



OLGU SUNUMU

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2011: 25 (2): 95 - 97
http://www.fusabil.org

Armağan Erdem ÜTÜK
Fatma Çiğdem PIŞKİN

Etlık Veteriner Kontrol
Merkez Araştırma Enstitüsü,
Parazitoloji Laboratuvarı,
Ankara, TÜRKİYE

Üç Aylık Bir Kuzuda Kistik Ekinokokkozis'in Moleküler Tanısı

Bu makalede Bolu'nun Kırısık İlçesinde üç aylık bir kuzuda *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1-G3 grubu) enfeksiyonu rapor edilmiştir. Laboratuvarımıza gönderilen ölü bir kuzuya ait karaciğer, makroskopik olarak incelenmiş ve üzerinde biri 1.5 X 1.2 mm, diğeri 3.6 X 1.6 mm boyutlarında beyaz renkli iki odak tespit edilmiştir. Bu iki odak disekte edilerek karaciğerden ayrılmış ve DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA'nın mitokondrial 12S rRNA geninin 254 baz çiftlik (bc) bölgesi PZR ile çoğaltılmış ve kistin *E.granulosus* s.s. kaynaklı olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda çok küçük çaplı kistlerin bile *E.granulosus*'un hangi grubu içerisinde yer aldığına PZR ile belirlenebileceği ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: Kuzu, *E.granulosus sensu stricto*, 12S rRNA, PZR.

Molecular Detection of Cystic Echinococcosis in a Three Month Old Lamb

In this article, *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1-G3 cluster) infection was reported in a three-month-old lamb in Kırısık county of Bolu. Liver of the dead lamb which has been sent to our laboratory was macroscopically examined, and two foci with white color were diagnosed in sizes of 1.5 X 1.2 mm and 3.6 X 1.6 mm, respectively. These two foci were dissected from liver, and DNA extraction was performed. 254 bp region of mitochondrial 12S rRNA gene from acquired genomic DNA was amplified, and source of cyst was detected as *E. granulosus* s.s. As a result, we reveal that cluster of *E.granulosus* can be determined even in very small cysts by PCR.

Key words: Lamb, *E.granulosus sensu stricto*, 12S rRNA, PCR.

Giriş

Echinococcus granulosus'un neden olduğu kistik ekinokokkozis insanlarda oldukça ciddi ve bazen ölümcül olabilirken, hayvanların çeşitli organ ve dokularında oluşturduğu yapısal ve fonksiyonel bozukluklar nedeni ile önemli ekonomik kayıpların oluşmasına neden olmaktadır. Son konak genellikle köpek, tilki, çakal, kurt gibi etçillerdir. Etkenin arakonak spektrumu oldukça geniştir. *E.granulosus*'un farklı suşları, farklı coğrafik bölgelerde sığır, koyun, keçi, deve, manda, geyik, at, eşek, domuz, kanguru gibi çok sayıda arakonakta ve insanlarda enfeksiyona neden olmaktadır (1-3).

Yapılan moleküler çalışmalar sonucunda *E.granulosus* türü içerisinde on farklı suşun (G1-G10) bulunduğu, suş içi genetik farklılıkların olabileceği ve bu genetik farklılıkların bazı suşların tür statüsünde ele alınmasını gerektirecek kadar fazla olduğunu ortaya koymaktadır. Son yapılan taksonomik çalışmalarda *E.granulosus* türü içerisinde birbiri ile karışmış dört veya beş kriptik türün bulunduğu belirtilmektedir. Sinonim ve alt türlerin isimleri gözden geçirildiğinde, günümüzde G1-G3 grubu *E.granulosus sensu stricto*, G4 *E.equinus*, G5 *E.ortleppi*, G6-G10 grubu ise *E.canadensis* türü adıyla anılmaktadır (1-4).

Bu çalışmanın amacı, laboratuvarımıza gönderilen üç aylık bir kuzu karaciğerinde tespit edilen küçük çaplı iki odakın kaynağını belirlemek ve PZR'nin tanıda ve parazit epidemiyolojisinin anlaşılmasında ne kadar önemli bir araç olduğunu bir kez daha ortaya koymaktır.

Olgu Sunumu

Çalışmanın materyalini Bolu'nun Kırısık İlçesinden laboratuvarımıza gönderilen üç aylık sakız melezi bir kuzuya ait karaciğer oluşturmuştur. Karaciğer makroskopik olarak incelenmiş ve üzerinde beyaz renkli, sert kıvamda iki odak tespit edilmiştir (Şekil 1, 2). Bu odaklar disekte edilerek karaciğerden ayrılmış ve mikroskopta ölçülmüştür. Ölçüm sonucunda küçük odakın 1.5 X 1.2 mm, büyüğün ise 3.6 X 1.6 mm olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen doku parçaları steril bir bistüri ile iyice parçalanmış ve PBS ile 5 kez yıkanmıştır. DNA ekstraksiyonu QIAamp® doku kiti (Qiagen GmbH, Germany) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve ekstraktlar PZR'de kullanılmaya kadar -20°C'da muhafaza edilmiştir.

Geliş Tarihi : 20.06.2011
Kabul Tarihi : 20.09.2011

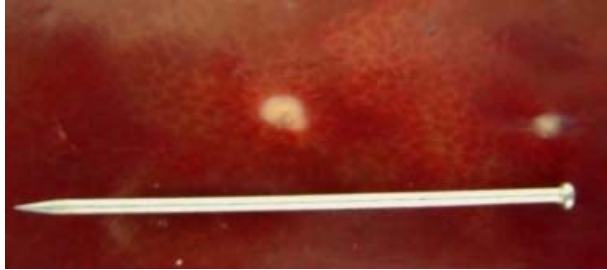
Yazışma Adresi Correspondence

Armağan Erdem ÜTÜK
Etlık Veteriner Kontrol
Merkez Araştırma
Enstitüsü, Parazitoloji
Laboratuvarı,
Ankara - TÜRKİYE

erdemutuk@hotmail.com

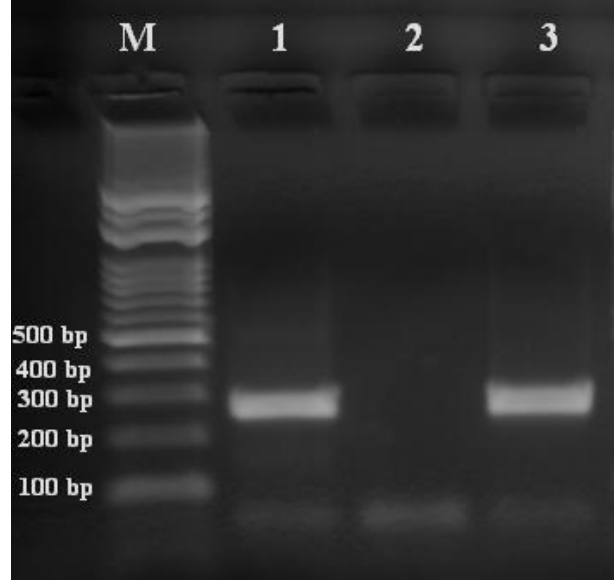


Şekil 1. Karaciğerde tespit edilen beyaz renkli iki odak



Şekil 2. Karaciğerde tespit edilen odakların yakından görünümü

Polimeraz zincir reaksiyonunda *E.granulosus* s.s.'nin mitokondrial 12S rRNA geninin 254 baz çiftlik (bç) bölgesini çoğaltan E.g.ss1for. 5'-GTATTTTGTAAGTTGTTCTA-3' ve E.g.ss1rev. 5'-CTAAATCACATCATCTTACAAT-3' (Alpha DNA, Canada) primer çifti kullanılmıştır (5). Çalışmada pozitif kontrol olarak daha önce mitokondrial CO1 bölgesi PZR ile çoğaltılmış ve sekanslanarak koyun suşu (G1) olduğu belirlenmiş gDNA (6), negatif kontrol olarak steril distile su kullanılmıştır. Toplam 50 µl'lik hacimde hazırlanan PZR karışımına 5 µl 10X PZR tamponu, 5 µl 25 mM MgCl₂, deoksinekleotidlerin 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'da 2 dak. ön denatürasyon aşamasını takiben, toplam 35 PZR siklusu, 95°C'da 1 dk denatürasyon, 50°C'da 1 dak. bağlanma, 72°C'da 1 dk uzama olarak gerçekleştirildi. Son siklusu takiben 72°C'da 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 sonucunda 254 bç'lik ürünler elde edilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Mitokondrial 12S rRNA geninin 254 bç'lik PZR ürünleri M: Marker (100 bç), 1: Pozitif kontrol 2: Negatif kontrol 3: Kuzu izolatu

Tartışma

Echinococcus granulosus türü içerisinde bulunan suşları belirlemek amacıyla dünyanın çeşitli bölgelerinde farklı moleküler teknikler kullanarak çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ekinokokkozis'in teşhisinde kullanılan moleküler teknikler diğer alışılmış yöntemlerden farklı olarak, son konakta nekropsiyeye gereksinim kalmadan ya da arakonakların otopsisinde sadece steril kistlerin bulunduğu vakalarda dahi sorumlu türlerin kesin teşhisine olanak sağlamaktadır (1, 2, 7, 8).

Türkiye'de *E.granulosus*'un farklı izolatlarını genotiplendirmek amacıyla 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 teknikler kullanılmıştır. Sığır, koyun, muflon koyunu, keçi, melez dağ keçisi, deve, köpek ve insanlar üzerinde yürütülen çalışmalar sonucunda ülkemizde G1, G1/G3, G3, G6, G7 suşları tespit edilmiştir (9-16).

Bu olgu sunumunda, üç aylık bir kuzuda *E.granulosus* s.s. enfeksiyonu rapor edilmiş olup, çok küçük çaplı kistlerin bile *E.granulosus*'un hangi grubu içerisinde yer aldığının PZR ile belirlenebileceği, bu tekniğin hem tanı hem de tiplendirme amacıyla kullanılabilmesi ve parazit epidemiyolojisinin anlaşılmasında ne kadar önemli bir araç olduğunu bir kez daha vurgulanmıştır.

Kaynaklar

1. Thompson RCA, Lymbery AJ. The nature, extent and significance of variation within the genus *Echinococcus*. *Adv Parasitol* 1988; 27: 209-258.
2. Ütük AE, Şimşek S, Köroğlu E. *Echinococcus* cinsinin moleküler genetik karakterizasyonu. *T Parazit Derg* 2005; 29: 171-176.
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* 2008; 107:192-194.
4. Nakao M, Yanagida T, Okamoto M, Knapp J, Nkouawa A, Sako Y, Ito A.,2010. State-of-the-art *Echinococcus* and *Taenia*: phylogenetic taxonomy of human-pathogenic tapeworms and its application to molecular diagnosis. *Infect Genet Evol* 2010; 10: 444-452.
5. Dinkel A, Njoroge EM, Zimmermann A, Walz M, Zeyhle E, Elmahdi IE, Mackenstedt U, Romig T. 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* 2004; 34: 645-653.
6. Ütük AE, Pişkin FÇ, Melez bir dağ keçisinde kistik hidatidosis ve moleküler karakterizasyonu. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2010; 16: 671-673.
7. Kamenetzky L, Canova SG, Guarnera EA, Rosenzvit MC, Thompson RCA. DNA extraction from germinal layers allows strain determination in fertile and nonfertile hydatid cysts. *Exp Parasitol* 2000; 95: 122-127.
8. Dinkel A, Nickisch-Rosenegk M, Bilger B, Merli M, Lucius R, Romig T. Detection of *Echinococcus multilocularis* in definitive host: Coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1871-1876.
9. 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.
10. Yıldırım FAB, Yıldız K, Çakır Ş, Gazyağcı AN. Kırıkkale bölgesinde koyun kökenli *Echinococcus granulosus* izolatlarının moleküler karakteri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2010; 16: 245-250.
11. Yolasiğmaz A, Turçeková L, Türk M, Reyhan E, Šnabel V, Dubinský P, Güneş K, Altıntaş N. Genetic variation in *Echinococcus granulosus* from Turkey and Slovakia demonstrated by sequence and SSCP analysis. XXnst International Congress of Hydatidology, Nairobi, Kenya, 2004.
12. Simsek S, Balkaya I, Ciftci AT, Utuk AE. Molecular discrimination of sheep and cattle isolates of *Echinococcus granulosus* by SSCP and conventional PCR in Turkey. *Vet Parasitol* 2011; 178: 367-369.
13. Simsek S, Erosuz Y. Occurrence and molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in Turkish mouflon (*Ovis gmelinii anatolica*). *Acta Tropica* 2009; 109: 167-169.
14. Simsek S, Kaplan M, Ozercan IH. A Comprehensive Molecular Survey of *Echinococcus granulosus* in Formaline Fixed Paraffin Embedded Tissues in Human Isolates in Turkey. *Parasitology Research* 2011; 109: 411-419.
15. Šnabel 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* 2009; 105: 145-154.
16. Vural G, Baca AU, Gauci CG, Bağcı O, Gıcık 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* 2008; 154: 347-350.