



Selin GELEN
Harun KAYA KESİK
Sami ŞİMŞEK

Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Parazitoloji Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

Geliş Tarihi : 28.04.2016
Kabul Tarihi : 07.06.2016

Yazışma Adresi
Correspondence

Sami ŞİMŞEK
Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Parazitoloji Anabilim Dalı,
Elazığ - TÜRKİYE

ssimsek@firat.edu.tr

ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2016; 30 (3): 199 - 202
http://www.fusabil.org

Fasciola hepatica'nın Morfometrik ve Moleküler Analizi^{*,**}

Bu çalışma, erişkin *Fasciola* spp. örneklerinin morfolojik ve morfometrik analizinin yapılması ve moleküler analiz sonuçlarıyla kıyaslanması amacıyla planlanmıştır. Bu amaçla, 20 farklı sığırdan kesim sonrası elde edilen 20 erişkin *Fasciola* spp. örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Parazitlerin morfometrik analizleri stereo mikroskopta 7 farklı parametre kullanılarak yapılmıştır. Moleküler analiz amacıyla ise gDNA izolasyonunu takiben mt-CO1 gen bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmış ve takiben kesin tür tayini için *AluI* enzimi kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon bölümünün uzunluk değişkenliği (PZR-RFLP) analizi yapılmıştır. Neticede erişkin parazitlerin morfolojik olarak benzer ölçülerde oldukları ve moleküler olarak da hepsinin *F. hepatica* olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma ile *F.hepatica*'nın morfometrik ve moleküler ayrımı konusuna dikkat çekilmiştir.

Key Words: *Fasciola hepatica*, sığır, morfometrik analiz, PZR-RFLP

Morphometric and Molecular Analysis of *Fasciola hepatica*

This study was planned for the aim of performing a morphological and morphometric analysis of adult *Fasciola* spp. and comparing those with results of molecular analysis. Twenty adult *Fasciola* spp. samples obtained from 20 different cattle after slaughtering were included in the study. Morphometric analysis of parasites was performed using 7 different parameters under stereo microscope. For the molecular analysis, the mt-CO1 gene region was amplified using polymerase chain reaction (PCR) following the gDNA isolation, subsequently for the accurate species identification polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis was conducted using *AluI* enzyme. All adult parasites had similar measurements and also they were detected as *F. hepatica*. In this study, morphometric and molecular differentiation of *F.hepatica* has been highlighted.

Anahtar Kelimeler: *Fasciola hepatica*, cattle, morphometric analysis, PZR-RFLP

Giriş

Fasciolosis, karaciğerde *Fasciola hepatica* ve *F. gigantica* tarafından oluşturulan bir hastalık olup başta koyun, keçi, sığır, manda ve deve olmak üzere çeşitli evcil ve yabani ruminantlar ile at, eşek, domuz, tavşan, fil, köpek, kedi gibi hayvanlarda ve insanlarda görülmektedir (1). Morfolojik olarak *F.hepatica* 2-3 cm X 8-13 mm ebatlarında (yaprak kelebeği), gri-kahverengi renkte, ön kısmında konik bir çıkıntı ile omuz çıkıntısı taşımakta, vücut arkaya doğru gittikçe daralmaktadır. *F.gigantica* ise 2.5-7.5 cm X 3-12 mm ebatlarında (yılan kelebeği), omuz çıkıntısı daha az olup iki yan kenarı birbirine paralel olarak seyredip yuvarlak bir şekilde sonlanmaktadır. Bu iki türün yumurtaları renk ve yapı olarak birbirine benzemektedir. Her iki türün yumurtaları oval, kapaklı, altın sarısı renkte olup *F. gigantica* yumurtaları (132-197 X 76-104 µm), *F.hepatica*'ya (130-150 X 63-90 µm) oranla daha büyük olmakla birlikte iki yumurtanın yakın ölçülerde olması bu iki türün yumurtalarının birbiriyle karışabileceğini ortaya koymaktadır (2). İki türün morfolojik özelliklerindeki varyasyondan dolayı ayrımları zaman zaman sıkıntılı olabilmektedir (3). Bunun yanı sıra farklı *Fasciola* genotipleri arasındaki hibridizasyon da yeni form nesillerin oluşmasına yol açabilmektedir (4). Bu nedenle *Fasciola* türlerinin ayrımında tek başına morfolojik analiz kabul edilemeyeceği, moleküler ayrımın da yapılması gerektiği bildirilmiştir (5).

Bu çalışmanın amacı, kesim sonrası sığır karaciğerlerinden elde edilen *Fasciola* spp. örneklerinin morfolojik ve morfometrik analizinin yapılması ve moleküler analiz sonuçlarıyla kıyaslanmasıdır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada kullanılan erişkin *Fasciola* spp. örnekleri mezbanede kesimi takiben enfekte sığır karaciğerlerinden elde edilmiştir. Safra kanalları belirginleşmiş karaciğerlerde kanallara enlemesine kesitler atılarak çıkarılan erişkin parazitler %70

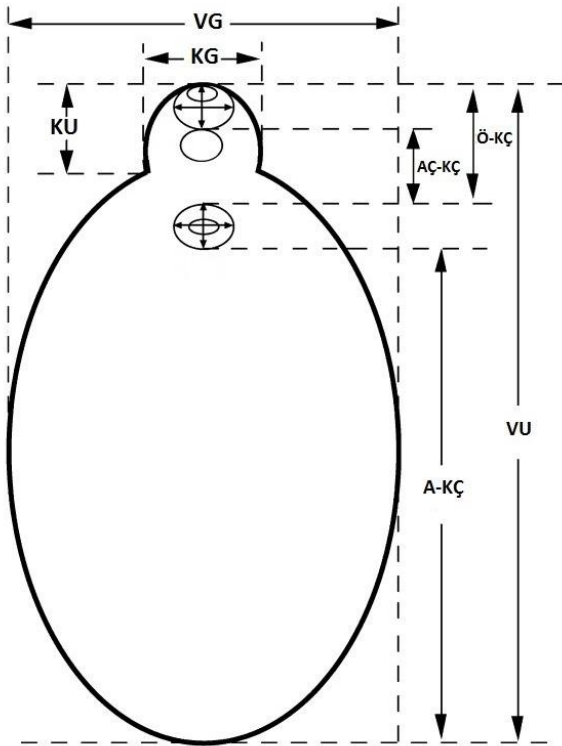
*Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (VF.14.05) tarafından desteklenmiştir.

**19. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 5-9 Ekim 2015, Erzurum/TÜRKİYE.

ethanol içerisine konularak laboratuvara ulaştırılmıştır. Bu amaçla, 20 farklı sığırdan elde edilen 20 erişkin *Fasciola* spp. örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmada örnek toplama aşaması Helsinki Bildirgesi'nde belirtilen esaslar çerçevesinde yürütülmüştür.

Erişkin Parazitlerin Morfometrik Analizi:

Parazitlerin morfometrik analizi Valero ve ark. (6)'nın bildirdiği şekilde yapılmıştır. Öncelikle parazitler %70 ethanolden çıkarılıp 1X PBS içerisine konulup 37°C'deki etüvde 15 dk bekletilmiştir. Sonra bir petri içerisine konulan erişkin parazitlerin Olympus SZX12 stereo mikroskopta X7 büyütme ile Şekil 1'de gösterilen ölçümleri yapılmıştır.



Şekil 1. Erişkin *Fasciola* spp. örneklerinin morfometrik analizinde ölçümleri yapılan parametreler. KG: Koni genişliği, KU: Koni uzunluğu, VG: Vücut genişliği, VU: Vücut uzunluğu, A-KÇ: Arka uç ile karın çekmeni arası mesafe, Ö-KÇ: Ön uç ile karın çekmeni arası mesafe, AÇ-KÇ: Ağız çekmeni ile karın çekmeni arası mesafe (Valero ve ark. (6)'dan modifiye edilmiştir).

Moleküler Analiz

Genomik DNA İzolasyonu:

Bu amaçla morfometrik ölçümleri yapılan erişkin parazitler bir lam üzerine alınıp ön 2/3'lük kısmı bir bistüri ile kesilip eppendorf tüplere konulduktan sonra en az 5 kez PBS (pH=7.4) ile yıkandı. Öncelikle bu tüplere kitte bulunan lizis buffer eklenip, 20 mg/µL proteinaz-K'dan 25 µL konulup 1 gece 56°C'de bekletildikten sonra ticari kit ile

(Fermentas, Lithuania) genomik DNA izole edildi ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı. Bu işlemin başarılı olup olmadığını anlamak için bütün örneklerdeki total DNA miktarı DNA spektrofotometre ile ölçülerek yeterli gDNA olmayan örneklerden yeniden izolasyon yapıldı (7).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR):

Fasciola spp.'nin mitokondrial sitokrom oksidaz 1 (CO1) gen bölgesi PZR ile çoğaltıldı. Toplam 50 µL'lik hacimde hazırlanan PZR karışımına 5 µL 10X PZR buffer, 5 µL 25 mM MgCl₂, deoksinükleotidlerin her birinden 250 µM, 1.25 U Taq DNA Polymeraz enzimi, primer çiftlerinin her birinden 20 pmol ve ortalama 200 ng gDNA ilave edildi. PZR amplifikasyonu 95°C'de 5 dk ön denatürasyon aşamasını takiben, toplam 35 PZR siklusu 94°C'de 50 sn denatürasyon, 45°C'de 50 sn hibridizasyon, 72°C'de 50 sn sentez olarak gerçekleştirildi ve son siklusu müteakip 72°C'de 10 dk ekstra sentez işlemi yapıldı. Çalışmada CO1 genini çoğaltmak için JB3 (TTTTTTGGGCATCCTG AGGTTTAT) ve JB4.5 (TAAAGAAAGAACATAATGAAA ATG) adlı primerler kullanıldı. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda elde edilen ürünler agaroz jel elektroforeze tabi tutuldu, bu amaçla %1.4'lük agaroz jel hazırlandıktan sonra, 10 µL PZR ürünü, 5 µL yükleme solüsyonu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Elektroforez işlemi Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tampon solüsyonu kullanılarak jel tankında 90 voltta 45 dk süreyle gerçekleştirildi. Daha sonra jel, ethidium bromide (10 mg/mL) ile boyanıp, UV transilluminatörde bandların varlığı yönünden incelendi. Bandların moleküler ağırlığını belirlemek için 100 bp'lik marker kullanıldı. Metod, Simsek ve ark. (7)'nin bildirdiği şekilde yürütüldü.

PZR-RFLP Analizi:

Bu işlem için 10 µL PZR ürünü, 10 U restriksiyon enzimi *-AluI*, 2 µL restriksiyon buffer, 0.2 µL BSA, 5.5 µL distile su olacak şekilde hazırlanan karışım üç saat boyunca 37°C'deki su banyosunda inkübe edildi. Bu sürenin sonunda %3'lük agaroz jelde yürütülüp 90 V akımda 45 dk yürütülen örnekler ethidium bromide (10 mg/mL) ile boyanıp, UV transilluminatörde bandların varlığı yönünden incelendi (7).

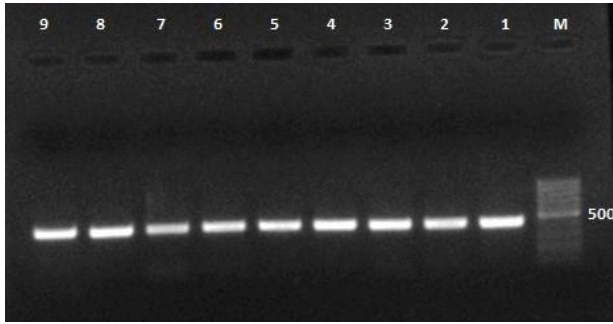
Bulgular

Bu çalışma ile morfometrik analizi yapılan 20 *Fasciola* spp. örneğinin ölçüm sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. Tablo incelendiğinde; Vücut Genişliği (VG) 4,02-8,80 mm, Koni Genişliği (KG) 1.01-2.08 mm, Koni Uzunluğu (KU) 1.01-2.01 mm, Vücut Uzunluğu (VU) 10.30-15.55 mm, Ağız Çekmeni ile Karın Çekmeni arası mesafe (AÇ-KÇ) 0.5-2 mm, Ön uç ile karın çekmeni arası mesafe (Ö-KÇ) 1.08-4.01 mm, Arka uç ile karın çekmeni arası mesafe (A-KÇ) 8.03-13.03 mm arasında değişmekte olduğu görülmektedir.

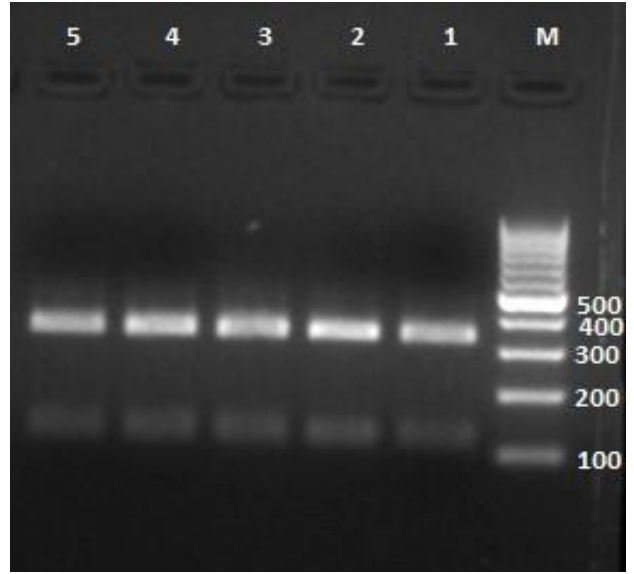
İncelenen bütün örneklerdeki değerlerin ortalaması alındığında, ortalama VG 6.26 mm, KG 1.19 mm, KU 1.25 mm, VU 13.26 mm, AÇ-KÇ 0.91 mm, Ö-KÇ 2.21 mm, A-KÇ 10.73 mm olarak belirlenmiştir.

Erişkin *Fasciola* spp. örneklerinden elde edilen gDNA'nın mt-CO1 gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması neticesinde bütün örneklerde 446 bp büyüklüğünde band gözlenmiştir (Şekil 2).

Bu örneklerin *AluI* enzimiyle kesimi neticesinde 330 ve 110 bp büyüklüğünde iki band elde edilmiş olup, bu örneklerin hepsinin *F.hepatica* olduğu anlaşılmıştır (Şekil 3).



Şekil 2. Erişkin *Fasciola* spp. örneklerinin mt-CO1 gen bölgesinin PZR bulgusu (446 bp). M: Marker (100 bp).



Şekil 3. *Fasciola* spp. örneklerinin *AluI* enzimiyle kesimi neticesinde elde edilen bandların görünümü (110 bp ve 330 bp). M: Marker (100 bp).

Tablo 1. Morfometrik analizi yapılan *Fasciola* spp.'lerin vücut ölçüm sonuçları

Örnek No	Ölçümü Yapılan Parametreler*						
	VG (mm)	KG (mm)	KU (mm)	VU (mm)	AÇ-KÇ (mm)	Ö-KÇ (mm)	A-KÇ (mm)
1	8.80	2.01	1.50	14.03	1	2.50	11.02
2	4.02	1.03	2.01	10.05	2	3.01	9.01
3	7.03	2.08	2.01	14.05	1	2.02	11.01
4	7.01	2.01	2.01	13.02	2	2.01	10.05
5	6.09	1.04	1.02	12.76	1	2.02	10.01
6	6.01	1.09	1.05	15.55	2	4.01	11.05
7	6.08	1.02	1.01	14.30	0.5	2.01	12.01
8	7.02	1.02	1.09	13.50	0.5	2.01	11.08
9	6.02	1.03	1.08	13.56	1	2.08	11.01
10	6.04	1.07	2.01	15.43	0.5	2.01	13.03
11	6.01	1.04	1.01	13.30	0.5	2.01	11.06
12	5.02	1.04	1.01	10.30	0.5	2.01	8.03
13	6.01	1.08	1.02	12.42	0.5	1.08	11.01
14	7.02	1.01	1.01	13.38	0.8	2.01	11.01
15	6.01	1.02	1.01	11.02	0.7	2.50	8.09
16	6.02	1.02	1.05	14.20	0.3	2.01	12.01
17	7.03	1.05	1.02	14.50	0.8	2.05	12.08
18	6.01	1.08	1.07	13.31	1.1	3.01	10.02
19	6.03	1.08	1.05	13.37	0.7	2.01	11.02
20	6.02	1.07	1.06	13.31	0.9	2.01	11.01
Ortalama	6.26	1.19	1.25	13.26	0.91	2.21	10.73

*KG: Koni genişliği, KU: Koni uzunluğu, VG: Vücut genişliği, VU: Vücut uzunluğu, A-KÇ: Arka uç ile karın çekmeni arası mesafe, Ö-KÇ: Ön uç ile karın çekmeni arası mesafe, AÇ-KÇ: Ağız çekmeni ile karın çekmeni arası mesafe.

Tartışma

Koyunlardaki bir *F. hepatica* günde 4.000-50.000 kadar yumurta çıkardığı halde bu sayı sığırlarda 3500 civarında olup konak yaşlandıkça yumurta sayısı da azalmaktadır. Koyunlarda 11 yıl kadar yaşayabilen *F. hepatica*'ların yumurtlamaları parazit yaşlandıkça azalır, *Fasciola*'lar dört yaşından itibaren çok az sayıda yumurta çıkarırlar. Konağın taşıdığı erişkin parazit sayısı ile dışkıda görülen yumurta miktarı arasında matematiksel bir ilişki bulunmakla birlikte bu konakta farklı yaş ve sayıdaki parazitlerin bulunduğu olaylarda mutlak değildir. *Fasciola*'lar ilkbaharda en yüksek sayıda yumurtlarlar, bu sayı sonbaharda biraz daha azalarak kışın en düşük seviyeye iner (8).

Sığır ve koyunlardaki *Fasciola* etkenlerinin büyüklükleri ile ilgili literatür bilgi çelişkilidir. Sığırlardaki *Fasciola*'ların koyunlardakinden daha büyük olduğuna yönelik öneriler bulunmakla birlikte kesin bir bilgi bulunmamaktadır (9). Ancak Dixon (10) koyunlardaki *Fasciola* etkenlerinin daha hızlı büyüdüğünü ve sığırlardakinden daha büyük ebatlara ulaştığını ifade etmiştir.

Valero ve ark. (6), koyunlardan elde ettikleri *F. hepatica*'ların vücut uzunluklarının sığır ve domuzlardakinden daha büyük olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar (6), sığırlardaki erişkin *F. hepatica*'ların ise vücut genişliklerinin koyun ve domuzlardakinden büyük olduğunu belirlemişlerdir. Benzer şekilde Akahane ve ark. (11) domuzlardaki karaciğer kelebeklerinin vücut genişliği ve uzunluğunun sığır ve koyunlardakinden daha küçük olduğunu bildirmişlerdir.

Valero ve ark. (6), sığırlardaki *F. hepatica* izolatlarında VU ortalama 19.07 ± 3.45 mm olarak bulunmuşlar ancak bizim çalışmamızda bu oran ortalama 13.26 mm olarak belirlenmiştir. Bu farklılığın erişkin parazitlerin elde edildiği konakların yaşlarıyla ilgili olabileceği düşünülmüştür. Yine adı geçen çalışmada VG ortalama 8.39 ± 1.51 mm olarak belirlenirken bizim çalışmamızda ortalama 6.26 mm olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar (6), KU ve KG değerlerini sırasıyla 2.11 ± 0.31 mm ve 2.76 ± 0.41 mm olarak belirlerlerken bu çalışmada adı geçen oranlar sırasıyla 1.25 mm ve 1.19 mm olarak hesaplanmıştır. Bahse konu çalışmada Ö-KÇ, A-KÇ ve AÇ-KÇ değerleri sırasıyla 2.27 ± 0.28 mm, 15.81 ± 3.19 mm ve 1.63 ± 0.27 mm olarak belirlenirken bizim çalışmamızda bu değerler sırasıyla 2.21 mm, 10.73 mm ve 0.91 mm olarak ölçülmüştür. Genel olarak bakıldığında Valero ve ark. (6)'nın ölçüm değerleri bizim örneklerimizinkinden daha büyüktür. Bu farklılığın nedeni bizim 20 örnek kullanmamız ancak diğer çalışmada 169 örneğin kullanılması olabilir. Yine örneklerin toplandığı sığırların yaşı ve enfeksiyon süresinin de parazitlerin büyüklükleri üzerinde etkili olabileceği düşünülmüştür.

Ghavami ve ark. (12), koyunlardaki *Fasciola* etkenlerinin sığırlardakinden daha büyük olduğunu bunun sebebinin koyunların parazite karşı düşük direnç gösterirken sığırların orta dereceli direnç göstermeleri olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Yine morfometrik farklılıkların enfeksiyonun yoğunluğu, konak türü, yaş ve immun yanıtın etkilenebileceğini belirtmişlerdir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile sığırlardan elde edilen erişkin *Fasciola* spp. örneklerinin morfometrik analizleri yapılmış ve takiben yapılan moleküler analizlerle bu örneklerin hepsinin *F. hepatica* olduğu teyid edilmiştir.

Kaynaklar

1. Soulsby E.J.L. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. London. Bailliere Tindall, 1986.
2. Kassai T. Veterinary Helminthology. London: Butterworth Heinemann, 1999.
3. Yakhcali M, Malekzadeh-Viayah R, Imani-Baran A, Mardani K. Morphological and molecular discrimination of *Fasciola* species isolated from domestic ruminants of Urmia City. Iranian Journal of Parasitology 2015; 10: 46-55.
4. Mas-Coma S, Funatsu IR, Bargues MD. *Fasciola hepatica* and Lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. Parasitology 2001; 123: 115-27.
5. Marcilla A, Bargues MD, Mas-Coma S. A PCR-RFLP assay for the distinction between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. Molecular and Cellular Probes 2002; 16: 327-33.
6. Valero MA, Darce NA, Panova M, Mas-Coma S. Relationships between host species and morphometric patterns in *Fasciola hepatica* adults and eggs from the northern Bolivian Altiplano hyperendemic region. Veterinary Parasitology 2001; 102: 85-100.
7. Simsek S, Utuk AE, Balkaya I. Molecular differentiation of Turkey cattle isolates of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. Helminthologia 2011; 48: 3-7.
8. Euzéby J. Les Maladies Vermineuses des Animaux Domestiques et Leurs Incidences sur la Pathologie Humaine, Tome II. Maladies Dues aux Plathelminthes, Deuxieme Fascicule Trematodes, Livre Generalites Distomatoses Hepato-Biliaires: Vigot Freres Editeurs. Paris. 1971; 327-387.
9. Panaccio M, Trudgett A. Molecular biology. In: Dalton JP. (Editor). Fasciolosis. Wallingford: CAB International, 1999; 449-464.
10. Dixon KE. The relative suitability of sheep and cattle as hosts for the liver fluke, *Fasciola hepatica*. Journal of Helminthology 1964; 38: 203-212.
11. Akahane H, Harada Y, Oshima T, Takayama A, Ashizawa H. Patterns of the variation of the common liver-fluke (*Fasciola* sp.) in Japan Part IV. Comparative studies on the external form, size of egg and number of eggs in the uterus of fluke in pig and horse. Japan Journal of Parasitology 1974; 23: 207-212.
12. Ghavami MB, Rahimi P, Haniloo A, Mosavinasab SN. Genotypic and phenotypic analysis of *Fasciola* isolates. Iranian Journal of Parasitology 2009; 4: 61-670.