

Kırıkkale’de kesilen sığırlarda *Echinococcus granulosus*’un moleküler olarak genotiplendirilmesi

Sami GÖKPINAR, Rukiye DEĞİRMENCİ, Kader YILDIZ

Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye.

Özet: *Echinococcus granulosus* türü içindeki suş farklılıkları etkenin konak spesifitesi, gelişim hızı, patojenitesi, antijenik özellikleri, kemoterapotiklere duyarlılığı, bulaşma dinamikleri ve epidemiyolojide farklılıklar şekillendirmektedir. Bu çalışmada; Kırıkkale Yöresi’nde kesilen sığırların karaciğer ve akciğerlerinden elde edilen *E. granulosus* izolatlarının suş identifikasyonu yapılması amaçlanmıştır. Bunun için parazitin 12S rRNA ve mitokondriyal cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) geni spesifik primerlerle çoğaltılmıştır ve COI geni sekanslatılmıştır. COI sekans sonucuna göre, elde edilen izolatların G1-G3 kompleksinde olduğu belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: *Echinococcus granulosus*, genotiplendirme, hidatid kist, Kırıkkale, sığır.

Genotyping of *Echinococcus granulosus* obtained from cattle slaughtered in Kırıkkale Province

Summary: Strain differences are responsible from some important differences such as host specificity, growth rate, antigenic properties, sensitivity to chemotherapeutic agents, transmission dynamics and epidemiological variations in *Echinococcus granulosus*. In this study, it was aimed to detection strain identification of *E. granulosus* obtained from liver and lungs of cattle slaughtered in Kırıkkale region. For this aim, mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) and 12S rRNA genes of *E. granulosus* isolates amplified by specific primers and then COI gene sequence was made. In the present study, the isolates were identified as G1-G3 complex according to COI sequencing results.

Keywords: Cattle, *Echinococcus granulosus*, genotyping, hydatid cyst, Kırıkkale.

Giriş

Zoonoz parazitlerden birisi olan *Echinococcus granulosus* yaşam çemberinde köpek, kurt gibi kanide ailesinin üyelerini son konak, koyun, keçi, sığır, deve gibi pek çok hayvanı ve insanı arakonak olarak kullanmaktadır (8, 24). Parazitin arakonaklarda şekillendirdiği larva formunun adı hidatid kist, oluşturduğu hastalık ise “kistik echinococcosis” olarak adlandırılmaktadır (8). Dünyanın pek çok bölgesinde farklı arakonaklarda varlığı bilinen bu parazit (8, 24), Türkiye’de gerek çiftlik hayvanlarında gerekse insanlarda sıkça rapor edilmektedir (5, 17, 20, 28, 33).

Echinococcus granulosus içindeki suş farklılıkları etkenin konak spesifitesi, gelişim hızı, patojenitesi, antijenik özellikleri, kemoterapotiklere duyarlılığı, bulaşma dinamikleri, epidemiyolojide farklılıklar şekillendirmektedir (9, 23, 25). *Echinococcus* spp. içindeki genetik varyasyonları belirlemek amacıyla farklı gen bölgelerini (internal transcriber spaces 1, antijen B/1, BG1 DNA probe, Actin III, MS mikrosatellit U1 snRNA region, elongation factor 1 alpha, Eg9 ve Eg16) hedefleyen çok farklı moleküler metotlar kullanılmış (PCR, RAPD PCR, SSCP ve PCR-RFLP) olmakla birlikte (5, 7, 12, 16, 21), *E. granulosus* içindeki genetik varyasyona ilişkin bilgilerin temelini

oluşturan yöntem Bowles et al. (3) tarafından geliştirilmiş ve bu yöntem kullanılarak parazite ait mitokondriyal cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) geninin 366 bp bölgesi ile NADH dehydrogenase subunit 1 (nad1) geninin 471 bp bölgesindeki farklılıklar temel olarak 7 farklı genotip belirlenmiştir (3, 4). Daha sonra yapılan çalışmalarla *E. granulosus*’un G1-G10 arasında genotipi olduğu tanımlanmıştır (14). Yakın zamanda tür içinde yeni bir taksonomi yapılarak G1-G3 suşları *E. granulosus sensu stricto*, G4 suşu *E. equinus*, G5 suşu *E. ortleppi* ve G6-G10 suşları ise *E. canadensis* olarak adlandırılmıştır (15, 16).

Dünyanın pekçok bölgesinde farklı ara ve son konaklarda *E. granulosus*’un genotiplendirilmesine ilişkin çalışmalar mevcuttur (6, 13). Türkiye’nin de yer aldığı Akdeniz havzasında arakonaklarda G1-G3 genotipi yaygın olarak görülmektedir (6). Türkiye’nin farklı coğrafi bölgelerinde değişik arakonaklardan elde edilen *E. granulosus* izolatlarının moleküler yöntemlerle genotiplendirilmesine ilişkin çalışmalarda koyun, yabani koyun (muflon), sığır, keçi, deve, manda ve ata G1-G3 (1, 2, 11, 17, 19, 22, 26-30), katırda G4 (18), insanda ise G1-G3 ve G7 (10, 11, 22) suşu tespit edilmiştir (Tablo 1).

Kistik echinococcosis, Kırıkkale yöresinde kesilen koyunlarda %50,9, sığırlarda ise %14,16 oranında rapor

edilmiş, yörede hidatid kistlerin fertilitesi koyunlar için %76,47-81,53, sığırlar için ise %6,6 olmuştur (31-33). Bu çalışma ile Kırıkkale yöresinde kesilen sığırlardan elde edilen *E.granulosus* izolatlarının mitokondriyal COI ve 12S rRNA gen bölgesini çoğaltan primerler kullanılarak bu gen bölgelerinin çoğaltılması ve yapılacak DNA sekans analizi sonucunda suş ayırımının yapılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Doku örneklerinin toplanması: Kırıkkale Hasandede mezbahası 20.05.2014-25.11.2014 tarihleri arasında haftalık olarak düzenli ziyaret edilmiş, sığır kesimini takiben sığırların başta karaciğer ve akciğeri olmak üzere tüm paranzimatöz organları muayene edilmiştir. Kesimi yapılan farklı sürülerdeki genotipin belirlenebilmesi amacıyla haftalık mezbaha ziyaretlerinde enfekte sığırlardan en fazla iki kist örneği alınmıştır. Çalışmada toplam 20 sığır orijinli hidatid kist izolatı kullanılmıştır. Kistli organlar Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na getirilmiştir. Steril bir enjektör ile çekilen kist sıvısı ve germinal membrandan alınan doku örnekleri lam-lamel arasında protoskoleks varlığı bakımından ışık mikroskopu (Olympus BX 50) ile incelenmiştir. Her kist ayrı bir izolat olarak değerlendirilmiş ve protoskoleks ve germinal membran doku örnekleri %70'lik etil alkol içerisinde alınarak -20 °C'de saklanmıştır.

DNA ekstraksiyonunun yapılması ve PCR yönteminin uygulanması: Örneklerden DNA ekstraksiyonu ticari kit (QIAamp DNA mini Kit, QIAGEN, Germany) kullanılarak kit protokolüne göre yapılmış ve kullanılıncaya dek -20°C'de saklanmıştır.

Parazitin mitokondriyal COI geninin 446 nükleotidlik kısmını çoğaltan JB3 (5'-TTT TTT GGG CAT CCT GAG GTT TAT-3') ve JB4.5 (5'-TAA AGA AAG AAC ATA ATG AAA ATG-3') adlı primerler ile 12S rRNA geninin 254 bp kısmını çoğaltan E.g.ss1for (5'-GTA TTT TGT AAA GTT GTT CTA-3') ve E.g.ss1rev (5'-CTA AAT CAC ATC ATC TTA CAA T-3') kullanılmıştır (4, 7). Toplam 50 µl'lik hacimde 10xPCR bufferdan 5 µl, 25 mM MgCl₂'den 5 µl, Taq DNA polimerazdan 0,25 µl

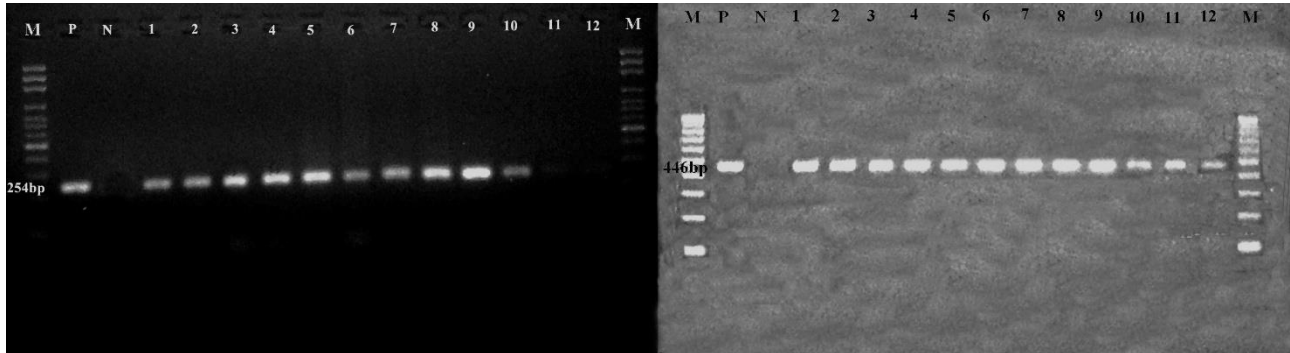
(1,25 U), 1 mM dNTP miks 4 µl, primer çiftlerin herbirinden 2,5 µl (50 pmol) eklenerek PCR karışımı hazırlanmıştır. PCR tüplerine konulan karışımın üzerine template DNA 5 µl olacak şekilde eklenmiştir. Termal cykler'a (NYX Technics, USA) yerleştirilen PCR tüpleri 95°C'de 2 dak. ön denaturasyon aşamasını takiben toplam 35 PCR siklusu olacak şekilde 95°C'de 1 dak. denaturasyon, 50°C'de 1 dak. bağlanma ve 72°C'de 1 dak. uzama, 72°C'de 5 dak. son uzama işlemi olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri %1,5 lik agaroz jelde yürütülmüş, ethidium bromid ile boyamayı takiben UV ışık altında spesifik bantlar yönünden incelenmiştir. PCR ile çoğaltılan üç izolata ait *E.granulosus* mitokondriyal COI geni bir firmaya gönderilerek sekanslatılmış ve sekans sonuçları GenBank'a girilmiştir.

Bulgular

Araştırma periyodu boyunca mezbahadan elde edilen sığırlara ait 20 hidatid kist izolatı karaciğer (n:15) ve akciğerden (n:5) elde edilmiş olup %80'i (16/20) steril niteliktedir. Sığırlara ait karaciğer ve akciğer orijinli 20 hidatid kist izolatının tümünde mitokondriyal COI ve 12S rRNA genleri amplifiye edilmiştir. Sığır kökenli hidatid kist örneklerinin JB3 ve JB4.5 primerleri kullanılarak çoğaltılan mitokondriyal COI geninin 446 bp'lik kısmı ile E.g.ss1for ve E.g.ss1rev primerleri kullanılarak çoğaltılan mitokondriyal 12S rRNA geninin 254 bp'lik kısmı Şekil 1'de görülmektedir. Elde edilen izolatların mitokondriyal COI genine ait sekans sonuçları GenBank'a girilmiştir (Erişim no: KT247939, KT247940, KT247941).

Tartışma ve Sonuç

Birbirine yakın üç genotipin oluşturduğu (G1-G3) *E.granulosus* sensu stricto içinde gözlenen coğrafi farklılıklar sonucunda bu türün orijininin Ortadoğu olduğu ve buradan diğer bölgelere dağıldığı hipotezi ortaya konulmuştur (16). Bu tür birçok çiftlik ve herbivor yaban hayvanlarında görülsede öncelikli arakonağının koyun olduğu kabul edilmektedir (15). Dünyanın pek çok bölgesinde sığırların *E.granulosus* sensu stricto ile enfekte olduğu belirlenmiş olmakla birlikte (6) şekillenen hidatid



Şekil 1. *Echinococcus granulosus*'a ait 12S rRNA geninin 254 bp'lik ve COI geninin 446 bp'lik PCR ürünleri. P: Pozitif kontrol, N: Negatif kontrol, 1-12: Sığır izolatları, Marker (100 bp).

Figure 1. PCR products of 254 bp and 446 bp of 12S rRNA and COI genes of *E.granulosus*, respectively. P: Positive control, N: Negative control, 1-12: Cattle isolates, Marker (100 bp).

kistlerin genelde steril olması sebebiyle, sığır bu genotipin epidemiyolojisinde sınırlı öneme sahiptir (16).

Echinococcus canadensis içinde yer alan G7 suşunun dünya üzerindeki yaygınlığının *E.granulosus* sensu stricto'ya kıyasla nispeten sınırlı olduğu, daha çok Orta ve Doğu Avrupa'da yaygın olduğu anlaşılmıştır. Domuz suşu olarak da bilinen G7'nin insanı enfekte eden en yaygın ikinci suş olduğu belirlenmiştir (16).

Echinococcus granulosus içindeki genetik varyasyonun parazitin biyolojisini, arakonaktaki duyarlılığını etkilediği iyi bilinmektedir (8). Moleküler metotlar parazitin farklı genotiplere ayrılmasına yardımcı olmaktadır. Genotipik analiz sonuçları insan vakalarından sorumlu suşun tespitinde yardımcıdır (16). *Echinococcus* suşlarının/türlerinin ayırımında PCR, PCR-RFLP, RAPD-PCR, PCR-SSCP gibi pek çok metot kullanılmaktadır (8). Türkiye'den konuyla ilişkin raporlarda farklı coğrafi bölgelerdeki pekçok arakonaktan temin edilen izolatlarının G1-G3 kompleksi içinde yer aldığı bildirilmiştir (Tablo 1). Türkiye'de arakonaklarda bu suş dışında insanda G7 (11, 22), katırda ise G4 suşunun varlığı (18) rapor edilmiştir. Bu çalışmada Kırıkkale yöresinde kesilen sığırlardan elde edilen hidatid kist izolatlarının *E.granulosus* sensu stricto (G1-G3 kompleksi) olduğu belirlenmiştir.

Sığırlarda G5 genotipi dışındaki *E.granulosus* suşlarının genelde steril hidatid kist oluşturduğu, nadiren içinde protoskoleks barındıran fertil kist geliştirdiği bilinmektedir (16). Bunun yanı sıra G1-G3 kompleksine ait hidatid kistlerin sığırlarda koyunlara göre daha hızlı büyüdüğü, ancak bu süre zarfında kistte yeteri kadar protoskoleks

gelişiminin olmadığı düşünülmektedir (13). Bu çalışmada incelenen sığırlarda dört fertil kiste rastlanmış (%20) ve sığır orijinli steril ve fertil hidatid kist izolatlarının benzer band deseni gösterdiği tespit edilmiştir. Genotipik analiz sonucunda bu izolatlarının *E.granulosus* sensu stricto olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, Kırıkkale'de kesilen sığırlardan elde edilen *E.granulosus* izolatlarının *E.granulosus* G1-G3 kompleksi içinde yer aldığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar Türkiye'de *E.granulosus*'un epidemiyolojisine katkı sağlayacak niteliktedir. *E.granulosus*'a ilişkin başarılı kontrol programlarının uygulanabilmesi için öncelikli olarak parazitin epidemiyolojisinin aydınlatılması gerekmektedir. Bu sebeple farklı coğrafi bölgelerde farklı ara ve sonkonak gruplarında saptanan parazit ve larva formlarının genotiplendirilmesi yapılarak konuya ilişkin daha fazla bilgi toplanması gerekmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiş olup (Proje no: 2014/110), 5-9 Ekim 2015 tarihleri arasında Erzurum'da yapılan 19. Ulusal Parazitoloji Kongresi'nde poster bildirisi olarak sunulmuştur. Katkılarından dolayı Doç.Dr. Armağan Erdem Ütük'e teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Altıntaş N, Oztatlıcı M, Altıntaş N ve ark. (2013): *Molecular analysis of cattle isolates of Echinococcus granulosus in Manisa Province of Turkey*. Kafkas Univ Vet Fak Derg, **19**, 455-459.

Tablo 1. Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinden bildirilen *Echinococcus granulosus* suşları.
Table 1. *Echinococcus granulosus* strains reported from different geographical areas of Turkey.

Bölge	Araçnak	Hedeflenen gen bölgesi	Genotip	Kaynak
Doğu ve Güneydoğu Anadolu	Koyun (n:179), sığır (n:19), keçi (n:7), deve (n:1), köpek (n:1) ve insan (n:1)	ITS1 ve COI	G1 (%100)	28
Afyon, Ardahan, Erzurum, Siirt, Tekirdağ, Yozgat (koyun), Kars (sığır)	Koyun (n:100), sığır (n:12)	COI	G1 (%95,6) G3 (%4,4)	30
Malatya	Muflon (n:1)	COI	G1 (%100)	19
Batı Anadolu	Koyun (n:12), insan (n:10)	COI, atp6, nadI, nrrS	Koyun G1-G3 (%100) İnsan G1-G3 (%90) G7 (%10)	22
Doğu Anadolu	Sığır (n:220)	COI	<i>E. granulosus</i> sensu stricto (%100)	17
Antalya	Dağ keçisi (n:1)	COI	G1 (%100)	29
Türkiye'nin çeşitli yöreleri	İnsan (n:46)	COI	G1 (%100)	10
Samsun	Manda (n:9)	COI	G1 (%100)	2
Kilis	Koyun (n:19)	COI, nrrS 12S-rRNA	G1 (%100)	26
Belirtilmemiş	At (n:1)	COI	G1 (%100)	27
Trakya	İnsan (n:42), sığır (n:13), koyun (n:3)	ITS-I ve NAD1	Koyun ve sığır G1 (%100) İnsan G1 (%97,7) G7 (%2,3)	11
Manisa	Sığır (n:18)	COI ve NAD1	<i>E. granulosus</i> sensu stricto (%100)	1
Elazığ	Katır (n:1)	COI	G4 (%100)	18

2. **Beyhan YE, Umur S** (2011): *Molecular characterization and prevalence of cystic echinococcosis in slaughtered water buffaloes in Turkey*. *Vet Parasitol*, **181**, 174-179.
3. **Bowles J, Blair D, McManus DP** (1992): *Genetic variants within the genus Echinococcus identified by mitochondrial DNA sequencing*. *Mol Biochem Parasitol*, **54**, 165-173.
4. **Bowles J, McManus DP** (1993): *NADH dehydrogenase I gene sequences compared for species and strains of the genus Echinococcus*. *Int J Parasitol*, **23**, 969-972.
5. **Budak A, Yıldız K, Çakır Arıca Ş ve ark.** (2010): *Kırıkkale yöresinde koyunlardan elde edilen Echinococcus granulosus izolatlarının moleküler karakteri*. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, **16**, 245-250.
6. **Cardona GA, Carmena D** (2013): *A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals*. *Vet Parasitol*, **192**, 10-32.
7. **Dinkel A, Njoroge EM, Zimmermann A ve ark.** (2004): *A PCR system for detection of species and genotypes of the Echinococcus granulosus complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa*. *Int J Parasitol*, **34**, 645-653.
8. **Eckert J, Gemmel MA, Meslin FX ve ark.** (2001): *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern*. World Organisation of Animal Health, Paris, France.
9. **Eckert J, Thompson RCA** (1997): *Intraspecific variation of Echinococcus granulosus and related species with emphises on their infectivity to humans*. *Acta Trop*, **64**, 19-34.
10. **Ergin S, Saribas S, Yuksel P ve ark.** (2010): *Genotypic characterisation of Echinococcus granulosus isolated from human in Turkey*. *Afr J Microbiol Res*, **4**, 551-555.
11. **Eryıldız C, Sakru N** (2012): *Molecular characterization of human and animal isolates of Echinococcus granulosus in the Thrace Region, Turkey*. *Balkan Med J*, **29**, 261-267.
12. **Gasser RB, Zhu X, McManus DP** (1998): *Dideoxy fingerprinting: Application to the genotyping of Echinococcus*. *Int J Parasitol*, **28**, 1775-1779.
13. **Guo ZH, Kubo M, Kudo M ve ark.** (2011): *Growth and genotypes of Echinococcus granulosus found in cattle imported from Australia and fattened in Japan*. *Parasitol Int*, **60**, 498-502.
14. **McManus DP** (2013): *Current status of the genetics and molecular taxonomy of Echinococcus species*. *Parasitol*, **140**, 1617-1623.
15. **Nakao M, Lavikainen A, Yanagida T ve ark.** (2013): *Phylogenetic systematics of the genus Echinococcus (Cestoda: Taeniidae)*. *Int J Parasitol*, **43**, 1017-1029.
16. **Rojas CAA, Romig T, Lightowers MW** (2014): *Echinococcus granulosus sensu lato genotypes infecting humans – review of current knowledge*. *Int J Parasitol*, **44**, 9-18.
17. **Simsek S, Balkaya I, Koroglu E** (2010): *Epidemiological survey and molecular characterization of Echinococcus granulosus in cattle in an endemic area of eastern Turkey*. *Vet Parasitol*, **172**, 347-349.
18. **Simsek S, Cevik A** (2014): *First detection and molecular characterization of Echinococcus equinus in a mule in Turkey*. *Acta Parasitol*, **59**, 773-777.
19. **Simsek S, Eroksuz Y** (2009): *Occurrence and molecular characterization of Echinococcus granulosus in Turkish mouflon (Ovis gmelinii anatolica)*. *Acta Trop*, **109**, 167-169.
20. **Simsek S, Koroglu E, Dumanli N ve ark.** (2005): *Seroprevalance of cattle hydatidosis in some districts in the east Anatolian region of Turkey*. *Turk J Vet Anim Sci*, **29**, 1305-1310.
21. **Simsek S, Ozcetin C, Balkaya I** (2012): *Detection of polymorphism in AgB1 gene from sheep, cattle and human isolates of echinococcus granulosus by SSCP*. *Vet Parasitol*, **184**, 352-355.
22. **Snabel V, Altintas N, D'Amelio S ve ark.** (2009): *Cystic echinococcosis in Turkey: genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country*. *Parasitol Res*, **105**, 145-154.
23. **Thompson RCA** (1998): *Species and strains in the genus Echinococcus epidemiological and evolutionary perspectives*. *Parasit Int*, **47**, 133-281.
24. **Thompson RCA, Lymbery AJ** (1995): *Echinococcus and Hydatid Disease*. CAB Internationa, UK.
25. **Thompson RCA, McManus DP** (2002): *Towards a taxonomic revision of the genus Echinococcus*. *Trends Parasit*, **18**, 452-457.
26. **Utuk AE, Piskin FC, Dalkilic B** (2012): *Molecular characterization of sheep isolates of Echinococcus granulosus in Kilis Province*. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **18**, 35-38.
27. **Utuk AE, Simsek S** (2013): *Molecular characterization of the horse isolate of Echinococcus granulosus in Turkey*. *J Helminthol*, **87**, 305-308.
28. **Utuk AE, Simsek S, Koroglu E ve ark.** (2008): *Molecular genetic characterization of different isolates of Echinococcus granulosus in east and southeast regions of Turkey*. *Acta Trop*, **107**, 192-194.
29. **Ütük AE, Pişkin FÇ** (2010): *Melez bir dağ keçisinde hydatidosis ve moleküler karakterizasyonu*. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, **16**, 671-673.
30. **Vural G, Baca AU, Gauci CG ve ark.** (2008): *Variability in the Echinococcus granulosus cytochrome c oxidase I mitochondrial gene sequence from livestock in Turkey and a re-appraisal of the G1-3 genotype cluster*. *Vet Parasitol*, **154**, 347- 350.
31. **Yıldız K, Gürcan S** (2003): *Prevalence of hydatidosis and fertility of hydatid cysts in sheep in Kırıkkale, Turkey*. *Acta Vet Hung*, **51**, 181-187.
32. **Yıldız K, Gürcan S** (2009): *Differentiation of Echinococcus granulosus strain using larval rostellar hook morphometry in Turkey*. *Türkiye Parazit Derg*, **33**, 199-202.
33. **Yıldız K, Tunçer Ç** (2005): *Kırıkkale'de sığırlarda kist hidatik'in yayılışı*. *Türkiye Parazit Derg*, **29**, 247-250.

Geliş tarihi: 16.11.2015 / Kabul tarihi:13.03.2016

Yazışma adresi:

Prof.Dr. Kader YILDIZ

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Parazitoloji Anabilim Dalı

Kampüs 71450 Kırıkkale

email: kaderyildiz@hotmail.com