

Melez Bir Dağ Keçisinde Kistik Hydatidosis ve Moleküler Karakterizasyonu

Armağan Erdem ÜTÜK *  Fatma Çiğdem Pişkin *

* Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Parazitoloji ve Arı Hastalıkları Laboratuvarı, TR-06020, Etlik, Ankara - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2009-1130

Özet

Bu makalede Türkiye'nin Antalya ilinde melez bir dağ keçisinde *Echinococcus granulosus*'un koyun suşu (G1) enfeksiyonu bildirilmiştir. Ölü bir keçiye ait beyin, karaciğer, dalak ve akciğer laboratuvarımıza gönderildi. Morfolojik inceleme sonucunda akciğerlerde hidatid kist tespit edildi. Daha ileri inceleme amacıyla kist materyalinden DNA ekstraksiyonu yapılarak mitokondrial sitokrom oksidaz altünite 1 (mt-CO1) geni PZR ile çoğaltıldı. Çoğaltma işleminden sonra mt-CO1 geninin sekans analizi yapıldı. İncelememiz sonucunda, elde edilen sekans bilgilerinin yaygın olan koyun suşu (G1) ile uyduğu görüldü. Bu, Türkiye'nin Antalya ilinde melez bir dağ keçisinde *E. granulosus*'un koyun suşunun bulunduğu ve moleküler karakterizasyonunun yapıldığı ilk rapordur.

Anahtar sözcükler: *Echinococcus granulosus*, Genotiplendirme, Melez Dağ Keçisi, Türkiye

Cystic Hydatidosis in a Crossbreed Mountain Goat and It's Molecular Characterization

Summary

In this article we report *Echinococcus granulosus* sheep strain (G1) infection in a cross breed mountain goat in Antalya province of Turkey. Brain, liver, spleen and lungs of dead goat were sent to our laboratory. As a result of morphological examination we diagnose hydatid cysts on the lungs. For further investigation, we made DNA extraction from the cyst material and amplified the mitochondrial cytochrome oxidase subunit 1 (mt-CO1) gene region by PCR. After the amplification, sequence analysis of mt-CO1 gene was carried out. As a result of our examination, we saw that obtained sequence data was matching to the common sheep strain (G1). This is the first report of an occurrence and molecular characterization of *E. granulosus* sheep (G1) strain in a crossbreed mountain goat in Antalya province of Turkey.


Keywords: *Echinococcus granulosus*, Genotyping, Crossbreed Mountain Goat, Turkey


GİRİŞ

Echinococcus granulosus'un neden olduğu kistik echinococcosis dünya çapında yaygın ve son derece önemli bir helmintozoonozdur. Hastalık insanlarda oldukça ciddi ve bazen ölümcül olabilirken, hayvanların çeşitli organ ve dokularında oluşturduğu yapısal ve fonksiyonel bozukluklar nedeniyle de ekonomik kayıpl-

ların oluşmasına neden olmaktadır. Genellikle son konak köpek, tilki, çakal, kurt gibi bir etçil olmasına rağmen, etkenin farklı suşları farklı coğrafi bölgelerde sığır, koyun, keçi, geyik, deve, manda, tavşan, kanguru, domuz, at, eşek gibi çok sayıda memeli ara konağı ve insanları enfekte edebilmektedir ¹⁻³.

 İletişim (Correspondence)

 +90 312 3260090/141

 erdemutuk@hotmail.com

Bu suş farklılıkları parazitin yaşam siklusu, konak spesifitesi, gelişim hızı, patojenitesi, antijenitesi, kemoterapotiklere duyarlılığı, bulaşma dinamikleri, hastalığın epidemiyoloji ve kontrol teknikleri üzerinde son derece önemlidir. Bu bakımdan endemik bölgelerde kontrol ve eradikasyon programlarının hayata geçirilebilmesi, bu bölgelerde baskın suş veya suşların belirlenmesine bağlıdır ^{1,2}.

Yapılan moleküler çalışmalar sonucunda *E. granulosus* türü içerisinde koyun suşu (G1), Tazmanya koyun suşu (G2), manda suşu (G3), at suşu (G4), sığır suşu (G5), deve suşu (G6), domuz suşu (G7), geyik suşu (G8), vahşi yaşam suşları (aslan suşu, lagomorph suşu), insan suşu (G9) ve Fennoscandian geyik suşu (G10) olmak üzere çok sayıda suşun varlığı ortaya konmuştur. Ayrıca suş içi genetik varyasyonların olabileceği, G1, G4 ve G5 suşlarındaki genetik farklılıkların bu suşların tür statüsünde ele alınmasını gerektirecek kadar fazla olduğu belirtilmektedir ².

Bu olgu sunumunun amacı laboratuvarımıza gönderilen melez bir dağ keçisinde morfolojik olarak belirlenen hidatik kistin *E. granulosus*'un hangi suşu tarafından oluşturulduğunu belirlemek ve dolayısı ile Antalya ilinde bulunması muhtemel suş veya suşlar hakkında araştırmacılara fikir vermektir.

OLGUNUN TANIMI

Olgu sunumun materyalini; 2009 yılı Haziran ayında laboratuvarımıza gönderilen, 4 yaşında, dişi, melez bir dağ keçisine ait karaciğer, akciğer, dalak ve beyin oluşturdu. Alınan anamnezde keçinin babasının dağ keçisi, annesinin ise kıl keçisi olduğu, doğada bir süre serbest yaşadktan sonra yakalanıp hayvanat bahçesine verildiği belirtildi.

Karaciğer, akciğer, dalak ve beyinin makroskopik olarak incelenmesi sonucunda akciğerde uniloculer hidatik kistlere rastlandı. Kist sıvısının mikroskopik incelenmesi sonucunda protoskoleklere rastlanmadı ve kistin steril olduğuna karar verildi.

Numune laboratuvarında incelendikten hemen sonra kist materyali (germinal ve laminer tabakalar) ayrılarak PBS ile yıkandı. DNA ekstraksiyonu QIAamp® doku kiti (Qiagen GmbH, Germany) kullanarak gerçekleştirildi. Ekstraktlar PZR'de kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Polimeraz zincir reaksiyonunda mt-COI geninin 446 nükleotidlik kısmını çoğaltan JB3 ve JB4.5 adlı primerler (Bio Basic, Markham Onterio, Canada) kullanıldı ⁴. Toplam 50 µl'lik hacimde hazırlanan PZR karışımına 5 µl 10X PZR tamponu, 5 µl 25 mM MgCl₂, deoksinükleotidler

her birinden 200 µM, 1.25 U Taq DNA Polymerase enzimi (MBI Fermentas, Lithuania), primer çiftlerinin her birinden 20 pmol ve 5 µl template DNA ilave edildi. PZR amplifikasyonunda 95°C'de 2 dak. ön denatürasyon aşamasını takiben, toplam 35 PZR siklusu, 95°C'de 1 dk denatürasyon, 50°C'de 1 dak. bağlanma, 72°C'de 1 dk uzama olarak gerçekleştirildi. Son siklusu takiben 72°C'de 5 dak. son uzama işlemi yapıldı. Oluşan ürünler %1.5'lik agaroz jelde yürütülerek ethidium bromide ile boyanıp, UV transilluminatörde spesifik bantların varlığı izlendi.

PZR ile çoğaltılan mt-COI geni REFGEN (Ankara, Türkiye) firmasına gönderilerek DNA sekans analizi yaptırıldı ve sonuçların BLAST search'le (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) GenBank'taki verilerle karşılaştırılmasıyla; Antalya ilindeki melez dağ keçisinden elde edilen izolatin (Genbank kabul numarası: GQ281810) koyun suşu (G1) olduğu belirlendi.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Echinococcus granulosus türü içerisinde bulunan suşları belirlemek amacıyla dünyanın çeşitli bölgelerinde farklı moleküler teknikler kullanarak çok sayıda çalışma yapılmış ve bu çalışmalar sonucunda *E. granulosus*'un 10 farklı suşu olduğu belirlenmiştir ². Türkiye'de; sığır, koyun, muflon koyunu, keçi, deve, köpek ve insan izolatları RAPD-PZR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR), PZR-RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriction Fragment Length Polimorphism), SSCP (Single Stranded Conformation Polimorphism) ve DNA dizileme gibi moleküler tekniklerle incelenmiş ve bu çalışmalar sonucunda G1, G1/G3, G3, G7 suşları tespit edilmiştir ^{3,5-10}.

Yapılan çalışmalar sonucunda; ülkemizde ve dünyada yaygın olan suşun G1 olduğu, bu suşun koyunlar dışında keçi, sığır, buffalo, yak, deve, domuz ve tek tırnaklılar gibi birçok hayvan grubunda enfeksiyona neden olduğu ortaya çıkmış ve G1 suşunun insan enfeksiyonlarının başlıca sebebi olduğu belirtilmiştir ^{1,3,6-8,11,12}.

Bu olgu sunumunda, Antalya ilinde melez bir dağ keçisinden elde edilen izolatin mt-COI1 geni sekanslanarak konağın G1 suşu ile enfekte olduğu tespit edilmiş, ülkemizin farklı bölgelerinde evcil ve yabani hayvanlardan elde edilen kist materyallerinin incelenmesi ve muhtemel suşların belirlenmesinin aşı ve eradikasyon çalışmalarına katkıda bulunacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Thompson RCA, Lymbery AJ: The nature, extent and significance of variation within the genus *Echinococcus*. *Adv Parasitol*, 27, 209-258, 1988.
2. Ütük AE, Şimşek S, Köroğlu E: *Echinococcus* cinsinin

moleküler genetik karakterizasyonu. *T Parazitol Derg*, 29, 171-176, 2005.

3. Utuk AE, Simsek S, Koroglu E, McManus DP: Molecular genetic characterization of different isolates of *Echinococcus granulosus* in East and Southeast Regions of Turkey. *Acta Tropica*, 107, 192-194, 2008.

4. Bowles J: Genetic approaches to the identification and evolutionary study of helminth parasites. *PhD Tesis*. Universty of Queensland, St. Lucia, Queensland, Australia, 1993.

5. Šnábel V, Altintas N, D'Amelio S, Nakao M, Romig T, Yolasiğmaz A, Gunes K, Turk M, Busi M, Hüttner M, Ševcová D, Ito A, Altintas N, Dubinský P: Cystic echinococcosis in Turkey: Genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country. *Parasitol Res*, 105, 145-154, 2009.

6. Ütük AE, Şimşek S, Köroğlu E: *Echinococcus granulosus*'un koyun suşunun (G1) RAPD-PCR ve DNA dizi analizi ile tanısı. *3. Ulusal Hidatidoloji Kongresi*, 2006.

7. Vural G, Baca AU, Gauci CG, Bağcı O, Gicik Y, Lightowers MW: Variability in the *Echinococcus granulosus* cytochrome C oxidase 1 mitochondrial gene sequence from livestock in Turkey and a re-appraisal of the G1-3 genotype cluster. *Vet*

Parasitol, 154, 347-350, 2008.

8. Yolasiğmaz A, Tur eková L, Türk M, Reyhan E, Šnábel V, Dubinský P, Güneş K, Altıntaş N: Genetic variation in *Echinococcus granulosus* from Turkey and Slovakia demonstrated by sequence and SSCP analysis. *XXIst International Congress of Hydatidology*, Nairobi, Kenya, 2004.

9. Simsek S, Eroksuz Y: Occurrence and molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in Turkish mouflon (*Ovis gmelinii anatolica*). *Acta Tropica*, 109, 167-169, 2009.

10. Yıldırım FAB, Yıldız K, Çakır Ş, Gazyağcı AN: Kırıkkale bölgesinde koyun kökenli *Echinococcus granulosus* izolatlarının moleküler karakteri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (2): 245-250, 2010.

11. Eckert J, Thompson RCA: Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphises on their infectivity to humans. *Acta Tropica*, 64, 19-34, 1997.

12. Thompson RCA, McManus DP: Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol*, 18, 452-457, 2002.