

Türkiye'de İnsan *Fasciola hepatica* İzolatının Moleküler Karakterizasyonu

Salih KUK * Süleyman YAZAR * 

* Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, TR-38039 Kayseri - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2012-6064

Özet

Fasciola hepatica, hem hayvanları hem de insanları enfekte eden, önemli patolojilere ve ekonomik kayıplara sebep olan bir karaciğer trematodur. Günümüze kadar daha çok morfolojik olarak tanımlanan parazit, son yıllarda ara *Fasciola* formlarının bulunmasıyla birlikte moleküler olarak karakterize edilmeye çalışılmıştır. Ülkemizde hem hayvanlarda hem de insanlarda saptanan *F. hepatica*'nın hayvan izolatları moleküler olarak tanımlanmasına rağmen bugüne kadar insan izolatlarının moleküler karakterizasyonu yapılmamıştır. Bu çalışmada *F. hepatica* insan izolatının moleküler karakterizasyonu amaçlanmıştır. Bu amaçla; Kayseri'de insan safra yollarından çıkarılan erişkin *F. hepatica*'dan elde edilen genomik DNA'dan PCR ile ITS-2 bölgesine spesifik primerler kullanılarak PCR ürünü elde edilmiştir. Agaroz jelde görüntülenen DNA, jelden Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System kullanılarak saflaştırılmış ve DNA dizi analizi yapılmıştır. DNA dizi analiz sonucu, BLAST analizi ve MEGA program ile filogenetik analiz yapılarak değerlendirilmiştir. Genomik DNA'dan 510 bp'lik PCR ürünü elde edilmiştir. DNA dizisi saptanan insan *F. hepatica* izolatının, BLAST ve filogenetik analiz sonucunda Türkiye'den bildirilen hayvan izolatlarıyla benzer olduğu belirlenmiştir. Fazla sayıda insan ve hayvan *F. hepatica* izolatlarıyla ve ITS-2 dışında diğer genetik markerlerle desteklenmesi gereken bu çalışma sonucunda; Türkiye'de ilk kez bir insan *F. hepatica* izolatının moleküler karakterizasyonu yapılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Fasciola hepatica*, Moleküler analiz, Türkiye

Molecular Characterization of Human Isolate of *Fasciola hepatica* in Turkey

Summary

Fasciola hepatica is a liver trematoda that infect both humans and animals, causing significant pathology and economic losses. They can generally be distinguished on the basis of their morphology. *F. hepatica* is determined both in animals and humans in our country. To date although animal isolates of *F. hepatica* was described the characterization of molecular human isolates have not been performed. The aim of this study was to identify and characterization of human isolate of *F. hepatica* in Turkey. Genomic DNA from adult *F. hepatica* derived from human biliary duct in the Kayseri was extracted using the Wizard Genomic DNA Purification kit according to the manufacture's instructions. DNA was amplified using ITS-2 targeted primers. PCR products were visualized on 1.5% agarose gel containing ethidium bromide. The fragments of amplified DNA were approximately 500-510 bp long. PCR products were purified using the Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System. Nucleotide sequence analysis was undertaken by BLAST algorithms and multiple sequence alignments were made with the ClustalW method, with MEGA5 and compared with sequences retrieved from GenBank. As a result, BLAST and Phylogenetic analyses of DNA isolation, announced from Turkey, were found to be similar to other animal isolates. This is first study to characterization of human isolate of *F. hepatica* in Turkey. We consider that the study should be supported by more human isolates of *F. hepatica* and other genetic markers.

Keywords: *Fasciola hepatica*, Molecular analysis, Turkey

GİRİŞ

Fasciolosis, *Fasciola* türleri tarafından oluşturulan bir hastalıktır. Özellikle tropikal ülkelerde geviş getiren hayvanların en önemli helmint hastalıklarından biri olup ciddi

sosyo-ekonomik kayıplara sebep olmaktadır ^{1,2}. Meta-serkarya ile enfekte su ve su bitkilerinin alınmasıyla insana bulaşan hastalık insanda karaciğer ve safra yollarına yer-



İletişim (Correspondence)



+90 352 4374937/23401

Mobile: +90 532 4223639



syazar@erciyes.edu.tr

leşmekte ve önemli patolojilere sebep olmaktadır ^{3,4}. Fasciolosis tanısında koprolojik ve serolojik yöntemlerin yanısıra özellikle son yıllarda ara *Fasciola* türlerinin bulunmasıyla moleküler yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır ⁵. Ülkemizde hem hayvanlarda hem de insanlarda saptanan *F. hepatica*'nın hayvan izolatları moleküler olarak tanımlanmasına rağmen bugüne kadar insan izolatlarının moleküler karakterizasyonu yapılmamıştır ⁶. Bu çalışmada ülkemizde tespit edilen *F. hepatica* insan izolatının moleküler karakterizasyonu amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Parazit

Çalışmada insan safra yollarından elde edilen *F. hepatica* izolatu kullanılmıştır. Anabilim dalı laboratuvarımıza tanımlanması amacıyla gönderilen parazit morfolojik olarak *F. hepatica* olarak tanımlanmıştır. Distile su ile yıkanan parazit sonraki basamaklarda kullanılmıştır.

DNA İzolasyonu

Erişkin *F. hepatica*'dan total DNA izolasyonu wizard genomic DNA purification kiti kullanılarak yapılmıştır. Bu işlem için öncelikle erişkin parazit homojenizatörde (WiseTis) homojenize edilerek üzerine 600 µl EDTA-nucleilysis solution ve 20 mg/ml proteinaz K'dan 17.5 µl proteinaz K eklenip 55°C'de karıştırıcıda bir gece inkübe edilmiştir. Üzerine 3µl RNAase solution eklenerek 37°C'de 30 dk inkübe edildikten sonra üzerine 200 µl protein-precipitation solution eklenip buz üzerinde 5 dk bekletilerek 13.000 rpm 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atıldıktan sonra pellet 1ml %70 etanol ile yıkanarak 13.000 rpm 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası etanol aspire edilip pellet kurutulmuştur. Pellet 100 µl DNA rehydration solüsyonu ile rehydrate edildikten sonra elde edilen DNA kullanıma kadar -20°C'de saklanmıştır.

Polymeraz Zincir Reaksiyonu

Total genomik DNA'da aşağıdaki primerler kullanılarak PCR reaksiyonu ve döngüsü ile PCR ürünü elde edildi.

Primer FTM F (5'-CGG TGG ATC ACT CGG CTC GT-3')

Primer FTM R (5'-CCT GGT TAG TTT CTT TTC CTC CGC-3')

PCR reaksiyonu	PCR döngüsü
2.5X Master mix (Vivantis)	12.5 µl
Total Genomik DNA	1 µl
Primer FTM F,R	3 µl
Distile su	18.5 µl
	25 µl
	95°C 5 dk
	94°C 1 dk
	55°C 1 dk
	72°C 1 dk
	72°C 15 dk

PCR ürünleri %1.5'luk etidyum bromidle boyanmış agaroz jelde yürütüldü ve Gel Logic 212 Pro Jel görüntüleme cihazında (Carestream) görüntülendi.

PCR Ürünün Agaroz Jelden Saflaştırılması

Agaroz jelde görüntülenen DNA, jelden Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) kullanılarak saflaştırılmıştır. Bunun için elektroforez sonrası jelde görüntülenen DNA jelden kesilip tartıldıktan sonra ependorf tüpe konuldu. Üzerine jelin her 10 mg'ı için 10 µl Membrane Binding Solution eklendi ve jel eriyene kadar 65°C'de inkübe edildi. Ependorf içeriği minikolumun içine aktararak minikolum 13.500 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Minikoluma 700 µl Membrane Wash Solution eklenerek 13.500 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Minikoluma 50 µl of Nuclease-Free Water eklenerek 13.500 rpm'de 1 dk santrifüj sonrası elde edilen DNA, dizi analizine kadar -20°C'de saklandı.

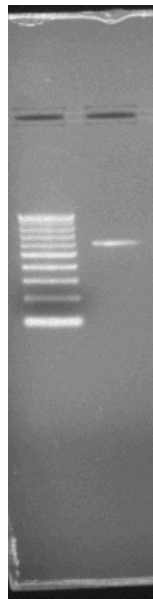
DNA Dizi Analizi

Agaroz jelden saflaştırılan PCR ürününün DNA dizi analizi yaptırılmıştır. DNA dizi analiz sonucu, BLAST analizi ve MEGA program ile filogenetik analiz yapılarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Bu çalışmada Kayseri'de bir insanın safra yollarından elde edilen erişkin *F. hepatica* kullanılmıştır. Erişkin parazitten total genomik DNA, genomik DNA'dan ise PCR ile 510 bp büyüklüğündeki PCR ürünü elde edilmiştir (Şekil 1).

PCR ürününün agaroz jelden saflaştırılması sonucu elde edilen DNA dizisi Tablo 1'de sunulmuştur. 504 nükleotitten oluşan bu dizi, 5.8S ribosomal RNA geninin kısmi dizisi, internal transcribed spacer 2'nin tüm dizisi ve 28S ribosomal RNA geninin kısmi dizisini içermekte idi. Elde edilen DNA dizisinin kaydı GENBANK'a JN585288 numara ile yaptırılmıştır. Bu dizinin BLAST analizi sonucunda Samsun'da koyundan elde edilen izolat ile benzerliği Tablo 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. *F. hepatica* ITS-2 PCR ürününün %1.5'luk etidyum bromidle boyanmış agaroz jelde görüntülenmesi. **Hat 1:** 100bp DNA ladder, **Hat 2:** 510 bp büyüklüğündeki *F. hepatica* PCR ürünü

Fig 1. Agarose gel electrophoresis analysis of ITS-2 PCR products of *F. hepatica*. Lane 1 100 bp Plus DNA Ladder, lane 2 510bp PCR product of *F. hepatica* ITS-2

Tablo 1. Kayseri’de insandan elde edilen *F. hepatica* 5.8S ribosomal RNA geninin kısmi dizisi, internal transcribed spacer 2’nin tüm dizisi ve 28S ribosomal RNA geninin kısmi dizisi ve FJ459806, Samsun *F. hepatica* koyun izolatu ile karşılaştırılması**Table 1.** Comparison of partial sequence of 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence of internal transcribed spacer 2, and partial sequence of 28S ribosomal RNA gene of Samsun sheep isolate (FJ459806) of *F. hepatica* with human isolate (JN585288) of *F. hepatica* from Kayseri

Query 1	ATGCAAACGCATACTGCTTTGAACATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCCATGGGTT	60
Sbjct 5	ATGCAAACGCATACTGCTTTGAACATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCCATGGGTT	64
Query 61	AGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTGGCTTATAAACTATCACGACGCCAAAAAGTC	120
Sbjct 65	AGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTGGCTTATAAACTATCACGACGCCAAAAAGTC	124
Query 121	GTGGCTTGGGTTTGGCCAGCTGGCGTGATCTCCTCTATGAGTAATCATGTGAGGTGCCAG	180
Sbjct 125	GTGGCTTGGGTTTGGCCAGCTGGCGTGATCTCCTCTATGAGTAATCATGTGAGGTGCCAG	184
Query 181	ATCTATGGCGTTCCCTAATGTATCCGGATGCACCCTTGCTTGGCAGAAAGCCGTGGTG	240
Sbjct 185	ATCTATGGCGTTCCCTAATGTATCCGGATGCACCCTTGCTTGGCAGAAAGCCGTGGTG	244
Query 241	AGGTGCAGTGGCGGAATCGTGGTTAATAATCGGGTTGGTACTCAGTTGTCAGTGTGTTT	300
Sbjct 245	AGGTGCAGTGGCGGAATCGTGGTTAATAATCGGGTTGGTACTCAGTTGTCAGTGTGTTT	304
Query 301	GGCGATCCCCTAGTCGGCACACTTATGATTTCTGGGATAATTCCATACCAGGCAGTTCC	360
Sbjct 305	GGCGATCCCCTAGTCGGCACACTTATGATTTCTGGGATAATTCCATACCAGGCAGTTCC	364
Query 361	GTCAGTGCACCTTTGTCATTGGTTTGATGCTGAACCTGGTCATGTGTCTGATGCTATTTT	420
Sbjct 365	GTCAGTGCACCTTTGTCATTGGTTTGATGCTGAACCTGGTCATGTGTCTGATGCTATTTT	424
Query 421	CATATAGCGACGGTACCCTTCGTGGTCTGTCTTCTGACCTCGGTTTCAGACGTGATTACC	480
Sbjct 425	CATATAGCGACGGTACCCTTCGTGGTCTGTCTTCTGACCTCGGTTTCAGACGTGATTACC	484
Query 481	CGCTGAACTTAAGCATACTAA	504
Sbjct 485	CGCTGAACTTAAGCATATC	

Query: Kayseri *F. hepatica* insan izolatu**Sbjct:** FJ459806, Samsun *F. hepatica* koyun izolatu

TARTIŞMA ve SONUÇ

Türkiye’de saptanan insan *F. hepatica* izolatının, BLAST analizi sonucunda ITS-2 DNA dizisindeki yedi farklı değişken nükleotid açısından incelendiğinde Türkiye’den bildirilen hayvan izolatlarıyla yedi nükleotidin tamamının aynı olduğu görülmüştür (Tablo 2). Ayrıca Kayseri insan izolat dizisindeki yedi değişken bölgenin dünyada bildirilen diğer Fascioloid cinsleriyle olan farklılıkları da Tablo 2’de sunulmuştur.

İspanya’dan elde edilen iki farklı *F. hepatica* örneğinin ITS-2 dizisinin incelenmesi ile 7 değişken bölgeden 284. pozisyonda dizinin “C” veya “T” olduğu bildirilirken çalışmada elde edilen insan izolatında ve Türkiye’den bildirilen hayvan izolatlarında bu dizinin “C” nükleotidi

olduğu görülmektedir⁷.

Elde ettiğimiz insan *F. hepatica* izolatının filogenetik analiz sonucunda Türkiye’den bildirilen hayvan izolatlarıyla benzerliği gösterilmiştir (Şekil 2).

Moleküler karakterizasyon çalışmalarında, nuclear ribosomal DNA (rDNA) ve mitokondrial genom kullanılmaktadır. rDNA’nın internal transcribed spacer (ITS) bölgesi ise en yaygın kullanılan genetik markerlerden biridir. Bu çalışmada genetik marker olarak ITS-2 bölgesi kullanılarak insan *F. hepatica* izolatu karakterize edilmiştir. Daha çok sayıda insan ve hayvan *F. hepatica* izolatlarıyla ve ITS-2 dışında diğer genetik markerlerle de desteklenmesi gereken bu çalışma sonucunda; Türkiye’de insandan alınan *F. hepatica* izolatu ilk kez moleküler olarak karakterize edilmiştir.

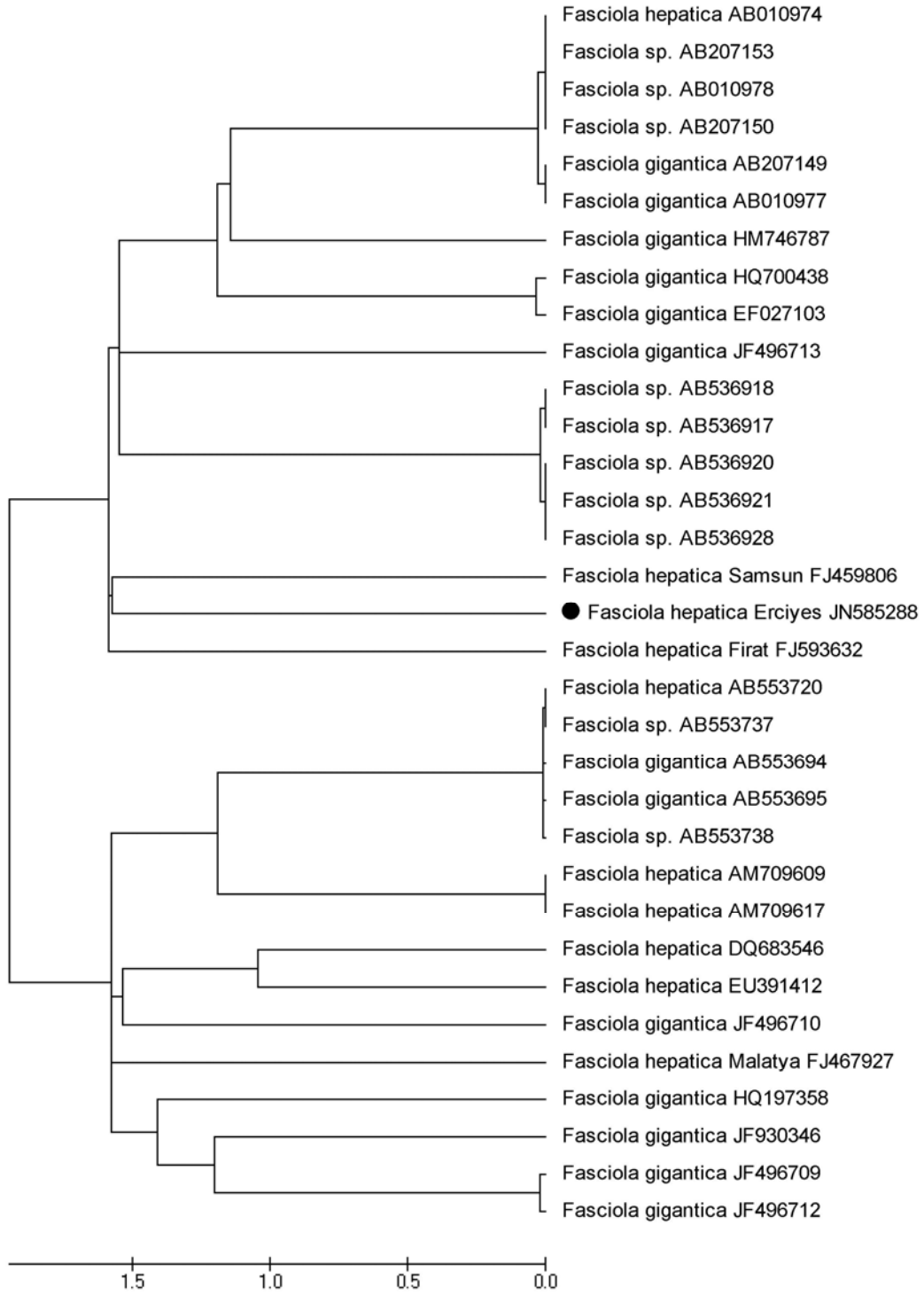
Tablo 2. Farklı coğrafi bölgelerden elde edilip GENBANK'a dizisi bildirilen Fascioloid cinslerinin ITS-2 DNA dizisinde yedi farklı değişken
Table 2. Comparison of nucleotide at seven variable positions in the ITS-2 sequences of Fascioloid species from different geographical locations

Parazit	ITS-2 Dizisinde Yedi Değişken Bölge							GENBANK	Örneğin Alındığı Yer
	207	231	270	276	284	327	334		
<i>Fasciola hepatica</i>	T	T	C	C	C	T	G	JN585288	Erciyes/Türkiye
	T	T	C	C	C	T	G	FJ459806	Samsun/Türkiye
	T	T	C	C	C	T	G	AJ557567	Fransa
	T	T	C	C	C	T	G	AJ557568	Çin
	T	T	C	C	C	T	G	EF612481	İran
	T	T	C	C	C	T	G	EU260058	Avustralya
	T	T	C	C	C	T	G	EF612480	Mısır
	T	T	C	C	C	T	G	AJ272053	İspanya
	T	T	C	C	T	T	G	AM709622	İspanya
	T	T	C	C	T	T	G	AB010974	Uruguay
<i>Fasciola gigantica</i>	C	C	T	T	C	-	A	AJ557569	Çin
	C	C	T	T	C	-	A	EU260080	Endonezya
	C	C	T	T	C	-	A	EU260076	Vietnam
	C	C	T	T	C	-	A	EF027103	Hindistan
	T	C	T	T	C	-	A	EF612482	Mısır
	T	A	C	C	C	-	G	AB010975	Zambiya
<i>Fasciola sp.</i>	T	T	C	C	C	T	G	AB010978	Japonya
	T	T	C	C	C	T	G	AJ557570	Çin
	C	C	T	T	C	-	A	AB207152	Japonya
<i>Fascioloides magna</i>	G	T	-	C	C	T	A	EF612487	ABD
	G	T	-	C	C	T	A	DQ683545	Avustralya
<i>Fasciola jacksoni</i>	C	T	T	T	C	T	A	EF612485	Sri Lanka
<i>Parafasciolopsis fasciolaemorpha</i>	T	T	T	C	C	T	G	EF612488	Polonya

KAYNAKLAR

- Berhe G, Berhane K, Tadesse G:** Prevalence and economic significance of fasciolosis in cattle in Mekelle Area of Ethiopia. *Trop Anim Health Prod*, 41 (7): 1503-1504, 2009.
- Balkaya İ, Şimşek S:** Erzurum'da kesilen sığırlarda Hidatidosis ve Fasciolosis'in yaygınlığı ve ekonomik önemi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (5): 793-797, 2010
- Garcia LS:** Diagnostic Medical Parasitology. Fifth ed., pp. 423-444, American Society for Microbiology, DC Press, Washington, 2007.
- Korkmaz M, Ok ÜZ:** Fasciolosis. In, Özcel MA, Özbel Y, Ak M (Eds): Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. s. 499-515, Meta Basım, İzmir, 2007.

- Amer S, Dar Y, Ichikawa M, Fukuda Y, Tada C, Itagaki T, Nakai Y:** Identification of Fasciola species isolated from Egypt based on sequence analysis of genomic (ITS1 and ITS2) and mitochondrial (ND1 and COI) gene markers. *Parasitol Int*, 60 (1): 5-12, 2011.
- Erensoy A, Kuk S, Ozden M:** Genetic identification of *Fasciola hepatica* by ITS-2 sequence of nuclear ribosomal DNA in Turkey. *Parasitol Res*, 105 (2): 407-412, 2009.
- Alasaad S, Huang CQ, Li QY, Granados JE, García-Romero C, Pérez JM, Zhu XQ:** Characterization of Fasciola samples from different host species and geographical localities in Spain by sequences of internal transcribed spacers of rDNA. *Parasitol Res*, 101 (5): 1245-1450, 2007.



Şekil 2. Türkiye'de saptanan insan *F. hepatica* Erciyes izolatının Neighbor-joining analizi

Fig 2. A phylogenetic tree of human Erciyes isolates of *F. hepatica* inferred from the nucleotide sequences of ITS-2 and the neighbor-joining method