

Kırşehir Yöresi Sığırlarında *Theileria annulata* ve *Theileria buffeli/orientalis* Varlığının Multiplex-PCR Yöntemiyle Araştırılması

Survey of *Theileria annulata* and *Theileria buffeli/orientalis* Complex in Cattle in the Kırşehir Region Using Multiplex-PCR

Ömer Orkun¹, Ahmet Deniz², Esin Güven³

¹Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

²Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara, Türkiye

³Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

ÖZET

Amaç: Kırşehir yöresindeki 9 farklı bölgeden seçilen 172 sığırın kanında *Theileria annulata* ve *Theileria buffeli/orientalis* etkenlerinin varlığının araştırılması.

Yöntemler: Multiplex-PCR yöntemi kullanılarak *T. annulata*'nın merozoit yüzey antijeni (Tams 1), *T. buffeli/orientalis*'in ise major piroplasm yüzey protein (MPSP) gen bölgeleri amplifiye edildi.

Bulgular: Multiplex-PCR sonucunda 4 (%2.32) örnekte *T. annulata* pozitifliği saptanırken *T. buffeli/orientalis* tespit edilmedi.

Sonuç: Bu çalışmada, klasik PCR ile türlerin tek tek araştırılmasındansa, multiplex-PCR ile *Theileria* türlerinin eş zamanlı olarak incelenmesinin daha pratik olduğu anlaşılmıştır. Paraziter hastalıkların tanısında kullanılan geleneksel yöntemlerin dezavantajlarını ortadan kaldıran multiplex-PCR gibi moleküler tanı yöntemlerinin kullanılması ile daha doğru epidemiyolojik veriler elde edileceği kanısına varılmıştır. (*Türkiye Parazitol Derg* 2012; 36: 9-11)

Anahtar Sözcükler: *T. annulata*, *T. buffeli/orientalis*, multiplex-PCRs

Geliş Tarihi: 05.10.2011

Kabul Tarihi: 16.12.2011

ABSTRACT

Objective: To investigate the presence of *T. annulata* and *T. buffeli/orientalis* complex in the blood of 172 cattle selected from 9 different regions of Kırşehir.

Methods: Genes for the merozoite surface antigen (Tams 1) and the major piroplasm surface protein (MPSP) were amplified with multiplex-PCR for *T. annulata* and *T. buffeli/orientalis*, respectively.

Results: By multiplex-PCR examination 4 (2.32%) samples were positive for *T. annulata* whereas none of the samples were positive for *T. buffeli/orientalis* complex.

Conclusion: In this study, it is concluded that simultaneous diagnosis of *Theileria* species by using multiplex-PCR is more practical than the investigation of species individually by using classical PCR. We also believe that a more accurate epidemiological data is achieved with the use of molecular diagnosis methods such as multiplex-PCR, which eliminates the disadvantages of the traditional methods used in the diagnosis of parasitic diseases. (*Türkiye Parazitol Derg* 2012; 36: 9-11)

Key Words: *T. annulata*, *T. buffeli/orientalis*, multiplex-PCR

Received: 05.10.2011

Accepted: 16.12.2011

Bu çalışma, 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi'nde (4-10 Eylül 2011, Kars) sunulmuştur.

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Dr. Esin Güven, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye Tel: +90 442 236 08 80 Faks: +90 442 236 08 81 E-posta: esingvn@yahoo.com

doi:10.5152/tpd.20112.03

GİRİŞ

Theileriosis ixodid keneleri tarafından nakledilen bir hastalık olup Türkiye'de ve tüm dünyada sığır yetiştiriciliğinde ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Türkiye'de bu hastalığın etkenlerinden *T. annulata* ve *T. buffeli/orientalis* varlığı belirlenmiştir. Tropikal theileriosis etkeni *T. annulata*'nın patojen olduğu, benign theileriosis etkeni *T. buffeli/orientalis* kompleksinin ise patojen ya da ılımlı patojen olduğu bilinmektedir. Bu etkenler tek başlarına ya da miks olarak hastalığa neden olabilmektedir (1-3).

Hyalomma türü keneler tarafından nakledilen *T. annulata* sığırlarda tropikal theileriosis adı verilen hastalığa sebep olmaktadır. Etken Afrika, Asya, Kuzey Avrupa ve Türkiye'de yayılım göstermekte ve ağır hastalık tablosuna yol açabilmektedir. *Haemaphysalis* soyuna bağlı kene türleri tarafından nakledilen *T. buffeli/orientalis* grubu Türkiye de dâhil geniş bir coğrafik dağılım göstermekte ve sığırlarda ılımlı enfeksiyona neden olmaktadır (3-9). *T. buffeli/orientalis* grubunun patojenitesi hakkında yeterli bilgi mevcut olmamakla birlikte yapılan araştırmalar, bu etkenlerin de hastalıklara neden olduğunu göstermektedir (1).

Theileriosisin tanısı, akut dönemde klinik bulgulara ek olarak periferik kan ve lenf sıvısı frotilerinin boyanıp incelenmesi ile konmaktadır. Ancak bu yöntemler taşıyıcı hayvanlarda tanının konulmasında yetersiz olduğundan bu durumda serolojik ya da moleküler tanı yöntemlerinden faydalanılır (10). Serolojik tanıda kullanılan yöntemlerin başında, hastalığı geçirmiş hayvanlardaki antikor varlığını ve oranını gösteren İndirekt Floresan Antikor Tekniği (İFAT) gelmektedir. Ancak bu yöntemde de türler ve hatta soylar arasında çapraz reaksiyon meydana gelmesi, antikor titresinin zamanla azalabilmesine bağlı hatalı sonuçlar elde edilmesi gibi dezavantajlar vardır (10, 11).

Bu sorunların tamamını ortadan kaldıran, parazit DNA'sının varlığını ortaya koyan moleküler tanı yöntemleri son yıllarda sıkça kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan biri olan PCR güvenli, spesifik ve hassas bir yöntemdir. Tek türün varlığını ortaya koyan klasik PCR'in modifikasyonlarından biri olan multiplex-PCR'in ise birden fazla etkeni eş zamanlı olarak tespit edilebilmesi gibi önemli bir avantajı mevcuttur. Bu çalışmada, multiplex-PCR yöntemi kullanılarak Kırşehir yöresi sığırlarında theileriosis etkenlerinden *T. annulata* ve *T. buffeli/orientalis* varlığının eş zamanlı olarak ortaya konması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örneklerin Toplanması

Bu çalışma, Ağustos-Eylül 2010'da Kırşehir yöresindeki 9 farklı bölgeden seçilen 172 sığır kanı (35 erkek, 137 dişi) ile yapılmıştır. Seçilen bölgeler vektör kenelerin varlığının daha önceki çalışmalarla belirlendiği yerler olup, bu bölgelerde en az bir yaz sezonunu merada geçirmiş hayvanlar çalışmaya dâhil edilmiştir. Yaşları 2 ile 13 arasında değişen sığırlardan tekniğine uygun bir şekilde alınan, kanlar soğuk zincirle laboratuara ulaştırılmış ve ekstraksiyon yapılarak -20°C'de saklanmıştır.

DNA ekstraksiyonu ve Multiplex-PCR

Genomik DNA elde etmek için 200µl kan QIAamp®DNA Blood mini kit (Qiagen, Germany) ile üretici firma prosedürüne uygun bir şekilde ekstrakte edilmiştir. Multiplex-PCR için *T. annulata*'nın

785 bp'lik major merozoit yüzey antijenini (Tams 1), *T. orientalis/buffeli*'nin ise 875 bp'lik major piroplasm yüzey protein (MPSP) gen bölgelerini amplifiye eden spesifik primerler kullanılmıştır. *T. annulata* için Tams1F [5'- ATGCTGCAAATGAGGAT -3'] ve Tspms1R [5'- GGACTGATGAGAAGACGATGAG -3'] , *T. buffeli/orientalis* için ise Tser-U [5'- CACGCTATGTTGTCC-AAGAG -3'] ve Tser-R [5'- TGTGAGACTCAATGCGCCTA -3'] primer çiftleri kullanılmıştır (12, 13).

Reaksiyon toplam 25µl hacminde olup son konsantrasyonda; 1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, her bir dNTP'den 0.2 mM, her bir primerden 20 pmol ve 1,5 U taq DNA Polimeraz (Sigma) enzimi ile 2 µl genomik DNA kullanılmıştır. Termal profil; 94°C'de 5 dk enzim aktivasyon basamağı ve onu takiben 37 siklus 94°C'de 1 dk, 60°C'de 1 dk, 72°C'de 2dk'dır. Son ekstensiyon basamağı ise 72°C'de 10 dk olarak belirlenmiştir. PCR ürünlerinden 10 µl alınarak %1.5'lik agoroz jelde yürütülmüş ve UV altında spesifik bantların varlığı kontrol edilmiştir.

BULGULAR

Kırşehir yöresi sığırlarına ait multiplex-PCR sonucunda, 172 örnekten 4'ünde (%2.32) *T. annulata* pozitif bant belirlenmiş olup *T. buffeli/orientalis* pozitif bant varlığı görülmemiştir. *T. annulata* pozitifliği saptanan 4 hayvanın tamamının dişi ve 4 yaşında olduğu, coğrafik yerleşimleri bakımından da aynı bölgeyi paylaştığı belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Türkiye'de sığırlarda theileriosis hastalığına yol açan *T. annulata* ve *T. buffeli/orientalis* türlerinin varlığı bilinmekte olup bu türlerden *T. annulata*'nın neden olduğu hastalık tablosu ölümlere varan sonuçlar doğurmaktadır (1-4). Theileriosis gibi ekonomik öneme sahip hastalıkların değerlendirilmesinde ülkedeki epidemiyolojik verilerinin eldesi, hem hastalığın ekonomik boyutunun ortaya konmasında hem de korunma programları oluşturmada büyük önem arz eder. Akut hastalığın belirlenmesi geleneksel yöntemlerle kolaylıkla mümkünken asıl sorun taşıyıcı hayvanların belirlenmesindedir. Taşıyıcı hayvanlar, vektör keneler için enfeksiyon kaynağı olmakta, dolayısıyla da sağlıklı hayvanlar için risk oluşturmakta ve bu sebeple de ortamda enfeksiyonun sürekliliğine yol açmaktadır (5, 7, 10).

Günümüzde theileriosisin tanısında halen mikroskopik ve serolojik yöntemler kullanılmakla birlikte, karşılaşılan dezavantajları ortadan kaldırmak amacıyla hassasiyeti ve spesifitesi daha yüksek olan moleküler tanı teknikleri daha çok tercih edilmektedir. Bu tekniklerin başında gelen PCR'in çeşitli modifikasyonları geliştirilmiş olup bunlardan multiplex-PCR'in eşzamanlı etken identifikasyonu gibi önemli bir avantajı bulunmaktadır (14). Bu çalışmada, multiplex-PCR yöntemi ile incelenen 172 örnekten 4'ünde (%2.32) *T. annulata* pozitif bant belirlenmiş olup buna karşın *T. buffeli/orientalis* pozitif bant varlığı görülmemiştir.

Türkiye'de sığır theileriosisinin epidemiyolojisi ilgili birçok moleküler çalışma yapılmıştır. *T. annulata*'nın moleküler düzeyde ilk tanısı Aktaş ve ark. (15) tarafından yapılmış olup daha sonraki çalışmalarda etkenin prevalansının %15.4-61.2 arasında değiştiği belirlenmiştir (5-9, 16-18). *T. buffeli/orientalis*'in moleküler düzeyde ilk tanısı ise Vatanserver ve ark. (6) tarafından yapılmıştır.

Etkene yönelik yapılan diğer araştırmalarda prevalansı % 0.9-13.6 arasında saptanmıştır (7-9, 17, 18).

Sonuç olarak, vektör keneler açısından uygun bir ortam olan Kırşehir'de, theileriosisin durumunu epidemiyolojik olarak ortaya koyan bu verinin hastalığın mücadelesinde ön bilgi ve hastalığın bölgesel durumu hakkında önemli bir veri olacağı kanısına varılmıştır. Kene kaynaklı hastalıklarda, taşıyıcı hayvanların hem duyarlı hayvanlar hem de keneler için daima enfeksiyon kaynağı olduğu bilinmektedir. Buna bağlı olarak bir sürüde taşıyıcı hayvanların belirlenmesi hastalıktan korunmada büyük öneme sahiptir. Bu amaçla yapılacak sürü taramalarında moleküler tanı yöntemlerinin kullanılmasının diğer birçok yöntemlerin neden olduğu dezavantajı ortadan kaldırması ve direkt olarak etkenin genetik materyalinin ortaya koyması bakımından kesin netice vermesi nedeniyle daha avantajlı olduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda multiplex-PCR'nin *Theileria* türlerinin tanısında daha kısa zamanda aynı örnekte birden fazla etkeni ortaya çıkarmasının da bir avantaj teşkil edebileceği kanısına varılmıştır.

Teşekkür

T. annulata ve *T. buffeli/orientalis* pozitif DNA örnekleri için Prof. Dr. Zati Vatanserver ve Prof. Dr. Münir Aktaş'a teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Preston PM. Theilerioses. Service MW, editor. Encyclopedia of Arthropod-Transmitted Infections of Man and Domesticated Animals. UK: CABI publishing; 2001. p. 487-502.
2. Bishop R, Musoke A, Skilton R, Morzaria, S, Gardner M, Nene V. Theileria: life cycle stages associated with the ixodid tick vector. Bowman AS, Nuttall PA, editors. Ticks: Biology, Disease and Control. UK: Cambridge University Press; 2008. p. 308-24.
3. Mehlhorn H, editor. Encyclopedia of Parasitology. 3rd edition. New York: Springer-Verlag; 2008. p.1370-2.
4. Uilenberg G. Theilerial species of domestic livestock. Irvin AD, Cunningham MP, Young AS, editors. Advances in the Control of Theileriosis. The Hague: Martinus Nijhoff publishers; 1981. p. 4-37.
5. Dumanli N, Aktas M, Cetinkaya B, Cakmak A, Koroglu E, Saki CE, et al. Prevalence and distribution of tropical theileriosis in eastern Turkey. Vet Parasitol 2005; 127: 9-15. [CrossRef]
6. Vatanserver Z, İça A, Deniz A, Nalbantoęlu S, Karaer Z, Çakmak A ve ark. Ankara yöresinde sığırlarda kene kaynaklı protozoon enfeksiyonlarının yayılışının reverse line blotting (RLB) ve indirek floresan antikor testi (IFAT) ile saptanması. XIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi; Eylül, 8-12; Konya: 2003. p. 194.
7. Aktas M, Altay K, Dumanli N. A molecular survey of bovine Theileria parasites among apparently healthy cattle and with a note on the distribution of ticks in eastern Turkey. Vet Parasitol 2006; 138: 179-85. [CrossRef]
8. Deniz A, Karaer Z. Sığırlarda Theileria türlerinin reverse line blotting ve indirek floresan antikor testi ile karşılaştırmalı tanısı üzerine araştırmalar. Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2006; 17: 43-54.
9. Altay K, Aktaş M, Dumanlı N. Erzincan yöresinde sığırlarda Theileria annulata ve Theileria buffeli/orientalis'in reverse line blotting yöntemi ile araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2007; 31: 94-7.
10. d'Oliveira C, Van der Weide M, Habela MA, Jacquet P, Jongejan F. Detection of Theileria annulata in blood samples of carrier cattle by PCR. J Clin Microbiol 1995; 33: 2665-9.
11. Anon. 2008. Theileriosis. OIE Terrestrial Manual. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.16_THEILIERIOSIS.pdf.
12. Kirvar E, Ilhan T, Katzer F, Hooshmand-Rad P, Zwegarth E, Gerstenberg C, et al. Detection of Theileria annulata in cattle and vector ticks by PCR using the Tams1 gene sequences. Parasitology 2000; 120: 245-54. [CrossRef]
13. Tanaka M, Onoe S, Matsuba T, Katayama S, Yamanaka M, Yonemichi H, et al. Detection of Theileria sergenti infection in cattle by polymerase chain reaction amplification of parasite-specific DNA. J Clin Microbiol 1993; 31: 2565-9.
14. Altay K, Aydın MF, Uluişik U, Aktaş M, Dumanlı N. Theileria annulata ve Theileria buffeli'nin Teşhisinde Multiplex PCR'in Kullanılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2008; 32: 1-3.
15. Aktas M, Dumanli N, Cetinkaya B, Cakmak A. Field evaluation of PCR in detecting Theileria annulata infection in cattle in the east of Turkey. Vet Rec 2002; 150: 548-9. [CrossRef]
16. Vatanserver Z, Nalbantoęlu S. Sahada Theileria annulata ile enfekte sığırların nested PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), IFA (İndirek Floresan Antikor) testi ve kan frotisi bakısı ile saptanması. Turk J Vet Anim Sci 2002; 26: 1465-9.
17. İnci A, Karaer Z, Çakmak A, Günay O, Ataserver A, Nalbantoęlu S ve ark. Kayseri yöresinde sığırlarda tropikal theileriosisin epidemiyolojisi üzerine araştırmalar. DPT 98-K12139 nolu final raporu 2003.
18. İça A, İnci A, Yıldırım A. Parasitological and molecular prevalence of bovine Theileria and Babesia species in the vicinity of Kayseri. Turk J Vet Anim Sci 2007; 31: 33-8.