kış ve hatta ilkbahar döneminde görülen ve enfeste hayvanların dorsal ve lumbal bölgelerinde bulunan deri altı şişlikleriyle karakterize olan paraziter bir hastalıktır (1). Bu paraziter hastalık, tropikal ve subtropikal bölgelerde çok yaygın olup, sığırlarda süt ve et verimi düşüklüğü ve deride oluşturduğu hasarlardan dolayı önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır (2-6). Hypodermosis'in yayılışı ve bu hastalığa sebep olan etkenlerin enfestasyon oranı, iklim ve coğrafi konumu birbirinden farklı ülke veya bölgelere göre değişmektedir (7). Türkiye'nin değişik coğrafik bölgelerinde yapılan çalışmalarda, *Hypoderma* enfestasyonu yaygınlığının Karadeniz'de %28,3, Marmara'da %8,0, Ege'de %41,6, Akdeniz'de %33,0, İç Anadolu'da %38,9, Doğu Anadolu'da %41,9, Güneydoğu Anadolu'da %47,8 oranlarında olduğunu belirtilmiştir (7).

Hypoderma türlerinin morfolojik teşhisi, canlı ve kesilen hayvanlardan kolaylıkla elde edilebilen üçüncü dönem larvalar üzerinde gerçekleştirilebilmektedir. Üçüncü dönem larvaların morfolojik olarak ayırımı zor değildir, ancak bazen, *Hypoderma* türlerinin benzer ekolojik, biyolojik ve morfolojik özelliklere sahip olmasından dolayı güç olabilir (8). Bu klasik yöntemlerin literatürlerde sınırlı kalması ve gelişen dünyamızda farklı teşhis yöntemlerinin ortaya çıkışı nedeniyle moleküler tekniklere gerek duyulmuştur. Yapılan Bu çalışma ile, sığırlarda görülen *Hypoderma bovis* ve *H. lineatum* türleri üçüncü dönem larvaların mitokondrial Sitokrom Oksidaz I (COI) gen bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFLP) ile araştırılması amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Bu çalışmanın materyalini Şubat 2011 ile Mayıs 2011 tarihleri arasında Van Belediye Mezbahasına kesim için getirilen ve hypodermosis ile enfeste olduğu belirlenen çeşitli sığır türlerininin sırtından elle ya da kesimden sonra karkasın deri altı dokularından toplanan ikinci ve üçüncü dönem larvalar oluşturmuştur. Araştırma için dört ay boyunca haftada 3 kez kesimin en yoğun olduğu günlerde mezbahaya gidilmiştir.

Morfolojik Analiz

Toplanan 300 larvanın tür ve buldukları dönem teşhisleri *Hypoderma* türlerinin üçüncü dönem larva teşhis anahtarı kullanılarak morfolojik ayrımları stereo mikroskop altında yapılmıştır (9). Teşhisi yapılan *Hypoderma* larvaları Phosphate Buffered Saline, Fosfat Tamponlu Salin (PBS) ile yıkandıktan sonra %70'lik etanole bırakılarak moleküler analizler yapıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Moleküler analizler için sadece üçüncü dönem larvalar kullanılmıştır.

Moleküler Analiz

Deoksiribonükleik asit saflaştırılması Qiagen firmasına ait DNeasy Blood and Tissue Kit (Kat no: 69504, Qiagen, Hilden, Germany) genel kurallarına uymak koşuluyla bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Genomik DNA izolasyonu için ilk önce etanole korunmuş larvalar PBS ile 5 defa yıkanmış, daha sonra larvaların iç organları çıkartılıp 20 µL proteinaz K ilave edilerek, 55°C'lik su banyosunda tamamen lize oluncaya kadar bir gece bekletilmiştir.

Sindirimden sonra kit prosedürü takip edilmiş son adımda spin kolon yeni bir tüpe alınarak, üzerine 200 µL elution buffer eklenip, oda ısısında 1 dak. bekletildikten sonra, 6000 g'de 1 dak. santrifüj edilerek kalan örnek genomik DNA olarak kullanılmıştır. Genomik DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Mitokondriyal COI gen bölgesi önceden tanımlanmış spesifik primerler kullanılarak PCR ile amplifiye edilmiştir: F: UEA7(CI-J-2369), 5'-TAC AGT TGG AAT AGA CGT TGA TAC -3' ve R: UEA10 (TL2-N3014), 5'-TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A-3' 25 µL içeren toplan hacimde 10XPCR buffer 3 µL, 25 mM MgCl₂ 3 µL, 25 mM dNTP 3 µL, her bir primer 1 µL, Taq DNA polimeraz 5 U/µL 0,2 µL, genomik DNA 4 µL ve dH₂O 10,8 µL kullanılmıştır. Mitokondriyal COI geni için PCR şartları; PCR termal döngü şartları 95°C'de 2 dak. ön denatürasyon, 95°C'de 1 dak. denatürasyon, 51°C'de 1 dak. annealing (bağlanma) ve uzama 72°C'de 1 dak. (40 siklus) ve 72°C'de 7 dak. son uzama şeklinde gerçekleştirilerek ve örnekler + 4°C'de bekletilmiştir (Eppendorf Mastercycler gradient, Germany). PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde ethidium bromide ile boyanarak koşturuldu. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde etidyum bromit ile boyanmış, daha sonra 100 Voltluk akımda 1 saatlik koşturma işleminden sonra UV'de fotoğraflanmıştır (Syngene in genius, USA).

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri Hinfl için: 10 µL PCR ürünü, 2,5 µL 1XNEBuffer 2 Tamponu, 0,5 µL BstUI (New England BioLabs, UK Ltd) toplam volüm 20 µL'ye distile su ile tamamlanarak ve 37°C'de overnight (bir gece), Taq^I için: 10 µL PCR ürünü, 2,5 µL 1XNEBuffer 2 Tamponu, 0,5 µL MspI restriksiyon enzimi (New England BioLabs, UK Ltd.) toplam volüm 20 µL'ye distile su ile tamamlanarak ve 65°C'de overnight (bir gece), RsaI için: 10 µL PCR ürünü, 2,5 µL 1XNEBuffer 2 Tamponu, 0,5 µL MspI restriksiyon enzimi (New England BioLabs, UK Ltd.) toplam volüm 20 µL'ye distile su ile tamamlanarak ve 65°C'de overnight (bir gece) bekletilmiş, daha sonra yeniden Hinfl, Taq^I ve RsaI restriksiyon enzimleri ile muamele edilmiş PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde etidyum bromit ile boyanarak, daha sonra 100 Voltluk akımda 1 saatlik koşturma işleminden sonra UV'de fotoğraflanmıştır (Syngene in genius, USA).

BULGULAR

Toplanan 300 larvanın morfolojik analizleri yapılarak, 280'e *Hypoderma bovis*, 20'sine ise *H. lineatum* teşhisi konulmuştur (Resim 1).

Yirmisi *H. bovis*, 10'u *H. lineatum* olan toplam 30 adet 3. dönem larvanın hepsinde DNA izalasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir. *Hypoderma* larvaları için örneklenmiş PCR ürünlerinin COI (mtDNA) geni amplifikasyonu başarıyla sağlanmıştır. Mitokondriyal COI geni için beklenen PCR ürününün boyutu 688bp'dir (Resim 2).

Sitokrom Oksidaz I (mtDNA) geni PCR ürünlerinin RFLP sonuçları, *Hypoderma bovis* larvaları için Hinfl restriksiyon enziminin sindiriminden sonra; 300bp ve 388bp'lik, *Hypoderma lineatum* larvaları için Taq^I restriksiyon enziminin sindiriminden sonra; 288bp-400bp'lik ve *Hypoderma bovis* larvaları için Taq^I restriksiyon enziminin sindiriminden sonra ise 250bp-438bp'lik, her iki türün larvaları için RsaI restriksiyon enziminin sindiriminden sonra; ~600bp ve ~680bp'lik bantların verildiği gösterilmiştir (Resim 3).



Resim 1. Hypoderma bovis (A). Hypoderma lineatum (B)

TARTIŞMA

Sığırlarda hypodermosis Türkiye’de oldukça yaygındır ve ortalama enfestasyon oranı bazı bölgelerde %84’e ulaşmaktadır (7). Bu veriler genellikle mezbaha içinde kesilen sığırlardan elde edilmiştir. Türkiye’deki sığırlarda bu hastalığa neden olan etkenlerden *Hypoderma bovis*’in, *H. lineatum*’a nazaran daha çok görüldüğü gözlenmektedir (10). Özdal ve Değer (11), Van Belediye mezbahasında yapmış oldukları bir çalışmada hypodermosis sığırlarda %35,85, koyunlarda %3,37, keçilerde %10,32 oranında rastlandığını bildirmişlerdir. Ayrıca hypodermosisden sorumlu türlerin sığırlarda *H. bovis* ve *H. lineatum*, koyun ve keçilerde ise *Przhevalskiana silenus* olduğunu tespit etmişlerdir. Taşçı ve ark. (12), yaptıkları bir çalışmada Van ve yöresinde sığırlarda hypodermosis’ten sorumlu türlerin *H. bovis* ve *H. lineatum* olduğu enfestasyonun %65 gibi yüksek bir insidensi bulunduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada mezbahada kesim sonrası toplanan 300 larvanın %93,33’ünün *H. bovis*, %6,66’sının *H. lineatum* olduğu görülmüştür. Çalışma sonucunda *H. bovis*’in *H. lineatum*’a oranla daha yüksek bulunduğu tespit edilmiştir. *Hypoderma* türlerinin morfolojik identifikasyonu, canlı ve kesilen hayvanlardan kolaylıkla elde edilebilen üçüncü dönem larvalar üzerinde gerçekleştirilebilmektedir.

Hypoderma türlerinin morfolojik teşhisinde ortaya çıkan büyük zorluklar çeşitli faktörlere bağlıdır; tüm gelişme safhalarının koleksiyonlarının az oluşu, kötü örnek korunması (özellikle ergin sinek numunesi için), farklı ülkeler ve hayvanlardan toplanan larva örnekleri arasındaki farklılıklar, L3’teki koyu kahverenkli kitinin (peritrem yapısını görselleştirmede zorluk çıkartabilmesi), etanol korunması ile larva yüzeyinde konakçı doku varlığının sertleşmesi gibi (13). Bu klasik yöntemlerin literatürlerde sınırlı kalması, bazen tür teşhisinde yanlışlara sebebiyet verebilmeleri ve gelişen dünyamızda farklı teşhis yöntemlerinin ortaya çıkışı nedeniyle son zamanlarda moleküler tekniklere gerek duyulmuştur. RFLP yöntemi COI geninin (*Haelll*, *Trull*, *TaqI*, *Rsal*, *HpaII*, *Hinf* I enzimleri ile) İtalya’da Oestridae ailesinin türlerinde en yaygın kullanılan bir gen olmuş ve Oestridae ailesindeki türler arasındaki genetik farklılığı açıkça göstermektedir (14).

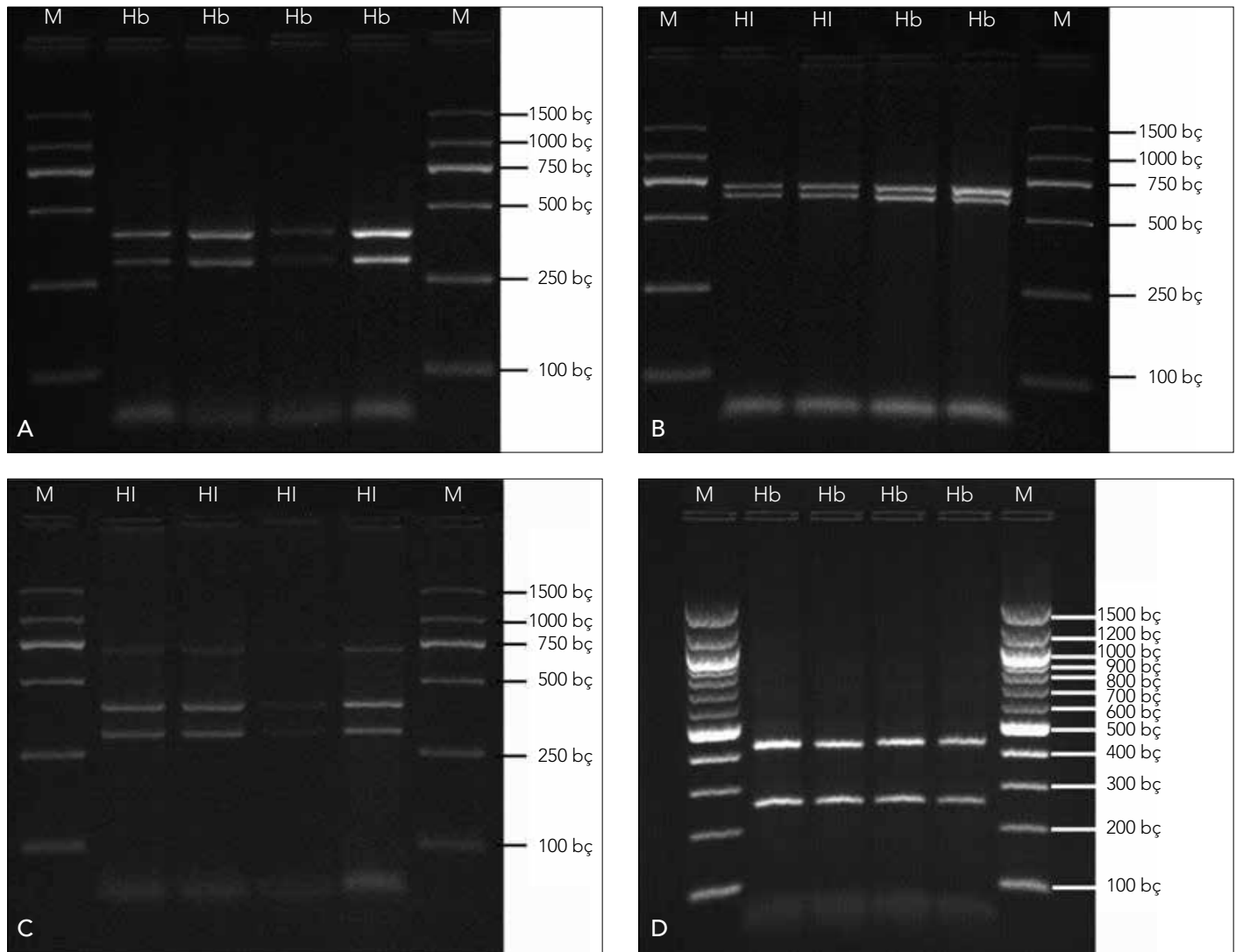
Balkaya ve ark. (15), *Hypoderma* türlerini ayırt etmek için PCR-RFLP yöntemi ile *TaqI* restriksiyon enzimi kullanılarak *H. bovis* için 438bc ve 250bc, *H. lineatum* için 488bc ve 200bc’lik bantlar bulmuşlardır. Araştırmacılar çalışmada sığırları etkileyen üçüncü



Resim 2. *Hypoderma* türlerinde mitokondrial COI geninin PCR amplifikasyonu. H: *Hypoderma bovis* ve *Hypoderma lineatum* (688bc). M: marker 250bc

dönem *Hypoderma* larvalarını tanımlamak için iki farklı sonuçlar elde etmiş ve morfolojik teşhis zayıflık göstermiştir. Toplam morfolojik olarak 10 larva incelenerek 7’si *H. bovis*, 3’üne *H. lineatum* olarak tespiti konulmuş ancak *Hypoderma* türlerinin mitokondriyal COI sekansları incelendiğinde ve örneklerin hepsinin *H. bovis* olduğunu gösteren sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada toplam morfolojik olarak 300 larvadaki 30’u larva incelenerek 20’si *H. bovis*, 10’u *H. lineatum* olarak teşhis edilmiştir. *Hypoderma bovis* ve *Hypoderma lineatum* larvaları için iki farklı sonuç sadece *TaqI* restriksiyon enziminin sindiriminden sonra elde edilmiştir. *H. lineatum* için sırasıyla 288bc ve 400bc’lik ve *H. bovis* için sırasıyla 250bc ve 438bc’lik bant gözlemlenmiştir. *Rsal* restriksiyon enzimlerinde iki tür için aynı bantlar bulunmuştur. *HinfI* restriksiyon enzimiyle sadece *H. bovis* larvalarına bakılarak 300bc ve 388bc’lik bant bulunmuştur. Buna göre çalışmada COI genin en değişken kısmı karakterize edilmek için, *H. bovis* ve *H. lineatum* larvalarının karboksil terminal dış lop 4 ile kapsayan bölge için kodlama kullanılması gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Otronto ve ark. (14), *H. bovis* ve *H. lineatum* larvaları için *Rsal* restriksiyon enzimi sindiriminden sonra yaklaşık 600-688bc’lik bant görüntülemişlerdir. Aynı çalışmada *H. bovis* ve *H. lineatum* larvaları için *TaqI* restriksiyon enzimi sindiriminden sonra yaklaşık 300-388bc’lik, *HinfI* restriksiyon enzimi sindiriminden sonra ise yaklaşık 400-688bc’lik bant bulmuşlardır. *Hypoderma bovis* ve *Hypoderma lineatum* larvalarının RFLP sonuçları aynı çıkmıştır. Otronto ve ark. (14), göre *Hypoderma bovis* ve *Hypoderma lineatum* türleri arasında moleküler anlamda belirgin bir fark yoktur. Bu çalışmada *H. bovis* ve *H. lineatum* larvalarının COI genine PCR-RFLP yöntemi ile baktığımızda *Rsal* restriksiyon enzimi sindiriminden sonra ~600bc ve ~680bc’lik, *TaqI* restriksiyon enzimi



Resim 3. COI (mtDNA) geninin PCR ürünlerinin RFLP (a- HinfI, b- RsaI, c- TaqI, d- TaqII) sonuçlarının %2'lik agaroz jel görüntüleri. Hb: *H. bovis*, HI: *H. lineatum*. M: marker 250bç ve M: marker 100bç

sindiriminden sonra *H. lineatum* için sırasıyla 288bç ve 400bç'lik ve *H. bovis* için sırasıyla 250bç ve 438bç'lik bant gözlemlenmiştir. *H. bovis* larvalarının HinfI restriksiyon emzimi sindiriminden sonra ise 300bç ve 388 bç'lik bant gözlemlenmiştir. Çalışmada *H. bovis* ve *H. lineatum* larvaları RsaI restriksiyon enziminin aynı bantları vermiştir. Ayrıca PCR-RFLP tekniği ile *Hypoderma* larvalarının teşhisinde TaqI restriksiyon enzimi kullanılmalı çünkü bu iki tür arasında TaqI restriksiyon enzimi ile farklı sonuçlar elde edilmiştir. COI geni *Hypoderma* türlerinin teşhisinde zayıf olabilir ancak *Oestridae* ailesindeki türler arasındaki genetik farklılığı açıkça gösterebildiği kuşkusuzdur.

SONUÇ

Sığırlarda hypodermosisin Van bölgesinde halen yaygın ve ekonomik kayıplarla sonuçlanan bir enfestasyon olduğu görülmektedir. Mitokondrial COI gen bölgesinin *Hypoderma* cinsinin tür seviyesindeki sorulara yanıt için moleküler tanımlama potansiyel olarak çok yararlı olduğunu gösterir. Buna göre moleküler yaklaşımlar sadece parazit tanımlama değil aynı zamanda hypodermosis ile

ilgili davranışlar gibi birçok özelliklerini incelemek için en iyi yol olarak görülmektedir. Diğer yandan taksonomik tespitler yararlı olabilir ve myiasis epidemiyolojisi ile ilgili çalışmak için yeni bir araç oluşturabilir. Paraziter hastalıkların ortaya çıkmasına neden olan türlerin doğru teşhis edilmesine yönelik moleküler teknik araştırmaları bu çalışmanın yanında diğer parazit türlerinin teşhisinde de tanıyı doğrulayıcı yöntemler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Profe No: 2011-SBE-D044) tarafından desteklenmiştir.

Hakem değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Conflict of Interest

This study was supported by Yüzüncü Yıl University Department of Scientific Research Projects (Project Number: 2011-SBE-D044).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

KAYNAKLAR

1. Otranto D, Testini G, Sottili R, Capelli G, Puccini V. Screening of commercial milk samples using ELISA for immuno-epidemiological evidence of infection by the cattle grub (Diptera, Oestridae). *Vet Parasitol* 2001; 99: 241-8. [\[CrossRef\]](#)
2. Mimioğlu MM. Veteriner ve Tıbbi Artropodoloji. Ankara Üniversitesi Basımevi Ankara; 1973.
3. Soulsby E.J.L. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals, 7 th. Ed. The English Language Book Society and Bailliere Tindal, London, 1982 .p. 432-37.
4. Kettle D.S. Medical and Veterinary Entomology. CAB International: Wallingford. Oxon, UK. 1990. p. 267-73.
5. Scholl P.J. Biology and Control of Cattle Grubs. *Annu Rev Entomol* 1993; 39: 53-70. [\[CrossRef\]](#)
6. Dinçer Ş. İnsan ve Hayvanlarda Myiasis. Edit. Özcel MA, Daldal N. Parazitoloji 'de Artropod Hastalıkları Vektörler. Türkiye Parazitoloji Derneği. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi 1997. 13. p. 212-16.
7. Sayın F, Kalkan A, Karaer Z. Türkiye'de Sığır Hypodermosis'i Üzerine Epidemiyolojik Araştırmalar. *F Ü Sağlık Bil Dergisi* 2000; 14: 115- 27.
8. Otranto D, Traversa D, Tarsitano E, Stevens J. Molecular differentiation of *Hypoderma bovis* and *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Vet Parasitol* 2003; 12: 197-201. [\[CrossRef\]](#)
9. Zumpt F. Myiasis in Man and Animals in the Old World. Butterworths, London, 1965. p. 267.
10. Sayın F, Boulard C, Thornberry H, Boulard C (ed.), Thornberry H. Present situation of hypodermosis in Turkey, Warble fly control in Europe. A symposium in the EC Programme of Coordination of Research on Animal Pathology, Brussels. 16-17 September 1982, 39, 41.
11. Özdal N, Değer S. Van Belediye Mezbahasında kesilen sığır, koyun ve keçilerde Hypodermosis. *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.* 2005; 16: 23-25. Erişilebilir: URL: http://vfdergi.yyu.edu.tr/archive/2005/16_2/2005_16_2_23-25.pdf.
12. Taşcı S, Değer S, Akgül Y. Van ve yöresinde Hypodermosis. *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.* 1994; 5: 143-53. Erişilebilir: URL: http://vfdergi.yyu.edu.tr/archive/1994/5_1-2/1994_5_1-2_143-153.pdf.
13. Otranto D, Colwell DD, Traversa D, Stevens JR. Species identification of Hypoderma affecting domestic and wild ruminants by morphological and molecular characterization. *Med. Vet. Entomol.* 2003a; 17: 316-25. Available from: URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2915.2003.00446.x/pdf>
14. Otranto D, Tarsitano E, Giangaspero A, Puccini V. Differentiation by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of some Oestridae larvae causing myiasis. *Vet Parasitol* 2000; 90: 305-13. [\[CrossRef\]](#)
15. Balkaya İ, Simsek S, Saki CE. A serological and molecular survey of cattle hypodermosis in east-Turkey. *Vet Parasitol* 2010; 173: 287-91. [\[CrossRef\]](#)