T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

HYPODERMA BOVIS HYPODERMIN REKOMBİNANT ANTİJENLERİNİN KARAKTERİZASYONU, EKSPRESYON PROFİLLERİ VE SEROLOJİK TEŞHİSTEKİ ETKİNLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hazırlayan
Mübeccel OKUR

Danışman
Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Doktora Tezi

Haziran 2020
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

HYPODERMA BOVIS HYPODERMIN REKOMBİNANT ANTİJENLERİNİN KARAKTERİZASYONU, EKSPRESYON PROFİLLERİ VE SEROLOJİK TEŞHİSTEKİ ETKİNLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hazırlayan
Mübeccel OKUR

Danışman
Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Doktora Tezi

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2019-9574 nolu proje ile desteklenmiştir.

Haziran 2020
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Mübeccel OKUR

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"***Hypoderma bovis*** **Hypodermin Rekombinant Antijenlerinin Karakterizasyonu, Ekspresyon Profilleri ve Serolojik Teşhisteki Etkinliklerinin Değerlendirilmesi**", Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan	**Danışman**
Mübeccel OKUR	**Prof. Dr. Abdullah İNCİ**

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM

Prof. Dr. Abdullah İNCİ danışmanlığında **Mübeccel OKUR** tarafından hazırlanan "***Hypoderma bovis* Hypodermin Rekombinant Antijenlerinin Karakterizasyonu, Ekspresyon Profilleri ve Serolojik Teşhisteki Etkinliklerinin Değerlendirilmesi**" konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Parazitoloji** Anabilim Dalı'nda **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

24/06/2020

JÜRİ : **İmza**

Danışman: Prof. Dr. Abdullah İNCİ (Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri)

Üye: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM (Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri)

Üye: Prof. Dr. Münir AKTAŞ (Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Elazığ)

Üye: Prof. Dr. Esin GÜVEN (Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Erzurum)

Üye: Dr. Öğr. Üyesi İbrahim SÖZDUTMAZ (Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Kayseri)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun …….tarih ve……..sayılı kararı ile onaylanmıştır.

……/…./…….

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Başta tez konumun seçilmesinden çalışmalarımın yürütülmesine kadar her aşamasında her zaman desteğini gördüğüm, doktora eğitimime başladığım günden itibaren maddi ve manevi desteğini her zaman hissettiğim, bilgin, her türlü bilgi birikimini ve tecrübelerini aktaran ve en önemlisi hayatın her noktasında sorgulamayı hedef aldıran ve holostik felsefesi ile ışık tutan, akademik ortamda sonsuz desteğiyle gelişmeme katkıda bulunan ERÜ Veteriner Fakültesi Dekanı değerli danışman hocam Prof. Dr. Abdullah İNCİ'ye en içten duygularımla teşekkür ederim.

Tez çalışmamın başlangıcından sonuna kadar ilgisini ve önerilerini göstermekten kaçınmayan, kıymetli bilgi ve birikimlerinin ışığında hep yol gösterici olan, çalışmamın laboratuvar analizlerinde karşılaştığım güçlükler karşısında çözüm odaklı önerileri ile yardımlarını her an hissettiğim ve bu yolda özveriyle emek verip öğrenmeyi, araştırmayı ve "yaptığın işin her zaman insanlığa ve dünyaya faydalı olmalı" vurgusuyla bu kazanımı elde etmemi ve kendimi daha da geliştirmeme katkı sağlayan ve en önemlisi bu yolda bana inanması, fedakârlıklar gösterip hem maddi hem manevi desteği ile her daim yanımda hisettiğim değerli hocam Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM'a sonsuz teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışmamın laboratuvar analizlerinde yardımlarını esirgemeden bilgisinden faydalandığım, ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrından dolayı tez izleme komitesinde yer alan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi İbrahim SÖZDUTMAZ'a desteğinden dolayı teşekkür ederim. Parazitoloji Anabilim Dalı'nda çalışmaya başladığım günden bu yana desteğini gördüğüm değerli hocalarım Doç. Önder DÜZLÜ, Dr. Öğr. Üyesi Zuhal ÖNDER ve Dr. Öğr. Üyesi Arif ÇİLOĞLU'na, çalışma süresince laboratuvar analizlerinde yardımlarını esirgemeyen emeği geçen arkadaşlarıma ve özellikle doktora öğrencisi Sadullah USLUĞ'a ve malzeme bazında TDK-2019-9574 kodlu proje ile çalışmaya destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan dayım Ramazan YALDIZ'a ve birçok fedakârlıklar gösterip beni destekleyerek her an yanımda olan başta aileme ve dostlarıma teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim süresince benden desteğini esirgemeyen ve çalışmalarımda beni sabırla destekleyen sevgili nişanlım Muhammed Raşit ATELGE'ye sonsuz teşekkür ederim.

HYPODERMA BOVIS HYPODERMIN REKOMBİNANT ANTİJENLERİNİN KARAKTERİZASYONU, EKSPRESYON PROFİLLERİ VE SEROLOJİK TEŞHİSTEKİ ETKİNLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Mübeccel OKUR

T.C. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Haziran 2020
Danışman: Prof. Dr. Abdullah İNCİ

ÖZET

Bu çalışmada, sığırlarda enfestasyona yol açan *Hypoderma bovis* larvalarının vücutta göçü sırasında salgıladıkları ve immun modülasyonda aktif görev alan önemli serin proteazları hypodermin A (HA), hypodermin B (HB) ve hypodermin C (HC)'nin moleküler karakterizasyonları sonrası rekombinant olarak elde edilmesi ile hypodermosis'in serolojik teşhisinde önemli antijenler olarak kullanılabilecekleri hipotez edilmiştir. Çalışmada rekombinant antijenler ve ilgili genlerin aminoasit sekanslarından dizayn edilen peptidler ile Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) metodolojisi geliştirilmiş ve etkinlikleri değerlendirilerek saha sığır serum örneklerinde hypodermosis'in seroprevalansı araştırılmıştır. Araştırma materyalini mezbaha incelemelerinde hypodermosis ile enfeste belirlenen sığırlardan toplanmış üçüncü dönem (L3) *Hypoderma* larvaları oluşturmuştur. Kesimden önce enfeste hayvanlardan tam kan örnekleri alınarak serumlar elde edilmiştir. Larvalardan genomik Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) ve total Ribo Nükleik Asit (RNA) izolasyonları gerçekleştirilmiş ve takiben Komplementer DNA (cDNA) sentezi yapılmıştır. Morfolojik teşhis sonrasında incelenen larvaların mitokondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) DNA barkod bölgesinin sekans karakterizasyonuyla *H. bovis*'e ait oldukları konfirme edilmiştir. *Hypoderma bovis* cDNA kütüphanelerinde hypodermin genleri dizayn edilen spesifik primerlerle amplifiye edilmiştir. Nükleotid ve amino asit sekanslarının elde edilmesi amacıyla amplikonlar uygun bakteriyel plazmidlere klonlanarak transformasyon basamaklarından sonra rekombinant plazmid pürifikasyonu

yapılmıştır. Rekombinant plazmidler çift yönlü olarak sekanslanmış ve genetik yazılımlarla sekanslar işlenerek her gen bölgesi için konsensus sekanslar elde edilmiştir. HA, HB ve HC genlerine ait Açık Okuma Çerçevesi (ORF) sekanslarının sırasıyla 705 baz çifti (bp), 771 bp, 783 bp uzunluğunda oldukları ve 234 amino asit (aa), 256 aa ve 260 aa uzunluğunda proteinleri kodladıkları belirlenmiştir. Her üç hypodermin geninde intraspesifik nükleotid farklılığı belirlenmezken interspesifik nükleotid farklılıkları HA ve HB arasında %29,5, HA ve HC arasında %57,9, HB ve HC arasında %53,9 olarak tespit edilmiştir. In-silico analizlerde *H. bovis* HA, HB ve HC genlerinin sırasıyla 25,744 kilodalton (kDa), 27,795 kDa ve 28,516 kDa büyüklüğünde proteini eksprese ettikleri belirlenmiştir. Sonraki basamakta bakteriyel ekspresyon sistemine klonlanan hypodermin genleri üzerinde ekspresyon çalışmaları yürütülmüş ve ekspresyon etkinliği Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) ve Western Blot analizleri ile belirlenmiştir. HA'nın *Escherichia coli* ekspresyon sisteminde ifade olmadığı belirlenmiş, pürifiye edilmiş rekombinant HB (rHB) ve HC (rHC) antijenlerinin ise pozitif sığır serum dilüsyonları ile yapılan Western Blot analizlerinde immun reaktivite gösterdikleri saptanmış ve protein büyüklükleri in-silico sonuçlara paralellik göstermiştir. Pürifiye rHB, rHC ve peptidler (pHA, pHB, pHC) üzerinde yürütülen standardizasyon çalışmalarında ELISA için rHC antijeni ve pHC peptidinin en etkin ve birbirine benzer sonuçları verdiği belirlenmiştir. rHC ve pHC ile oluşturulan ELISA'da incelemesi yapılan 200 sığırda hypodermosis seroprevalansı %62,0 olarak belirlenmiş ve enfestasyonun dağılımında yaş, cinsiyet ve ırk gibi çeşitli parametrelerin etkisi değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile sığırların önemli bir ekto-endoparaziti ve yüksek ekonomik kayıplara yol açan *H. bovis* için antijenik değeri yüksek ve immun modülasyonda aktif görev alan HA, HB ve HC proteinlerini kodlayan genlerin dünyada ilk kez moleküler karakterizasyon verileri sağlanmış, immun reaktiviteleri üzerine özgün çıktılar elde edilmiş ve hypodermosis'in serolojik teşhisi amacıyla rekombinant teknolojisi ile özgün rekombinant antijenler elde edilmiş ve ELISA metodolojisi geliştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Ekspresyon, *Hypoderma bovis*, hypodermin A, hypodermin B, hypodermin C, moleküler karakterizasyon, ELISA, sığır

CHARACTERIZATION AND EXPRESSION PROFILES OF *HYPODERMA BOVIS* HYPODERMIN RECOMBINANT ANTIGENS AND ASSESMENT OF THEIR SERODIAGNOSTIC EFFICIENCIES

Mübeccel OKUR

Erciyes University, Graduate School of Health Science
Department of Veterinary Parasitology
PhD Thesis, June 2020
Supervisor: Prof. Dr. Abdullah İNCİ

ABSTRACT

An ELISA methodology was developed using recombinant antigens and peptides designed from amino acid sequences of the related genes and their efficiencies were evaluated. Afterward, the seroprevalence of hypodermosis in the sera of cattle from the field was investigated. The third stage *Hypoderma* larvae (L3) collected from infested cattle during abattoir inspections were constituted the material of the study. Whole blood samples were got from the animals prior to slaughter. Genomic DNA and total RNA isolations were performed followed by cDNA synthesis. After morphological identifications, species identification of *H. bovis* was confirmed by sequence analyses of the barcode mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) DNA region of the larvae. Hypodermin genes were amplified in *H. bovis* cDNA libraries with originally designed primers. In order to obtain nucleotide and amino acid sequences, recombinant plasmid purifications were utilized after cloning the amplicons into appropriative bacterial plasmids and transformation steps. Recombinant plasmids were bidirectionally sequenced, and consensus sequences were obtained for each gene region by processing the sequences with genetic software. The open reading frame (ORF) sequences of HA, HB and HC gene were determined as in the length of 705 bp, 771 bp, 783 bp, and their coding protein aminoacid lengths were 234 aa, 256 aa, and 260 aa, respectively. There were no intraspecific differences in each Hypodermin gene, while 29.5%, 57.9%, and 53.9% interspecific differences were determined between HA and HB, HA and HC, HB and HC, respectively. *Hypoderma bovis* HA, HB and HC genes expressed sizes of 25.744 kDa, 27.795 kDa and 28.516 kDa proteins based on in-silico analyses. In the

next step, expression studies were conducted on the Hypodermin genes that were cloned to bacterial expression system and expression efficiencies were determined by SDS-PAGE and Western Blot analyses. HA was not expressed in *E. coli* expression system, while purified recombinant HB (rHB), and HC (rHC) antigens were found as immune reactive in Western Blot analyses using sera dilutions of positive cattle. Protein sizes were also consistent with the result of in-silico analyses. rHC antigen and pHC peptide were found as the most effective with giving similar results to each other for ELISA in the standardization studies on purified rHB, rHC, and peptides (pHA, pHB, pHC). In the ELISA base on rHC and pHC, a seroprevalence of 62.0% of hypodermosis was determined in the examined 200 cattle, and the effects of several parameters such as age, gender, and breed on the distribution of the infection were evaluated.

In conclusion, first molecular characterization data was obtained on the genes encoding HA, HB and HC proteins that are high antigenic importance and have an active role in immunomodulation of *H. bovis* which is an important endo-ectoparasite of cattle, and cause high economic losses with this study. Unique data were also obtained on the immune reactivities of these proteins and a novel ELISA methodology was developed with recombinant technology in order to the serological diagnosis of hypodermosis.

Key words: Expression, *Hypoderma bovis*, hypodermin A, hypodermin B, hypodermin C, molecular characterization, ELISA, cattle

İÇİNDEKİLER

HYPODERMA BOVIS HYPODERMIN REKOMBİNANT ANTİJENLERİNİN KARAKTERİZASYONU, EKSPRESYON PROFİLLERİ VE SEROLOJİK TEŞHİSTEKİ ETKİNLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Sayfa

İÇ KAPAK ..... **i**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK ..... **ii**

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI ..... **iii**

TEŞEKKÜR ..... **v**

ÖZET ..... **vi**

ABSTRACT ..... **viii**

İÇİNDEKİLER ..... **x**

KISALTMALAR VE SİMGELER ..... **xiv**

TABLOLAR LİSTESİ ..... **xvii**

ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **xviii**

1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**

2. GENEL BİLGİLER **3**

2.1 Myiasis ve Sınıflandırma **3**

2.2 Sınıflandırma **5**

2.3 Morfoloji ve Biyoloji **5**

2.3.1 Yumurta, Deri Penetrasyonu ve Larval Gelişimi 6

2.3.2 Pupa Evresi 8

2.3.3 Erişkin 8

2.4 Prevelans **9**

2.5 Klinik Belirtiler, Lezyonlar ve Ekonomik Kayıplar **11**

2.6 İmmünite 18

2.7 Teşhis 24

2.8 Proflaksi ve Kontrol 26

2.9 Eradikasyon 29

3. GEREÇ VE YÖNTEM 32

3.1 *Hypoderma* Larvalarının Elde Edilmesi ve Morfolojik Teşhisi 32

3.2 *Hypoderma* Larvalarının DNA Barkodlama ile Tür Konfirmasyonu ve Filogenetik Analizleri 32

3.2.1 Larva Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu 32

3.2.2 DNA Barkodlama için Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I (mt-COI) Gen Bölgesinin Amplifikasyonu 34

3.2.3 *Hypoderma* mt-COI Gen Bölgesinin Sekans ve Filogenetik Analizleri 36

3.3 Hypodermin Genlerinin Moleküler Karakterizasyonu 37

3.3.1 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi 37

3.3.2 Hypodermin Genlerinin Amplifikasyonu 39

3.3.3 Hypodermin Genlerinin Plazmid Vektöre Klonlanması ve Rekombinant Plazmid DNA Elde Edilmesi 41

3.3.4 Hypodermin Genlerinin Sekanslanması, Nükleotid ve Amino Asit Sekanslarının Karakterizasyonu 45

3.4 Hypodermin Genlerinin Ekspresyon Analizleri ve Rekombinant Antijenlerin Eldesi 46

3.4.1 Hypodermin Genlerinin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması ve Rekombinant Plazmid DNA Eldesi 46

3.4.2 Hypodermin Genlerinin Ekspresyon Analizleri 49

3.4.3 Rekombinant Hypodermin Antijenlerinin Saflaştırılması 55

3.4.4 Rekombinant Hypodermin Antijenlerinin İmmun Reaktivite Analizleri 58

3.5 Rekombinant Hypodermin Antijenleri ve Sentetik Peptid Bazlı ELISA ile Sığır Serum Örneklerinde Hypodermosis Seropozitifliğinin Karşılaştırmalı Analizi 58

3.5.1 Rekombinant Hypodermin Antijenleri Tabanlı ELISA 59

3.5.2 Sentetik Peptid Tabanlı ELISA 59

4. BULGULAR 61

4.1 *Hypoderma* Larvalarının Morfolojik İdentifikasyonu 61

4.2 Mt-COI Barkod Geninin Amplifikasyonu, Sekans Karakterizasyonu ve Filogenetik Analiz Sonuçları 63

4.3 Hypodermin Genlerinin Amplifikasyon Klonlanma Sonuçları 69

4.4 Hypodermin Genlerinin Nükleotid ve Amino Asit Sekans Karakterizasyon Sonuçları 70

4.4.1 Hypodermin A 70

4.4.2 Hypodermin B 72

4.4.3 Hypodermin C 74

4.5 Hypodermin Genlerinin Kodladığı Proteinlerin In-Silico Analiz Sonuçları 76

4.5.1 Hypodermin A 76

4.5.2 Hypodermin B 77

4.5.3 Hypodermin C 78

4.6 Hypodermin Genlerinin ORF Bölgesinin Amplifikasyonu ve Ekspresyon Vektörüne Klonlama Sonuçları 78

4.7 Hypodermin Genlerinin Ekspresyon Analiz Sonuçları 81

4.7.1 Hypodermin A 81

4.7.2 Hypodermin B 81

4.7.3 Hypodermin C 82

4.8 Rekombinant Hypodermin Antijenlerinin İmmun Reaktivite Analiz Sonuçları 84

4.8.1 Rekombinant Hypodermin B Antijeni 84

4.8.2 Rekombinant Hypodermin C Antijeni 84

4.9 Rekombinant Antijen ve Peptid Tabanlı ELISA Analiz Sonuçları..... 85

4.9.1 Rekombinant Hypodermin B ve C Antijenleri ile Checkerboard Titrasyon ve ROC Analiz Sonuçları..... 85

4.9.2 Hypodermin A, B ve C Peptidleri ile Checkerboard Titrasyon Analizleri87

4.10 Sığır Serum Örneklerinde Hypodermosis Seropozitifliği Sonuçları 89

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 90

6. KAYNAKLAR 105

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR VE SİMGELER

µg : Mikrogram

µl : Mikrolitre

µm : Mikrometre

µM : Mikromolar

aa : Amino asit

bp : Baz çifti

bw : Body Weight

cDNA : Komplementer DNA

cm : Santimetre

CV : Kolon volüm

dk : Dakika

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ES : Ekskret/Sekret

E. coli :*Escherichia coli*

gDNA : Genomik DNA

HA : Hypodermin A

HB : Hypodermin B

HC : Hypodermin C

IFN-γ : İnterferon Gama

IgG : İmmünoglobulin G

IL : İnterleukin

IPTG : isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

kDa : Kilodalton

kg : Kilogram

L1 : Larva1

L2 : Larva2

L3 : Larva3

M : Marker

M : Molar

Mb : Megabaz

ML : Maximum Likelihood

ml : Mililitre

mm : Milimetre

mt-COI : Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I

ng : Nanogram

nm : Nanometre

OD : Optical density

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCR-RFLP : Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism

pHA	: Peptid Hypodermin A
pHB	: Peptid Hypodermin B
pHC	: Peptid Hypodermin C
PLGA	: Poly D, L-lactide-co-glycolic acid
pmol	: Pikomol
rHA	: Rekombinant Hypodermin A
rHB	: Rekombinant Hypodermin B
rHC	: Rekombinant Hypodermin C
RNA	: Ribo Nükleik Asit
ROC	: Receiver Operating Characteristic
rpm	: Revolutions Per Minute
rRNA	: Ribozomal RNA
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez
sn	: Saniye
UV	: Ultraviolet
V	: Volt
w/v	: Weight/volume
WFI	: Warble Fly Infestation

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 Dünyada ve ülkemizde hypodermosis prevalansı ile ilgili çalışmalar 10

Tablo 2.2 Matematiksel modellemede kullanılan veriler 15

Tablo 3.1 Hypodermin genlerinin ekspresyon vektörüne klonlanması için dizayn edilen primerler 47

Tablo 4.1 Mezbaha incelemeleri yapılan sığırların çeşitli faktörlerine göre hypodermosis pozitifliği ve toplanan larva sayıları..... 62

Tablo 4.2 *H. bovis* izolatlarının mt-COI sekans analizine göre belirlenen haplotiplere dağılımı 66

Tablo 4.3 *H. bovis* ve Muscinae alt ailesinde yer alan diğer bazı sinek türlerine ait izolatlarının nükleotid farklılıkları..... 67

Tablo 4.4 rHB ve rHC antijenleri ile Checkerboard Titrasyon sonucu ELISA'da belirlenen OD değerleri..... 86

Tablo 4.5 pHA, pHB ve pHC ile Checkerboard Titrasyon sonucu ELISA'da belirlenen OD değerleri..... 88

Tablo 4.6 Sığır serum örneklerinde *H. bovis* seropozitifliğinin dağılımı ve istatistiksel analizi..... 89

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1 *Hypoderma* larvalarından total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi 37

Şekil 3.2 Hypodermin genlerini amplifiye eden primerler ve amplifikasyon prosesi 39

Şekil 3.3 HA geninin amplifikasyonunda kullanılan primerlerin referans sekans üzerinde bağlanmaları ve özellikleri..... 40

Şekil 3.4 HB geninin amplifikasyonunda kullanılan primerlerin referans sekans üzerinde bağlanmaları ve özellikleri..... 40

Şekil 3.5 HC geninin amplifikasyonunda kullanılan primerlerin referans sekans üzerinde bağlanmaları ve özellikleri..... 41

Şekil 3.6 Hypodermin genlerinin pGEM®-T Easy Vector Sistemine klonlama basamakları 42

Şekil 3.7 Hypodermin genlerinin pET 100/D-TOPO Ekspresyon vektörüne klonlama basamakları 47

Şekil 4.1 Hypodermosis ile enfeste belirlenen sığırda dorsal ve lumbar bölgedeki nodüller 62

Şekil 4.2 *H. bovis* L3 (orijinal)..... 63

Şekil 4.3 *H. bovis* L3'ün posterior peritremi (orijinal)..... 63

Şekil 4.4 *H. bovis* L3'lerine ait izolatların parsiyel mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primer ile PCR sonucu elde edilen amplikonların jel elektroforezde görünümü M: Marker (100bp) 64

Şekil 4.5 Mt-COI gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası jel pürifiye edilen bazı örneklerin jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100 bp)..... 64

Şekil 4.6 DeNovo analizleri sonucu *H. bovis* izolatına ait konsensus sekans dizilimi 65

Şekil 4.7 *H. bovis* ve Muscinae alt ailesinde yer alan diğer bazı sinek türlerine ait izolatların mt-COI barkod gen bölgesi Maximum Likelihood

(ML) analizine göre filogenetik ilişkileri. Node'ların önündeki rakamlar ML bootstrap desteğini göstermektedir. Dış grup olarak *A. labranchiae* izolatı (HQ860372) kullanılmıştır. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir. 68

Şekil 4.8 HA, HB ve HC genlerinin cDNA kalıplarında PCR ile çoğaltılması, klonlama ve koloni PCR sonrası rekombinant plazmid eldesi..... 69

Şekil 4.9 Rekombinant pGEM-T Easy-Hypodermin plazmidlerinin gen spesifik primerlerle PCR analizleri sonucu amplikonların agaroz jelde görünümü M: Marker (100 bp) 70

Şekil 4.10 HA geninin nükleotid sekansı, intra ve inter-spesifik genetik farklılıklar..... 71

Şekil 4.11 HA geninin amino asit sekansı, intra ve inter-spesifik genetik farklılıklar..... 72

Şekil 4.12 HB geninin nükleotid sekansı, intra ve inter-spesifik genetik farklılıklar..... 73

Şekil 4.13 HB geninin amino asit sekansı, intra ve inter-spesifik genetik farklılıklar..... 74

Şekil 4.14 HC geninin nükleotid sekansı, intra ve inter-spesifik genetik farklılıklar..... 75

Şekil 4.15 HC geninin amino asit sekansı, intra ve inter-spesifik genetik farklılıklar..... 76

Şekil 4.16 HA proteinin in-silico özellikleri..... 77

Şekil 4.17 HB proteinin in-silico özellikleri 77

Şekil 4.18 HC proteinin in-silico özellikleri 78

Şekil 4.19 Her üç gen bölgesi için hedef büyüklükte PCR ürünleri; M (100bp) 79

Şekil 4.20 pET 100/D-TOPO ekspresyon vektörüne klonlanma sonrası LB katı besiyerinde üreyen koloniler 79

Şekil 4.21 Transforme hücrelerde HA, HB ve HC genlerinin koloni PCR'ı sonucu amplikonların jel agarozda görünümü M: Marker (100bp) 80

Şekil 4.22 pET 100/D-TOPO-Hypodermin plazmid DNA izolatlarının agaroz jelde görünümü M: Marker (1kb)..... 80

Şekil 4.23 HA geninin ekpresyon analizleri 81

Şekil 4.24 HB geninin ekpresyon analizleri..... 82

Şekil 4.25 HC geninin ekpresyon analizleri..... 83

Şekil 4.26 rHB antijeninin enfeste sığır serumları ile PVDF membran üzerinde immun reaktifliği 84

Şekil 4.27 rHC antijeninin enfeste sığır serumları ile PVDF membran üzerinde immun reaktifliği 84

Şekil 4.28 rHB ve rHC antijenleri ile Checkerboard Titrasyon sonucu ELISA pleytlerinde gelişen reaksiyonlar..... 85

Şekil 4.29 rHC antijeninin farklı serum dilüsyonları ile elde edilen OD değerlerinin ROC analizi sonucu belirlenen cut-off değerleri ve istatistiksel analizi..... 86

Şekil 4.30 HA, HB ve HC peptidleri ile Checkerboard Titrasyon sonucu ELISA pleytlerinde gelişen reaksiyonlar..... 87

Şekil 4.31 pHA, pHB ve pHC ile Checkerboard Titrasyon sonucu ELISA pleytlerinde gelişen reaksiyonlar cut-off değerleri ve istatistiksel analizi..... 88

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diptera takımına ait bazı insekt larvalarının canlı omurgalı hayvanları enfeste etmesi "myiasis" olarak adlandırılır. Bu larvalar, konağın dokusu (ölü veya canlı), sıvı vücut maddeleri veya sindirilmiş besinleri ile beslenirler (Zumpt, 1965). *Hypoderma* ve *Przhevalskiana* cinslerine ait insekt larvalarının daha çok sığır ve keçilerde oluşturduğu myiasis "hypodermosis" olarak adlandırılır. *Hypoderma* larvalarının varlığı, sonbahar ve kış mevsimlerinde enfeste hayvanların sırtında görülen deri altı şişlikleriyle karakterize edilir. Sığırlarda önemli türler sırasıyla *H. bovis* ve *H. lineatum*'dur. Bu sinek larvaları sığırların derisinde cuticole myiasis'e neden olmalarıyla Türkiye'de sığır yetiştiriciliginde önem arz etmektedir. *Hypoderma* larvaları yumurtadan çıktıktan sonra epidermise nüfuz etmeye başlar. Larvaların penetrasyona başlaması için kıl folikülleri ve deri yüzeyi düzensizlikleri en uygun noktalardır. Hiperkeratinize epidermis ve A-avitaminosis'den kaynaklanan bozulmuş foliküller de sığırları bu türlerin istilasına karşı daha duyarlı hale getirebilmektedir. Yapılan bir çalışmada, A-avitaminosis'li buzağıların sağlıklı buzağılara göre daha yüksek enfestasyon oranına sahip olduğu rapor edilmiştir. (Gingrich ve Barrett 1975). Kış aylarında taze yemin kullanılmadığı, düşük kaliteli saman, hatta yanlış veya uzun süreli depolanan kaliteli saman A vitamini bakımından düşük içeriğe sahiptir. Kış ve ilkbahar aylarında, özellikle iklim koşullarının kötüye gittiği dönemlerde sığırların vitamin gereksinimi çoğu zaman karşılanamamaktadır. Bu yüzden, A-vitaminosis buzağı ve sığırlarda çok değişik klinik ve patojenik bozuklukların nedeni olarak düşünülür (Anteplioğlu ve ark., 1977; Gül ve İssi, 2011). Ayrıca, kışın ek A vitamini takviyesi almayan sığırlar ilkbaharda meraya çıktıklarında erişkin sinekler tarafından aktif olarak konak arar ve özellikle zayıf, güçsüz ve hassas olan sığırlar erişkin sineklerin istilasına maruz kalırlar (Gingrich ve Barrett, 1975). *Hypoderma* larvalarıyla enfeste olan sığırların meradan yararlanma kabiliyetlerinin azalması sonucunda gelişmede gerilik, avitaminosis özellikle A-avitaminosis görülmekte ve buna bağlı metabolik sağlık problemleri meydana gelmektedir (Anteplioğlu ve ark., 1977; Gül ve İssi, 2011). Ayrıca enfeste sığırların et

ve süt verimleri düşmektedir. Öte yandan, özellikle larvaların deride açtıkları delikler sonucu derinin kullanılamaz hale gelmiş olması ekonomik kayıpları daha da arttırmaktadır. Bu yüzden bu türlerin yol açtığı enfestasyon hem yetiştiriciler hem de ülke ekonomisi için oldukça önemlidir. Hypodermosis ile ilişkili ekonomik kayıpları önlemek için erken ve güvenilir tanı teknikleri gerekmektedir. Bu durum sistematik bir tedavi için gerekli olan birinci dönem larvaların (L1), göç fazının başlangıcında saptanabilmeleri ve buna ilaveten parazit tarafından konak dokularına verilecek zararın engellenmesi çerçevesinde hypodermosis'in eradike edilmesi için oldukça kritik ve önemlidir (Yadav ve ark., 2017). *Hypoderma* larvaları tarafından salgılanan chymo-trypsin familyasındaki HC ve trypsin familyasında yer alan ve ortak biyokimyasal özellikler taşıyan HA ve HB, immunizasyon çalışmalarında ve seroloji tabanlı tanı teknikleri geliştirilmesinde önemli proteinler olarak bilinmektedir. Dolayısıyla bu proteinleri kodlayan gen üzerine araştırmalar, potansiyel hedef antijen geliştirilmesi noktasında oldukça önemli görülmektedir. Günümüze kadar ilgili genler ve eksprese ettikleri antijenler üzerine sınırlı sayıda çalışma mevcut olup bu çalışmaların *H. lineatum* üzerinde gerçekleştirildiği görülmektedir. Ayrıca Türkiye'de hypodermosis üzerine yapılmış moleküler tabanlı araştırmalar da oldukça sınırlıdır.

Bu doktora tez çalışmasında, sığırlarda ekonomik kayba sebebiyet veren cuticole myiasis etkeni *H. bovis* larvalarının vücuttaki göçü sırasında salgıladıkları Hypodermin antijenlerinin, hypodermosis'in erken dönem serolojik teşhisinde kullanılabilecekleri hipotez edilmiştir. Bu hipotez doğrultusunda, çalışmada sığırları enfeste eden *H. bovis* 3. dönem larvalarının morfolojik ve moleküler teşhislerini takiben immun sistemin sitümilasyonu açısından önem arz eden hypodermin A, B ve C antijenlerini kodlayan gen bölgelerinin ilk kez moleküler karakterizasyonu sağlanmış ve akabinde gen ekspresyonu çalışmaları ile ilgili rekombinant antijenlerin karakterizasyonunu, ekspresyon profilleri ve immun reaktiviteleri ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca çalışmada rekombinant antijenler ve ilgili genlerin amino asit sekanslarından in-silico analizlerle dizayn edilen peptidler kullanılarak ELISA metodolojisi geliştirilmiş ve sığır hypodermosis'inin serolojik teşhisinde etkinliği değerlendirilerek Kayseri yöresinde önceki proje çalışmalarında elde edilmiş sığır serum örneklerinde hypodermosis'in seroprevalansı araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Myiasis ve Sınıflandırma

Yunanca türetilmiş bir isim olan "myiasis" terimi, ilk olarak 1840 yılında Hope tarafından bazı Diptera larvalarının neden olduğu insan hastalıklarını tanımlamak için *"Insect'ler ve insan vücudunda tesadüfen bulunan larvalar*" adlı kitapta önerildiği "myia" nın Yunanca sinek anlamında olduğu, "myiasis" için ise sinek hastalığı denilebileceği kaydedilmektedir. Miyasis, temelde anatomik ve entomolojik olarak iki katagoride sınıflandırılmaktadır. İlk olarak Bishopp tarafından önerilen anatomik sınıflandırma sisteminin, pratik tanı ve konaktaki lokasyonu ile ilişkili enfestasyona bağlı olarak sınıflandırılmasının yararlı olabileceği kaydedilmiştir (Dinçer, 1997; Francesconi ve Lupi, 2012). Anatomik sınıflandırma, önerilen sınıflandırma sistemine dayanmaktadır. Bishopp, daha sonra James ve Zumpt tarafından modifiye edilmiş ve bu araştırıcıların her biri aynı terimlerle farklı terimler kullanmıştır. Bu terim karmaşasını önlemek için Bishopp'un, James'in ve Zumpt'ın önerilen sınıflandırmalarına dayanan sınıflandırma aşağıda verilmiştir (Dinçer, 1997; Francesconi ve Lupi, 2012).

Bishopp'a göre	**James'e göre**	**Zumpt'a göre**
Bloodsucking	Bloodsucking	Sanguinivorous
Doku harabedici Subdermal göç	Fruncular Creeping Traumatic/yara Anal/vaginal	Dermal/subdermal
Baş boşluklarının enfestasyonu	Burun, ağız ve sinuslar Aural Ocular	Nasopharyngeal
İntestinal/Urogenital	Enteric Anal/Vaginal	İntestinal
İntestinal/Urogenital	Bladder Anal/vaginal	Urogenital

Zumpt (1965), bu sınıflandırmada myiasis'i önce 5 gruba ayırmıştır. Memelilerin ve kuşların kan emici larvalar ile enfestasyonunu sanguinivorous myiasis (*Auchmeromyia*, *Passeromyia*, *Protocalliphora*), çıban ve şişliklere neden olan veya mevcut bir yaraya bulaşarak o bölgeyi genişleten veya direkt dokuya girerek yaralara neden olan larvaları dermal veya subdermal myiasis (*Calliphora*, *Wohlfahrtia*, *Dermatobia*, *Hypoderma*), nasal ve pharyngeal boşluk, frontal sinusların enfestasyonunu ise nasopharyngeal myiasis (*Oestrus*, *Rhinoestrus*) olarak tanımlamıştır. Burada göz ve kulak enfestasyonları da söz konusudur. Bağırsaklarda fakültatif olarak bulunan larvaları aynı zamanda pseudomyiasis (yumurtalarını gıdalar üzerine bırakan Muscidae, Syrphidae, Phiophilidae) olarak tanımlamıştır. İnsan ve hayvanlarda ürogenital myiasis etkenlerinin ya idrarla atıldığını ya da vaginada bulunduklarını belirtmiştir. Myiasis etkenleri araştırıcılar tarafından tanımlanmış olsada, günümüzde larvaların görüldüğü yer ve araştırıcıya göre myiasis farklı isimlerle de (gastricole, cavicole, nasal gibi) ifade edilmektedir (Dinçer, 1997; Francesconi ve Lupi, 2012).

Entomolojik sınıflandırma, larvaların gösterdiği parazitizm derecesi önemlidir. Anatomik sınıflandırma pratik tanıda faydalı olsada, Patton (1922), evrimsel ve biyolojik ilişkileri dikkate alarak anatomik sınıflandırmayı yetersiz bulmuştur. Çünkü, tek bir tür birden fazla anatomik yerde bulunabilir veya aynı yerde farklı türler tarafından istila edilerek parazitizm şekillenebilir. Bu nedenle, Patton (1922) larvaların parazitizm seviyesine göre bir sistem geliştirmiştir. Buna göre, myiasis etkeni türleri iki ana gruba ayrılmıştır; (i) Sadece canlı konakta gelişen spesifik türler (*Hypoderma* spp., *Oestrus* spp., *Gasterophilus* spp.), (ii) dışkı ve çürüyen gıdalarla organik maddeler ve kadavrada gelişen, aynı zamanda da yumurta veya larvalarını canlı olarak konağa bırakan yarı spesifik türlerdir (*Lucilia* spp., *Sarcophaga* spp., *Calliphora* spp.). Zumpt (1965) ise myiasis etkenlerini, spesifik türler olbigatory (zorunlu) ve yarı spesifik olanları fakültatif (istemli) olarak kategorize etmiştir. Patton, yumurtaları veya larvaları konak tarafından sindirim sistemine alınmasını tesadüfi myiasis, Zumpt (1965) ise pesudomyiasis olarak isimlendirmiştir (Dinçer, 1997). Daha sonra Kettle (1992), sınıflandırmayı klinik yönden değerlendirerek fakültatif türleri kendi içinde myiasis'i başlatabilen primer türler, diğer türlerin neden olduğu myiasis'e sekonder veya tersiyer türler olarak gruplandırmıştır (Dinçer, 1997; Francesconi ve Lupi, 2012).

Günümüzde, veteriner hekimlik açısından önemli olan myiasis tanımı, bazı Diptera larvalarının yaşam sikluslarının en az bir periyodunda omurgalı hayvanların ve insanların canlı veya ölü dokuları, vücut sıvı maddeleri veya sindirilmiş gıdalarla ile beslenmesi sonucu meydana gelen patolojik bir durum olduğu ifade edilmektedir. Hypodermosis, *Hypoderm*a larvaları tarafından canlı konak derisinde meydana gelen tipik bir cuticole myiasis tipidir (Dinçer, 1997).

2.2 Sınıflandırma

Hypoderma cinsinin bilimsel taksonomisi "The Taxonomicon" ve "Systema Naturae 2000" güncel veritabanlarına göre aşağıda verilmiştir.

Class	Insecta
Order	Diptera
Family	Oestridae
Subfamily	Hypodermatinae
Genus	*Hypoderma*
Species	*Hypoderma bovis* Linnaeus, 1758 *Hypoderma tarandi* Linnaeus, 1758 *Hypoderma lineatum* Villers, 1789 *Hypoderma diana* Brauer, 1858 *Hypoderma actaeon* Brauer, 1858 *Hypoderma sinense* Pleske, 1926

Hypoderma cinsinde yer alan *H. bovis* ve *H. lineatum* türleri sığırlarda, *H. diana*, *H. actaeon*, *H. tarandi* ve *H. sinense* sırasıyla karaca, kızıl geyik, ren geyiği ve yakları enfeste eden veteriner öneme sahip olan türlerdir (Taylor ve ark., 2016).

2.3 Morfoloji ve Biyoloji

Dünyanın birçok ülkesinde hypodermosis'e yol açan türlerin biyolojileri üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Bu hastalığın biyolojisi üzerine ilk bilimsel çalışma 1700 yılında İtalya'da Vallisnieri tarafından gerçekleştirilmiştir (Zumpt, 1965; Hassan ve ark., 2010). *Hypoderma* cinsinde türler karmaşık bir yaşam siklusuna sahiptirler. Bu

sineklerin L1'leri endoparazit, L2 ve L3'leri ektoparazit, pupa ve erişkinleri ise serbest tabiatta gelişme safhaları geçiriler. Ergin sinekler güneşli havada, ortam sıcaklığının yükselmeğe başladığı "kuşluk vakti" olarak da tabir edilen zamanın başlarından itibaren sığırlara ataklarını başlatırlar, güneşin yükselmesiyle saldırının şiddettini arttırırlar ve ataklarını havanın serinlemesine kadar çoğunlukla ikindi vaktine kadar sürdürürler. Bu atakların süresi ikindi vaktine kadar da ulaşabilir. Enfestasyona maruz kalan sığırlar şuursuzca sağa sola gelişişi güzel koşuşurlar ve gizlenebilecekleri gölgelik bir yer ya da ayaklarını bacaklarına kadar sokabilecekleri bir su birikintisini ararlar. Erişkin sineklerin yumurtlaması için rüzgârsız hava ve 18°C'den daha yüksek sıcaklığa ihtiyaç duydukları bildirilmiştir. Bu tür hava koşulları yumurtlamanın başlaması için gereklidir. Bu koşullar yaşam döngüsünün devamlılığı ve gelişim aşamalarının oluşumunu etkiler (Khan ve ark., 2015).

2.3.1 Yumurta, Deri Penetrasyonu ve Larva Gelişimi

Hypoderma lineatum ve *H. bovis*'in yumurtlama davranışı ve kıl başına bırakılan yumurta sayısı arasında önemli bir fark vardır. *Hypoderma lineatum*'un yumurtaları 1 mm uzunluğundadır. *Hypoderma lineatum*, genellikle ayakta duran veya dinlenme halinde olan konağın alt gövde bölgesindeki tek bir kıl üzerine 3-10 veya daha fazla sıra halinde yumurtalarını sırayla bırakır. *Hypoderma bovis* yumurtaları 0,8 mm uzunluğundadır. *Hypoderma bovis* yumurtalarını konağın arka bacak ve topuk kılları üzerine teker teker bırakır (Nogge ve Staack, 1969; Pruett ve Kunz 1996; Hassan ve ark., 2010). *Hypoderma lineatum* ve *H. bovis* için aktif haldeki konağa bırakılan yumurtalar 3 ile 7 günlük bir inkübasyon süresinden sonra açılır ve yaklaşık 1 mm uzunluğundaki ilk instar larvaları kıl kökünе doğru ilerler. Bu esnada konak derisini delmek için proteolitik histoilitik enzimler salgılayarak kanca benzeri ağız parçaları ile deri veya kıl kökü foliküllerine nüfuz ederler. *Hypoderma* türlerinin proteolitik enzimatik sekresyonları HA, HB ve HC olmak üzere üç tiptir. Bu proteolitik enzimler larvanın kör bağırsağı tarafından salgılanır (Lecroisey ve ark., 1979). Konak derisine penetrasyon, yumurtadan çıktıktan 6 saat sonra larvalar tarafından tamamlanmış olur (López ve ark., 2005).

Yaşlı ve daha önce enfeste olmuş hayvanlarda, penetrasyon yerinde ödem ve iltihaplanma gözlemlenmiştir (Gingrich, 1982). *Hypoderma* ilk instarlarının çoğu,

konağa girdikten hemen sonra ölür. Göç eden larvalar esas olarak eozinofiller ve lenfositler ile infiltre edilen ödem ile çevrilidir. Larva sayısı ve göç süresi ödem derecesini etkiler. Bununla birlikte, yaşayan ilk instarlar fibroblastlar tarafından kapsüllenmezken, granülom yapısı sergileyen nodüllerde ölü larvalar bulunur. Larvalar, konak reaksiyonu ile sağlanan seröz eksüdatlar ile beslenir ve göç esnasında salgılanan proteolitik enzimler besinlerin hemolenf içine girişine yardım etmektedir (Scholl, 1993; Colwell, 2006). *Hypoderma bovis* ve *H. lineatum* ilk instarlarının izlemiş olduğu göç yolu farklılık göstermektedir. Konağın içine girdikten yaklaşık 4 ay sonra *H. bovis* torasik ve lumbar vertebral bölgelerde epidural yağa ulaşırken, *H. lineatum* özofagus submukozasına göç etmektedir. Larvalar dinlenme halinde oldukları yerde birikir ve burada ölen çok sayıda larvalar iltihaplanmaya sebebiyet vermesinden dolayı olumsuz reaksiyonlar şekillenebilir ve bu durumda insektisit tedavisi uygun değildir. Eğer ilaçlama yapılacak olursa, *Hypoderma lineatum*'da tipik semptomlar şişkinlik ve kusma iken, *H. bovis*'de geçici posterior felç ortaya çıkabilir (Scholl, 1993). Aynı zamanda, hypodermosis'in kontrolünde mevsimsel insektisit kullanımı dikkate alınması gereken önemli bir husustur (İnci, 2016). Sonbaharda göç halinde olan L1'ler ile ilkbaharda sırt derisi altında bulunan L2 ve L3'lere karşı ilaçlama yapılmalıdır. Sonbahar ilaçlamasına rağmen sırt derisi altına ulaşmayı başaran larvalara karşı ilkbaharda ikinci bir insektisit kullanımı gerekmektedir. Bununla birlikte *H. bovis* larvalarının canalis vertebraliste bulunduğu dönemde (bölgesel olarak farklılık gösterebilir, İç Anadolu için Kasım ayının başı ile Ocak ayının sonu arasındaki yaklaşık 3 aylık bir zaman dilimidir) insektisit kullanımı yapıldığı takdirde spinal kanalda ölen larvaların toksik etkileri hayvanlarda anafilaktik şok meydana gelebilmektedir (Dik, 1998; Boulard, 2002). Bu husus, çok önemli ve çok kritik olup sistemik ilaçlamada asla ihmal edilmemelidir.

Hypoderma bovis ve *H. lineatum*'un geç instarları yaklaşık 15 mm uzunluğunda olup dinlenme alanlarını terk ederler ve daha sonra bu larvalar konağın orta-sırt bölgesine doğru hareket eder. Burada L2 halini alırlar ve kendilerini derinin hemen altına yerleştirirler. Deride solunum delikleri açıp, ters dönerek stigmatlarını dayarlar ve solunum yapmaya başlarlar. Bu sırada her larva kendi etrafında bir kist oluşturur. Bu aşamada, şişlikle karakterize edilen nodülleri oluşturur. Bunlara halk arasında "nokra, okra, büvelek" denir. Larvaların yumurtadan konağın sırtına geliş süresi 8 ile 9 aydır (Zumpt, 1965; Scholl, 1993; Hassan ve ark., 2010). Larvalar, 30 ile 60 günde yaklaşık

30 mm uzunluğuna erişip L3 halini alır. L3'ler, tamamen küçük dikenlerle çevrelenmiş posterior spirakular plakanın incelenmesi ile diğer *Hypoderma* türlerinden ayırt edilebilir. *Hypoderma bovis*'te düğmeyi çevreleyen arka spiraküler plakanın dar bir huni benzeri kanala sahip olduğu, *H. lineatum*'da ise geniş bir kanal şeklinde olduğu ve bu yönüyle de iki türe ait larvaların göreceli olarak ayrımlarının yapılabileceği kaydedilmiştir (Wall ve Shearer, 2008; Hassan ve ark., 2010; Taylor ve ark., 2016).

2.3.2 Pupa Evresi

Nodüllerden çıkmadan önce L3'lerin rengi belirgin bir şekilde koyulaşır. Olgunlaşan larvalar deliklerden çıkar. İlkbahar başlarında, sabahın erken saatlerinde toprağa düşen hareketsiz larvalar, ot ve samanlar arasında kuytu yerlere saklanarak toprak altına (*H. lineatum* 3 cm, *H. bovis* ise 3,6 cm) doğru ilerler ve pupa dönemine girerler. Pupadan erişkin sineklere dönüşüm 2 ile 8 hafta sürer. Erişkinlerin pupadan çıkışı, türlere ve iklim koşullarına bağlı olarak çoğunlukla Mart ile Haziran'a kadar devam edebilir. Bu erişkinler daha sonra yaşam döngüsüne devam ederler (Zumpt, 1965). Ancak dünyanın farklı coğrafi bölgelerinde erişkin sineklerin pupal evreden çıkma dönemini etkileyen iklim değişiklikleri bildirilmiştir (Navarrette ve ark., 1993). İklim değişikliği, konak-parazit etkileşimin yapısını ve işlevini değiştirebilecek farklılıklara neden olabilir. Küresel ısınmanın artmasıyla yazların daha uzun olması halinde erişkin sinek sezonunun daha erken olması ve bunun sonucunda konağa yumurta bırakma süresinin uzayabileceği ifade edilmektedir. *Hypoderma* spp. için konak değişikliği gerçekleşmez; ancak *H. tarandi* prevalansının yüksek olduğu bölgelerde uzun süre kalan turistler için hastalığın insidansında artışa neden olabileceği bildirilmektedir. Aynı zamanda hareket halinde olan kişilerin daha fazla erişkin sineğe maruz kaldıklarını ve kuvvetli rüzgar, yağmur, 10-12 °C'den düşük sıcaklıkların erişkin sineğin uçuş aktivitesini ve yumurtlamasını engellediği düşünülmektedir (Kan ve ark., 2013). *Hypoderma* türlerinin, pupa ve erişkin sinek safhalarında iklim değişikliğine bağlı olarak yarı-kurak alanların nemli alanlara göre daha uygun olduğu bildirilmiştir (Saidani ve ark., 2016).

2.3.3 Erişkin

Erişkin dişi *H. bovis* yaklaşık 15 mm uzunluğundayken, *H. lineatum* yaklaşık 13 mm uzunluğundadır. Her ikisi de karakteristik açık ± koyu renk deseninde yoğun kıllarla kaplanmış arı görünümündedir. Her iki türde abdomenin ortasında geniş bir siyah kıl

bandı ile sarı-turuncu kıllar bulunur. *Hypoderma bovis*'in toraksı *H. lineatum*'dan daha kıllıdır. *Hypoderma bovis* toraksının baş ve ön kısmındaki tüyler yeşilimsi sarı iken *H. lineatum*'un sarımsı-beyaz renktedir. Her iki türün ağız parçaları küçük ve palplardan yoksundur. Ilık ve güneşli günlerde aktif olan *H. bovis* ve *H. lineatum* türlerinin erişkin biyolojisi benzerlik göstermektedir (Benakhla ve ark., 1993; Panadero ve ark., 2007a). Erişkin sinekler, ağız organlarının atrofiye olmasından dolayı beslenemez ve 5-15 km uçabilirler. Çiftleşmeden 20 dakika sonra dişiler yumurtlamaya hazır hale gelirler ve yumurtalarını bırakacak bir konak ararlar.

2.4 Prevelans

Bir bölgede *Hypoderma* kaynaklı myiasis prevalansının (WFI, Warble Fly Infestation) belirlenmesi için öncelikle tedavi ve eradike programlarınının planlanmasının gerekliliği vurgulanmaktadır (Vaillant ve ark., 1997). Sığır hypodermosis'i (WFI), Kuzey Yarımkürede 25°-60° N enlemleri arasında yer alan 55 ülkede rapor edilmiştir (Soulsby, 1982). Dünya genelinde, sığır hypodermosis'i prevalansında topografi, örnekleme mevsimi, nem, sıcaklık, yağış ve rüzgâr gibi çevresel koşullar ergin sinek gelişimi ve aktivite farklılıkları üzerine çeşitli çalışmalar yürütülmüştür (Tarry, 1980, Martínez-Moreno ve ark., 1996; Frangipane di Regalbono ve ark., 2003; Karatepe ve Karatepe, 2008; Saidani ve ark., 2016). Aynı zamanda konak spesifitesi, hayvan türü, tarım uygulamaları, ektoparaziter tedavi ve uygulanan teşhis prosedürleri (örneğin klinik-parazitolojik inceleme veya immünolojik testler) gibi diğer faktörlerin de hastalığın prevalans durumunu etkilediği bildirilmektedir (Panadero ve ark., 2007a). Akdeniz ülkelerindeki çevre koşulları bu sineklerin etkinliğini arttırmaktadır. Bin dokuz yüz altmış yılından bu yana sığır hypodermosis'i üzerine sayısız rapor yayınlanmıştır (Deiana ve Arru, 1960; Tagari ve Manehasa, 1973; Sayin ve Meric, 1976; Tassi ve Puccini, 1985; Kilani ve ark., 1986; Boulard ve ark., 1988; Sayın ve ark., 2000). Bunlardan bazıları Tablo 2.1'de sunulmuştur.

Tablo 2.1 Dünyada ve ülkemizde hypodermosis prevalansı ile ilgili çalışmalar

Ülke	Prevalans (%)	Tür	Referans
İspanya	15,3	*Hypoderma* spp.	Reina ve ark., 1994
	19,5-42,3	*H. bovis/H. lineatum*	Martínez-Moreno ve ark., 1996
	78,4	*Hypoderma* spp.	Panadero ve ark., 2000a
	79,0	*H. lineatum*	Panadero ve ark., 2007b
İtalya	23,0	*H. lineatum*	Deiana ve Arru, 1960
	85,0	*H. bovis/H. lineatum*	Frangipane di Regalbono ve ark., 2003
Yunanistan	37,4	*H. bovis/H. lineatum*	Papadopoulos ve ark., 1997
Arnavutluk	31,1	*H. lineatum*	Tagari ve Manehasa, 1973
	38,6-41,3	*H. bovis*	Otranto ve ark., 2005
Türkiye	56,0	*H. lineatum*	Kurtpınar, 1947
	67,0	*H. bovis/H. lineatum*	Sayin ve Meric, 1976
	20,0	*Hypoderma* spp.	Celep ve ark., 1994
	65,0	*Hypoderma* spp.	Taşçı ve ark., 1994
	3,6-10,2	*H. bovis/H. lineatum*	Gulanber ve ark., 2000
	86,0-14,0	*H. bovis/H. lineatum*	Sayin ve ark., 2000
	31,9	*H. bovis/H. lineatum*	Kara ve ark., 2005
	38,6	*Hypoderma* spp.	Özkutlu ve Sevgili, 2005
	5,1	*H. lineatum*	Karatepe ve Karatepe, 2008
	23,3	*Hypoderma* spp.	Simsek ve ark., 2008
	28,6	*H. bovis/H. lineatum*	Balkaya ve ark., 2010
	5,3-0,3	*H. bovis/H. lineatum*	Cicek ve ark., 2011
	35,2	*H. bovis*	Kaya, 2014
	36,6	*Hypoderma* spp.	Sayin Ipek ve Diker, 2016
	73,8	*Hypoderma* spp.	Taşcı ve ark., 2018
Cezayir	61,4	*H. bovis*	Benakhla ve ark., 1990
	70,0-90,0	*H. bovis/H. lineatum*	Benakhla ve ark., 1998
	76,0	*H. bovis/H. lineatum*	Benakhla ve ark., 1999
	1,6-3,6	*H. bovis/H. lineatum*	Saidani ve ark., 2011
	49,8	*H. bovis/H. lineatum*	Saidani ve ark., 2016
Fas	50,0-60,0	*Hypoderma* spp.	Sahibi ve ark., 1995
Tunus	63,0-37,0	*H. bovis/H. lineatum*	Kilani ve ark., 1986
Hindistan	50,0-90,0	*H. lineatum*	Soni ve Khan, 1945
Irak	23,0	*H. lineatum*	Abul-Hak, 1973
Almanya	30,0	*H. bovis*	Hennings, 1977
Pakistan	21,62	*H. bovis*	Shah ve ark., 1981
Kore	42,4	*H. bovis*	Jang ve ark., 1987
Çin	80,0	*Hypoderma* sp.	Yin ve ark., 2003
	98,0-100	*H. bovis/H. lineatum*	Otranto ve ark., 2004
Fransa	40,0	*H. bovis/H. lineatum*	Boulard ve ark., 1988
Hollanda	80,0	*H. bovis/H. lineatum*	Scholl, 1998
Polonya	25,0-100	*H. bovis/H. lineatum*	Cencek,1995
Kanada	8,0-73,3	*H. bovis*	Colwell, 2000
	76,5-99,0	*H. lineatum*	
Kazakistan	30,0	*H. bovis/H. lineatum*	Mukhtar ve Omarkhan, 2004
Özbekistan	45,0-50,0	*H. bovis/H. lineatum*	Rasulov ve ark., 2004
Moğolistan	40,0-100	*H. bovis/H. lineatum*	Yin ve ark., 2003

Dünyada, sığır hypodermosis'i prevalansı üzerine birçok çalışma yürütülmüştür. İtalya'da yapılan bir çalışmada %85, Kuzey İtalya'da yapılan başka bir çalışmada %43,3 oranında seropozitiflik belirlenmiştir (Santagada ve ark., 2001; Frangipane di Regalbono ve ark., 2003). İspanya'da, her iki *Hypoderma* türü de bir arada bulunur, ancak *H. lineatum* populasyonu *H. bovis*'e göre daha sık görülmektedir. İspanya'da yapılan çalışmalarda hypodermosis'in prevalansının %15,3 ile %79,0 arasında olduğu rapor edilmiştir (Reina ve ark., 1994; Martínez-Moreno ve ark., 1996; Panadero ve ark., 1998; Panadero ve ark., 2000a; Panadero ve ark., 2007b). Hindistan'da, sığır hypodermosis'inden sorumlu en yaygın tür *H. lineatum*'dur ve sığır hypodermosis'inin %50-90 aralığında olduğu bildirilmiştir. Ayrıca yılın büyük bir bölümünde, sığırların sırtında larvaların gözlemlendiği dönem de dahil olmak üzere *H. lineatum* özofageal larvalarının varlığını rapor etmişlerdir (Sen ve Fletcher, 1962; Kumar ve ark., 1990; Singh ve ark., 2001; Katoch ve ark., 2005; Wadhwa ve ark., 2005; Yadav ve ark., 2013). Pakistan'da, sığır hypodermosis'inden sorumlu baskın türün *H. lineatum* olduğu belirtilmektedir (Shah ve ark., 1981; Ayaz ve Khan, 1999; Ayaz ve Anwar, 2002; Khan ve ark., 2006).

Türkiye'de hem *H. lineatum*'un hem de *H. bovis*'in sığırlarda enfestasyona (1,9-68%) neden olduğu rapor edilmiştir (Zeybek, 1988; El-Metenawy ve Zayed, 1992; Sayın ve ark., 2000). Ancak, *H. bovis* prevalansının *H. lineatum*'dan daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Sayin ve Meric, 1976; Sayın ve ark., 2000; Ahmed ve ark., 2017). Sayın ve ark. (2000), Türkiye'nin tüm coğrafik bölgelerini kapsayan çalışmalarında, hypodermosis yaygınlığını Karadeniz'de %28,3, Marmara'da %8,0, Ege'de %41,6, Akdeniz'de %33,0, İç Anadolu'da %38,9, Doğu Anadolu'da %41,9 ve Güneydoğu Anadolu'da %47,8 olarak saptamışlardır.

Türkiye'de hypodermosis'in yaygınlığı üzerine yapılan çalışmalarda elde edilen prevalans oranları Tablo 2.1'de verilmiştir.

2.5 Klinik Belirtiler, Lezyonlar ve Ekonomik Kayıplar

Hayvanların sırt bölgesinde meydana gelen nodüllerin varlığı ile klinik olarak kendini gösteren sığır hypodermosis'i aynı zamanda furunkular subdermal myiasis olarak da bilinmektedir. Nodüller, larvaları ve nekrotik materyali içeren bir boşluk oluşturan lifli bağ dokusu tabakasından oluşur (Cabanelas ve ark., 2015). Bağ dokusundan geçen ilk

aşamadaki *H. lineatum* larvaları eozinofilik infiltrasyona sahip yeşil renkli, jelatinli, ödemli bölgeler oluşturur ve bu da "butcher's jelly" yani ette pelteleşme görünümüne neden olmaktadır. Ayrıca larvaların deride oluşturduğu irritasyon sonucu hayvanlarda ilgili bölgeyi sürtme davranışları ile yaralanma şekillenebilmekte, ayrıca abortlar ve süt veriminde azalmalara neden olduğu düşünülmektedir. Ancak söz konusu kayıpların boyutu detaylı olarak araştırılmamıştır (Scholl, 1993). Bunun yanında enfeste hayvanlarda et, süt ve deri değeri randımanındaki düşüşe bağlı ekonomik kayıplar birçok araştırmada rapor edilmiştir (Khan, 1977; Sayın ve ark., 2000; Khan ve ark., 2006; Cicek ve ark., 2011).

İnsan ve hayvan sağlığını tehdit eden paraziter hastalıkların meydana getirdiği ekonomik kayıplar küresel çapta şiddetini arttırarak ciddi boyutlara ulaşmış durumdadır. Bu durum paraziter hastalıklarla mücadele yöntemlerinin gelişmesine ve farklı stratejilerin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Günümüzde, hastalığın kontrolü ile teknik ve epidemiyolojik verilerin, insan-hayvan-ekosistem gibi çeşitli faktörlerin, sosyal, politikal ve ekonomik verilerin değerlendirilmesini ve açıklanmasını mümkün kılan çeşitli modelleme teknikleri kullanılmaktadır. Coğrafi Bilgi Sistemi (GIS), haritalama ve analiz için veritabanı oluşturan bilgisayarlı bir sistemdir. Son yıllarda, GIS uygulaması endemik hastalıkların haritalanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Mevcut epidemiyolojik bilgileri haritalamak, iklim ve çevresel faktörleri, hastalığın ortaya çıkış zamanı, insanlar ve diğer ilgili parametrelerle birlikte ilişkilendirmek için giderek daha fazla kullanılan bir yöntemdir. Bu gelişmiş analitik araç, yüksek riskli bölgelerden öncelikli alanlara kadar hastalıkların izlenmesi, tanımlanması ve sero-sürveyans uygulamalarına sahiptir. Epidemiyolojik ve çevresel verilerin görselleştirilmesi, mekansal analizi ve ekonomik tahminler için etkili bir yöntemdir (Çiçek ve ark., 2008; Can, 2009; Ahmed ve ark., 2016). Pakistan'da yapılan bir çalışmada hypodermosis'in küme analizini göstermek için GIS yöntemi kullanılmış, regresyon analizi Ocak, Şubat, Mart, Ağustos ve Kasım aylarındaki sıcaklığın, Eylül ve Ekim ayındaki yağışların hastalık üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Ahmed ve ark. 2012; Khan ve ark. 2015; Ahmed ve ark., 2016). Benzer şekilde, Belçika'da fazla sayıda sürünün ve daha yüksek günlük yağışların da önemli faktörler olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, daha düşük minimum sıcaklık hastalıklara karşı koruma sağlamaktadır (Haine ve ark., 2014). Hypodermosis'i farklı yöntemlerle ele alarak, ülke

ekonomisine ne kadar büyük maddi zararlar verdiği veya vereceği tahminlerle ortaya çıkartılabilir.

Hypodermosis'de ekonomik etkiler birbiriyle ilişkili olup direkt ve indirekt etkiler olarak kategorize edilebilir (Hassan ve ark., 2010). Direkt etkiler, erişkin sinek ve konaktaki larvaların aktivitesinden kaynaklanan hastalıkları, tedavi giderleri, kilo kayıpları ve süt üretimindeki azalmaları içerirken, indirekt etkiler ise göç halindeki ve sırt bölgesindeki larvaların aktivitelerinden kaynaklanmaktadır. Enfeste konakta göç eden larvalar hastalık maliyetinin büyük kısmından sorumludur (Tarry, 1986; Colwell, 1992; Hassan ve ark., 2010).

Sığır hypodermosis'inin coğrafik dağılımında köylerin topografyası çok önemli bir faktördür. Pakistan'da dağlık ve yarı dağlık alanlarda hastalığın dağılımının, düzlük alanlara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Dağlık ve yarı dağlık bölgelerde hypodermosis yoğunluğunun sebebi *Hypoderma* türlerinin yaşam döngüleri için uygun iklim koşullarının olması ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır (Ahmed ve ark. 2012). Sığır hypodermosis'inin epidemiyolojisini etkileyen önemli bir diğer faktör ise otlatma düzenidir. Merada otlatılan sığırların, ahır veya kapalı bir sistemde yetiştirilenlerden daha fazla sineğe maruz kalmaları söz konusudur. Bölgelerde *Hypoderma* larvalarının gelişim aşamalarını destekleyen çevresel koşullara (bağıl nem, rüzgar hızı) sahip su kütleleri vardır. Dolayısıyla coğrafik faktörler, köyler, topografi, otlatma düzeni ve su kütleleri, hypodermosis'in coğrafik dağılımı üzerinde önemli bir etkiye sahip olmasının yanı sıra ekonomik kayıplar üzerine de etkisi büyük ölçektedir (Ahmed ve ark., 2012).

Geçmişten günümüze birçok ülkede hypodermosis'in neden olduğu ekonomik kayıpların boyutları üzerine çalışılmıştır. Bu kayıpların, ABD'de 192-600 milyon Amerikan Doları (Khan, 1977; Drummond, 1981), Avusturya'da 100 milyon Şilin olduğu tahmin edilmiştir (Kutzer, 1984). İngiltere ve Danimarka gibi birçok ülkede hypodermosis'in kontrol altına alınması veya ortadan kaldırılması için resmi kampanyalar başlatılmıştır. Eradikasyon kampanyasının başlamasından önceki mali kayıpların İngiltere'de 13 milyon Paund olduğu ileri sürülmüştür (Colwell, 1992). Bu hastalık 1990'ların başlarında ortadan kaldırılmamış olsaydı, günümüzde en az 80 milyon Paund'luk bir kayıp yaşanacağı hesaplanmıştır. Sığır hypodermosis'in neden olduğu ekonomik kayıplar (deri, karkas, süt), Yunanistan'da yıllık 42 milyon Amerikan

Doları, İtalya'da yıllık 11,5 milyon Amerikan Doları (Macchioni, 1984) ve Kanada'da 14 milyon Amerikan Doları (Kelin 1980), Pakistan'da 22,8 milyon Amerikan Dolar olduğu rapor edilmiştir. Bu kayıplar, çiftçiler tarafından yüzyıllardır kabullenilmiş olup gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde çok uzun bir süre ciddi bir yük olmuştur. Hypodermosis kontrolün zor olduğu Kuzey Afrika, Doğu Avrupa ve Çin'in birçok bölgesinde halen devam etmektedir (Hassan ve ark., 2010). Sineklerin yaygın olduğu ülkelerde bu nedenle her yıl milyarlarca zarar meydana gelmektedir. Hypodermosis, karkas kalitesini düşürmekle birlikte en önemli zararı sırt derisindeki larvalar tarafından derinin delinmesi sonucu dericilik endüstrisine verdiği kayıplardır (Dinçer, 1997; Ahmed ve ark., 2012). Türkiye'de hypodermosis'in ekonomik kaybı üzerine rapor edilen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Cicek ve ark. (2011), Afyonkarahisar'da 3.048 enfeste hayvanın derisinde meydana getirdiği yıllık tahmini ekonomik zararın yaklaşık 18.288 Türk Lirası (TL) (12.192 Amerikan Doları), Sayin Ipek ve Diker (2016), Diyarbakır'da 9.210 hayvanda 101.310 TL (47.563 Amerikan Doları) ve Taşcı ve ark. (2018), Kars'da 1.114 enfeste hayvanda 18.615 TL (yaklaşık 5.170 Amerikan Doları) ve Kars platosundaki toplam 132.419 sığır populasyonundaki tahmini ekonomik zararın 407.507 TL (113,000 Amerikan Doları) olduğunu rapor etmişlerdir.

Hypodermosis süt üretimini (%10-15) ve kilo alımını (%20) azaltarak ve deri endüstrisini (deri üzerindeki 10'dan fazla larvanın varlığı %50 devalüasyonu temsil eder) etkileyerek ekonomik kayıplara sebebiyet vermektedir (Saidani ve ark., 2014). Hayvancılık sektörünü ciddi bir şekilde etkileyen hypodermosis ile ilgili rapor edilen çalışmalarda, özellikle deri endüstrisindeki ekonomik kayıplar değerlendirilmiştir (Khan ve ark., 2006; Cicek ve ark., 2011; Sayin Ipek ve Diker, 2016; Taşcı ve ark. 2018).

Türkiye İstatistik Kurumu'na (TÜİK) göre, 2019 yılı büyükbaş hayvanlar arasında yer alan sığır sayısı %3,8 artarak 17 milyon 688 bin baş, toplam süt üretimi bir önceki yıla göre %3,8 artarak 22 milyon 960 bin tona yükselmiştir. Süt üretiminin %90,5'inin inek sütünün olduğu açıklanmıştır. TÜİK, 2019 yılı "canlı hayvan ve hayvansal ürün fiyatları, üretim değeri" istatistiklerine göre, kültür sığır fiyatı %3,25 azalarak 7 bin 108 TL, melez sığır fiyatı ise %0,61 artışla 6 bin 37 TL, inek sütünün kg fiyatı %20,87 artarak 1,78 TL, sığır eti kg fiyatı %8,90 yükselerek 31,32 TL olarak hesaplanmıştır (TÜİK, 2019). Ticaret Bakanlığının 2019 yılı deri ve deri mamulleri sektörü raporuna göre, deri ihracatı %2,6 oranında artarak 1,63 milyar Amerikan Doları, ithalatı ise

%19,2'lik bir azalışla 951,6 milyon Amerikan Doları olarak kaydedilmiştir. Deri sektörü her yıl 6-6,5 milyon adet büyükbaş hayvan ham derisine ihtiyaç duymaktadır. Kilo başına ortalama bir sığır deri fiyatı 4.50-5.50 TL'dir (T.C. Ticaret Bakanlığı, 2020). Dolayısıyla bu alandaki ekonomik büyüklük yaklaşık 3,5 milyar TL (5 milyon Amerikan Doları)'dir.

Bu verilere göre, Tablo 2.1'de yer alan Türkiye'deki hypodermosis prevalans oranları dikkate alınarak günümüzdeki oran interpolasyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu oran ve güncel hayvan sayısı baza alınarak gelecek tahmini ekonomik kayıplar değerlendirilmiştir.

Tablo 2.2 Matematiksel modellemede kullanılan veriler

	Değer	**Açıklama**	**Referans**
Prevalans	%33,60	1976-2018 ortalama prevalans değeri	Tablo 2.1
Hayvan sayısı	17.688.000	2019 yılı toplam sığır sayısı	TÜİK, 2019
Enfeste sayısı	5.900.959,71	2019 yılı tahmini enfeste hayvan sayısı	-
Deri	10,67 TL	Türkiye'de yapılmış çalışmalardan elde edilen ortalama sığır başına deri kaybı	Cicek ve ark., 2011; Sayin Ipek ve Diker, 2016; Taşcı ve ark. 2018
Süt	%12,50	Hastalığa sahip hayvandaki süt verim kaybı oranı	Saidani ve ark., 2014
Hayvan başına yıllık süt üretimi	22.140.195,60 (ton)	2019 yılı toplam inek süt verimi	TÜİK, 2019
Et	%20,00	Hastalığa sahip hayvandaki et verim kaybı oranı	Saidani ve ark., 2014
Hayvan başına ağırlık	293,00 (kg)	2019 yılı kesilen hayvan sayısı ve elde edilen et miktarına göre	TÜİK, 2019
Dolar	5,17	2019 yılı ortalaması	Merkez bankası

Rapor edilen çalışmaların hayvan başına hesaplanan hypodermosis'li deri fiyatlarının ortalaması ile 2019 yılı tahmini enfeste hayvan sayısı çarpılarak hesaplanmıştır. Denklem (1)'de Tahmini deri kaybı (TDK_{2019}), Tahmini enfeste sığır sayısı ($TESS_{2019}$), Ortalama deri zararı (ODZ) olmak üzere;

TDK_{2019} = TESS * ODZ (1)

= 5.900.959,71 * 10,67 TL

=62.943.570,19 TL (12.174.771,80 Amerikan Doları)

TESS ile süt verimindeki kayıp oranı çarpılarak yıllık süt kaybı hesaplanmıştır. Bu süt kaybı 2019 yılı ortalama süt fiyatı ile çarpılarak süt endüstrisine verdiği zarar hesaplanmıştır. Denklem (2)'de Süt verimliliği kaybı (SVK_{2019}), TESS, Ortalama yıllık sığır süt üretimi ($SSÜ_{2019}$), süt verimindeki ortalam kayıp oranı (SVOKO), yıllık süt birim fiyatı (SBF_{2019}) olmak üzere;

SVK_{2019} =TESS * $SSÜ_{2019}$ * SVOKO * SBF_{2019} (2)

=5.900.959,71 * 1175,70 * 0,125 * 1,78 TL

= 1.543.651.435,11 TL (298.578.614,14 Amerikan Doları)

2019 yılına sığırlardan üretilen etin hayvan başına kg'ı belirlenerek tahmini hasta hayvan sayısı ve etteki verim kaybı ile çarpılıp et endüstrisinin tahmini kaybı hesaplanmıştır. Bu et miktarı 2019 yılı TÜİK sığır eti birim fiyatı ile çarpılarak et endüstrisine verdiği zarar hesaplanmıştır. Denklem (3)'de 2019 yılı et verim kaybı (EVK_{2019}), birim sığır et üretimi (ortalama karkas ağırlığı) (BSEÜ), tahmini kesilen enfeste sığır sayısı ($TKEHS_{2019}$), et verimindeki kayıp oranı (EVKO), yıllık et birim fiyatı (EBF_{2019}) olmak üzere;

EVK_{2019} =BSEÜ* $TKEHS_{2019}$* EVKO* EBF_{2019} (3)

=293,00 * 1143011,72 * 0,20 * 31,32 TL

=2.097.804.306,66 TL (405.764.856,22 Amerikan Doları)

Yukarıdaki verileri dikkate alarak bu hastalıktan dolayı 2019 yılında sığır hypodermosis'inin Türkiye ekonomisine toplam verdiği tahmini zarar hesaplanmıştır. Denklem (4)'de toplam tahmini ekonomik zarar ($TTEZ_{2019}$) olmak üzere;

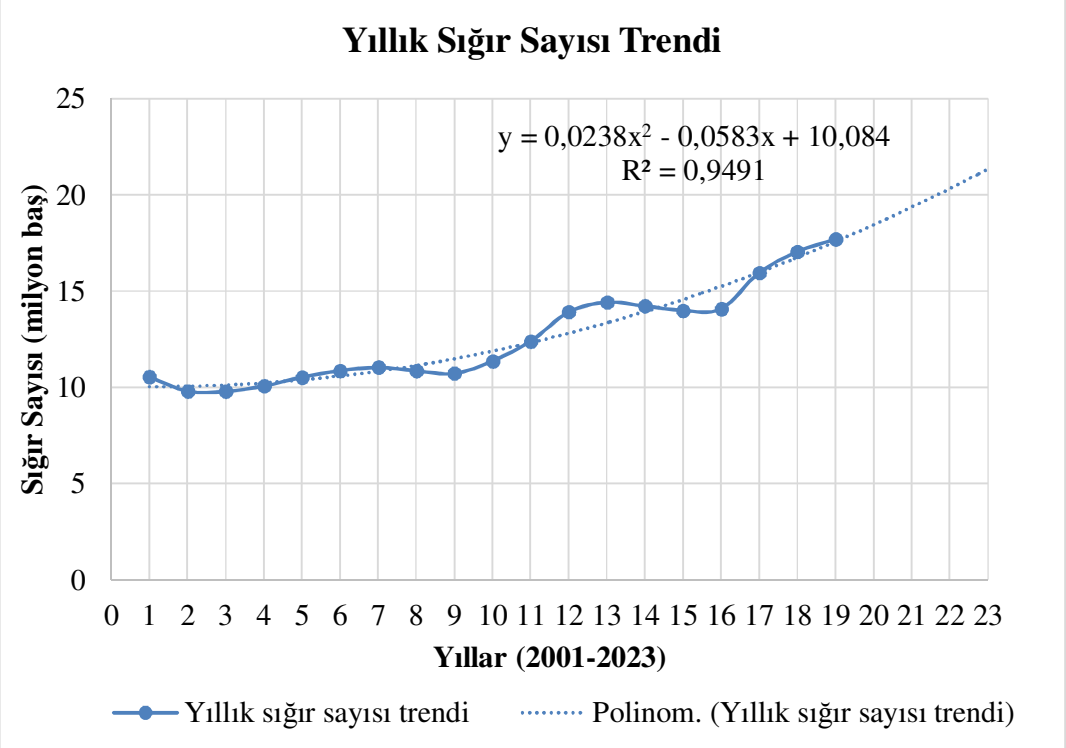
$TTEZ_{2019}$ $= TDK_{2019} + SVK_{2019} + EVK_{2019}$ (4)

$=62.943.570,19 + 1.543.651.435,11 + 2.097.804.306,66$

$=3.704.399.311,96$ TL (716.518.242,16 Amerikan Doları)

Aşağıdaki grafikte toplam sığır sayılarını 2001-2019 yılları arasındaki TÜİK verileri kullanılarak trend oluşturulmuştur. Trend denkleminde yer alan y hayvan sayısını, x ise yılı ifade etmektedir. Denklem (5)'deki ifadenin R^2 değeri (benzerlik katsayısı) 0,9491 olarak trend ile yüksek bir uyumluluk göstermiştir. Bu denkleme göre elde edilen 2023 tahmini hayvan sayısı, yukarıdaki denklemler (1, 2, 3, 4) kullanılarak hypodermosis'in 2023 Türkiye ekonomisine yansıyacağı ekonomik kayıp 4.955.512.572,79 TL (958.513.070,17 Amerikan Doları) olarak tahmin edilmektedir.

$(y_{\text{Sığır Sayısı}})$ $=0,0238 * x_{yıl}^{2} - 0,0583 * x_{yıl} + 10,084$ (5)



Deri sektörü, 1970'lerden beri Türkiye ekonomisinde giderek önemi artan bir yere gelmiştir. Deri sektörünün en önemli hammaddesi hayvancılıktır ve bu sektörün gelişimi ve ekonomiye katkısının devamlılığı, hayvancılık sektörünün gelişmişlik düzeyine bağlıdır. Deri işleme sanayisinin ana maddesini teşkil eden ham deri, mezbahalarda ve diğer kesim kaynaklarından elde edilen derilerin kullanma şekillerine göre sınıflandırılmaktadır. Deri; saraciye, ayakkabı, döşeme, giyim, ilaç sanayi, aksesuar, dekor, süsleme, ısınma, sanat gibi pek çok alanda kullanılan bir materyale dönüşmüştür. Ülkenin ham deri talebi ve ithalatın getireceği yük göz önüne alınarak, mevcut hayvan popülasyonun arttırılmasının, ıslahı, refahı, hastalıklarla mücadele yöntemleri, kesim, yüzme ve muhafaza hatalarının asgari düzeye indirilme işlemleri gerek et üretimi gerekse ham deri üretimi açısından birlikte ele alınması gereken hususlardır. Üretilen ham derinin işlenmesi ve eşya haline dönüştürülmesi geniş bir istihdam sahası ve katma değer sağlamakta, deri mamullerinin ihracatı ile de önemli bir döviz kaynağı oluşturmaktadır (Uysal, 2002).

Türkiye'deki hayvan varlığının kalitesinin arttırılması deri sektörüne de büyük çapta katma değer sağlanması anlamına gelmektedir. Bu noktada özellikle sağlıklı ham deri tedarik sürecinde mezbahaneler ve kombinalar gibi işletmeler büyük öneme sahiptir. Kesim işleminin kontrolü, hijyenik sağlıklı koşulların oluşturulması ve sorumlu kişilerin yetkisinde kesimlerin gerçekleştirilmesi mali açıdan hayvancılık endüstrisinde son derece önem arz bir unsurdur. Türkiye'de 1999 yılında deri ve hayvancılık sektörü üzerine yapılan bir çalışmada (Uysal, 1999), 1970-1997 arası 27 yıllık zaman serisi analizinde ARIMA metodu (AutoRegresif-Integrated-Moving Avarages) kullanılarak gelecek 10 yıllık dönem için tahmin değerleri hesaplanmıştır. Bu tahminler doğrultusunda, 2000'li yıllarda büyükbaş ve küçükbaş hayvan sayısında azalmaların devam edeceği, deri sanayinin ihtiyacı olan ham deri üretiminin düşeceği ve deri sektöründe ham deri ithalatının artacağı tahmin edilmiştir.

2.6 İmmünite

Artropod enfestasyonlarında, konakta belli bir immünite gelişmektedir. İmmünitenin şekli ve derecesi konağın türü, yaşı, cinsiyeti, ırkı, refahı, parazitin türü, biyolojisi, oluşan enfestasyonun durumu ve çevresel etmenler gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Enfestasyonda konak çeşitli savunma mekanizmalarından

yararlanmaktadır. Bunlardan biri deridir. Deri birçok parazitin konak içerisine girmesinde bariyer olarak görev alır (Kar ve ark., 2007; Özer ve Şaki, 2007; İnci ve ark., 2016). Cuticole immünitesi de denilen deri immünitesi, Langerhans dogması olarak da tanımlanmaktadır. Deri immün sisteminde; granülositler, mast hücreleri, T-lenfositleri ve dentritik hücre grubundan Langerhans hücreleri gibi göç eden hücreler ile vasküler endotel hücreler, deri fibroblastlar, keratinositler gibi kalıcı hücreler yer alır. Keratinositler, epidermisin bütünlüğünü sağlamada ve yapısal korunmasında rol oynamaktadır. Epidermal Langerhans hücreleri ise beyaz kan hücreleri gibi kemik iliğinden köken alır, deri bariyerinde immün koruyucu olarak stratejik öneme sahiptir (Chomiczewska ve ark., 2009; West ve Bennett). Deriden geçen parazite karşı konağın kullandığı bir diğer savunma aracı yangıdır. Yangı ile deride sıcaklık artışı, ağrı, şişlik ve kızarıklık meydana gelir. Bununla birlikte enfeste alanda kan miktarının artmasıyla damar içerisindeki yangı elemanlarının dokuya geçişi kolaylaşmaktadır. Parazitin beslenmesiyle birlikte hücrelerden salınan ATP, trombositler ve mast hücrelerinden salınan serotonin ve histamin, nötrofillerden salınan Interleukin 1 (IL1) ağrıyı uyarıcı faktörlerdir. Artropodaya karşı gelişen ilk reaksiyonlardan biri de kan emmenin engellenmesi amacıyla oluşturulan hemostazistir. Ektoparazitin kan emmesini engellemek amacıyla gerçekleşen reaksiyonları takiben ilk olarak nötrofiller ve makrofajlar ilgili dokuya ulaşır. Monositlerden, makrofajlardan ve endotelden salınan IL8'de immun sistem elemanlarının aktivasyonunda görev alır. Kan emen artropodlara karşı konakta üç spesifik immun yanıt oluşur: (i) artropodların tükürük salgısında bulunan antijenlerin derideki kollagene bağlanması ile immüniteyi uyarması ve Th1 yanıtının şekillenmesi; (ii) tükürük antijenleri epidermal Langerhans hücrelerine bağlanarak deride bazofil aşırı duyarlılığı, IgG üretimi ile ilgili Th1 immun cevabı ve bazofil infilitrasyonuna yol açması; (iii) IgE üretimine ve tip1 aşırı duyarlılığa yol açan Th2 cevabıdır. Bu yanıt, deride ağrı veya kaşıntıya yol açan şiddetli lokal yangıya neden olur. Bu üç tip yanıtın her biri, deride değişikliğe neden olabilir ve bu yolla artropodanın beslenmesini bozarak konağın cazip besin kaynağı olmasını azaltabilir. Reaksiyonlar sonucu oluşan yanıt tipleri konağa, parazite ve enfestasyon şekline bağlı olarak, tek başlarına veya birlikte görülebilir ve hatta konakta herhangi bir reaksiyonun olmama ihtimali de vardır. Parazitlere karşı konaklarda pek çok IgG alt sınıflarının oluşumu söz konusudur. Tekrarlı enfestasyonlarda vücut hücresel ve humoral immüniteyi ortaya koyabilmektedir. Bu reaksiyonlara Th1 eşlik eder ve bu olay IFN-γ,

IL2 ve IL12 üretimi ile ilişkilidir (Kar ve ark., 2007; Özer ve Şaki, 2007; İnci ve ark., 2016).

Kan emmeyen artropod parazitlere karşı konakta gelişen immun yanıt kan emen artropodlara karşı oluşan immün yanıtın farklı olup ayrı bir önem arz etmektedir. Konakta önemli immünolojik reaksiyonlara sebebiyet veren bir başka parazitlik şekli ise larva aracılı myiasis'tir. Myiasis etkeni larvalara karşı konağın immun yanıtı; hayvanın sağlığı, larvaların biyolojisi, bulundukları yer, doğal antijenler ve larvaya karşı gelişen spesifik mekanizmalarla ilişkilidir. Larvalar göç geçirme süresince, konağın spesifik ve spesifik olmayan immün yanıtıyla başa çıkabilecekbiyolojik, fizyolojik ve biyokimyasal stratejiler geliştirirler. Parazitler yaşam döngülerini idame ettirebilmeleri için konakta spesifik adaptasyonlar oluştururlar (Otranto, 2001a; Kar ve ark., 2007; Özer ve Şaki, 2007).

Hypoderma spp. larvaları doku istilacı parazitler olarak bilinir ve bu larvalar konak dokusunda yaklaşık 9-10 ay göç geçirerek sürekli konağın immün efektör mekanizmalarına maruz kalırlar (Otranto, 2001). *Hypoderma* spp. larvaları gelişimlerini tamamlamak ve hayatta kalmak için kritik öneme sahip üç aşamayı gerçekleştirmelidir. Bunlar: (i) yeni yumurtadan çıkmış ilk instarların (L1) deriden penetrasyonu; (ii) L1'in konak dokusunda göçü; (iii) L2 ve L3'e dönüşümün şekilleneceği ve "warble" olarak nitelenen granülomatöz reaksiyonun indükleneceği sırt bölgesindeki subkütanöz dokuya ulaşımıdır. *Hypoderma* larva antijenlerine tekraren maruz kalmaları ile sığırların direnç kazandığı bilinmektedir (Gingrich, 1980; Gingrich, 1982). Bu direnç, konağın yaşına ve larva sayısına bağlı olarak, larva popülasyonlarını kontrol etmek için önemli bir faktör olarak nitelenmektedir (Baron ve Weintraub, 1987). Bununla birlikte, sığırlarda *Hypoderma* enfestasyonlarına karşı immun-koruma mekanizmaları hakkında halen yeterli bilgi bulunmamaktadır.

İlk instarlar, ekstrakorporeal sindirim için çevre dokulara salgılanan yaklaşık 24 kDa büyüklüğünde serin proteazlar olarak bilinen üç sindirim enzimi üretmektedirler (Lecroisey ve ark., 1979). Hypodermin A (HA), hypodermin B (HB) ve hypodermin C (HC) olarak adlandırılan bu proteazlara karşı konakta spesifik antikorların oluştuğu gösterilmiş ve immünojenik oldukları ortaya çıkarılmıştır (Pruett ve ark., 1988). Bu parazite karşı hümoral immün yanıt, larvanın konak sırtında ilk kez belirdiğinde en

yüksek seviyeye ulaşan, akabinde larvaların olgunlaşmasıyla birlikte azalan serum IgG seviyelerindeki yükselmelerle karakterize edilmektedir (Sinclair ve Wassall, 1983; Boulard, 1985). Bununla birlikte, dolaşımdaki antikor seviyeleri ile olgun larva sayısı arasındaki korelasyon eksikliği (Pruett ve Barrett, 1985), hücre aracılı immün mekanizmaların enfestasyona direnç için daha önemli olduğunu göstermektedir (Yadav ve ark., 2017).

Panadero ve ark. (2009), *H. lineatum*'un ilk instarları tarafından salgılanan proteazların (hypoderminler) yüksek oranda immünojenik olduklarını ve parazitlerin hayatta kalmasında konak reaksiyonunu modüle etme eğilimi göstermektedirler. Sonuç olarak, larvaların canlılığını devam ettirmesi, immun yanıtların zararlı etkilerinden kaçınmak için bağışıklık sisteminin modülasyonuna bağlıdır. Gingrich (1980) ve Colwell (2001) de dahil olmak üzere bazı araştırıcılar, immun yanıtın parazitin yaşam döngüsünün ilk evrelerinde başladığını, çoğu larvaların konağa girdikten kısa bir süre sonra öldüğünü ve tüm bunların konak immun yanıtının vücuda giren L1'ler tarafından aktive edildiğini rapor etmişlerdir. Bununla birlikte, enfestasyonun ileri evrelerinde direnç mekanizmalarının daha belirgin hale geldiğine dair kanıtlar da vardır. Bu da bağışıklık kazanmış hayvanlarda larvaların sırt bölgesinde ilk kez tespit edilmelerini takiben önemli miktarda larva ölümünün olabileceği fikrini desteklemektedir (Pruett ve Kunz, 1996; Panadero ve ark., 2013). Enfestasyonun geç evrelerindeki baskın Th2 yanıtının, yüksek seviyelerde IgG1 ve Interleukin 4 (IL4) (Vázquez ve ark., 2012) ile karakterize olduğu ve larva yıkımdan sorumlu olabileceği belirtilmektedir (Yadav ve ark., 2017).

Deneysel olarak *H. lineatum* ile enfeste olmuş sığırlarda enfestasyonun ilk evrelerinde Th0 yanıtını gösteren sitokin yanıt ve lenfosit altgruplarını içeren hücresel bağışıklığın oluştuğu rapor edilmiştir (López ve ark., 2005; Dacal ve ark., 2009; Dacal ve ark., 2011). Humoral yanıtın önemli bir modülatörü olan IL4'ün artmasının yanı sıra yeniden enfeste olmuş hayvanlarda enfestasyondan 6 saat sonra yüksek plazma hücreleri ve eozinofillerin varlığı rapor edilmiştir. Larva penetrasyonu sırasında IL10'un ana rolü, konağın bağışıklık yanıtını inhibe etmek ve larva göçünü desteklemektir. Yeniden enfeste olmuş hayvanlarda, IL10 yükselmesinin birincil enfeste hayvanlara göre daha yavaş olduğu ve sonuç olarak enflamatuar yanıt ve doku lezyonlarının ikincisinde daha yoğun olarak meydana geldiği bildirilmiştir. TCD4+ hücrelerinin primer enfeste hayvanlarda baskın popülasyon olduğu bilinmekle birlikte, B lenfositleri

yeniden enfeste olan hayvanlarda daha sıktır ve bu da baskın olarak humoral bir yanıt oluşturduğunu göstermektedir (Yadav ve ark., 2017).

Vázquez ve ark. (2012), tarafından *H. lineatum* ile doğal enfestasyon sürecinde olan sığırlarda hücresel ve humoral dinamikler araştırılmıştır. Araştırıcılar, larva penetrasyonu ve larva göçü sırasında sabit kalan interferon (IFN)-γ düzeylerinde bir düşüşün meydana geldiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, L1 konağın sırtına ulaşmadan hemen önce IL4 düzeylerinde önemli bir azalma gözlenmiştir. Bu sitokin seviyesinin, larvanın meydana getirdiği şişlik görünür hale gelmeye başladığında arttığı görülmüştür. Bu modeller, IgG2 yüksekliği ile karakterize erken enfestasyon sırasında bir Th1 yanıtı olduğunu göstermektedir. Buna karşılık, larva göçü sırasında IL4 ve IgGl düzeylerinin yükselmesiyle, bir Th2 yanıtı meydana gelmiştir.

Serolojik testler, çeşitli hastalık etkenlerinin teşhisinde kullanılan yöntemlerden biridir. Humoral yanıtın serolojik analizi, aşı etkinliğinde önemli olup aynı zamanda ana taşıyıcısı olan antijen-antikor ilişkilerinin tanımlanmasında immüno-epidemiyolojik çalışmalarda hastalığın biyobelirteçleri olarak kullanılabilir. Antijen-antikor bağlanma reaksiyonları, anahtar kilit prensibine dayalı oldukça spesifik bir şekilde meydana gelir. Bu nedenle, spesifik antikorların kullanımı patojene ait spesifik antijenlerin saptanmasını ve sonuç olarak patojenlerin doğrudan saptanmasını sağlar. Özel olarak edinilmiş humoral bağışıklık, esasen immünoglobulinler veya antikorlar tarafından taşınır. Sentez, antijen temasından sonra klonal olarak büyüyen B lenfositlerinden üretilen plazma hücrelerinde meydana gelir. Plazma hücreleri, antikorların monoklonal, sınıfa ve antijene özgü üretiminden sorumludur. Antijenlere karşı bağışıklık yanıtı birincil ve ikincil yanıt olarak kategorize edilir. Vücudun antijene karşı birincil bağışıklık yanıtı ilk karşılaşıldığında ortaya çıkar. Antijenin doğasına ve giriş yerine bağlı olarak, bu yanıtın çözülmesi 14 güne kadar sürebilir ve indükleyici antijen için yüksek özgüllüğe sahip bellek hücrelerinin üretilmesine yol açar. T hücreleri yardımıyla B hücrelerinin aracılık ettiği humoral yanıt, yüksek afinite ve antijene spesifik antikorlar üretir. İkincil bağışıklık yanıtı aynı antijene maruz kaldığında ortaya çıkar ve bellek hücreleri hızla aktive olup anitkor üretmeye başlar. Bu durum, birincil yanıttan daha hızlı ve daha etkili olur. İmmünoglobulinlerin yapısı sabit prensipleri takip eder. Tüm antikor sınıfları (IgG, IgA, IgM, IgD ve IgE) iki aynı ağır zincirden ve iki aynı hafif zincirden oluşur. Bu zincirler disülfid bağları ile bağlanır. Hafif ve ağır zincirler ayrı

ayrı sırasıyla iki ve beş varyete bulunur. Bunlar antikor sınıfını belirler. Sabit bir bölgeden ve değişken bir bölgeden oluşurlar. Moleküler düzeyde, hafif ve ağır zincirlerin değişken bölgesi, ilgili antijenlerin immünolojik olarak tanınan epitopları için spesifik bağlanma yerleri ile donatılmıştır (Wellinghausen ve ark., 2018). IgM tipik olarak erken bağışıklık yanıtının taşıyıcısı, IgG ise geç bağışıklık yanıtının veya ikincil yanıtın taşıyıcısıdır. İmmünoglobulin sınıfları IgD ve IgE, B hücreleri veya mast hücreleri, eozinofiller ve bazofiller üzerinde membran reseptörleri olarak işlev görür. IgA, hem monomerik hem de dimerik formlarda bulunan bir salgı antikorudur. Mukozal sekresyonlarda ve vücut sıvılarında humoral bağışıklığın ana taşıyıcısıdır. Sağlıklı bireylerin serumunda IgG, toplam immünoglobulin miktarının %70-75'ini oluşturur. İkincil bağışıklık yanıtının taşıyıcısı olarak, koruyucu fonksiyonu açısından en önemli antikordur. Teşhis açısından nadiren ilgili olsa da IgG, farklı görevleri yerine getiren çeşitli alt sınıflara (IgG 1-4) ayrılabilir. Bulaşıcı hastalıkların serolojik tanısıda, bu alt sınıflar kompleman aktivasyonu ve serumdaki oransal dağılımları açısından özel bir rol oynamaktadır (Wellinghausen ve ark., 2018). Patojene özgü IgG antikorlarının saptanması ve bunların bağışıklıktaki varlığı veya yokluğu açısından niceliksel değerlendirmesi, özellikle uluslararası referans preparatlarıyla karşılatırılmış standart bir formda izin verilebilir veya mümkündür (örn. tetanoz veya difteri bağışıklığı durumunda aşılama başarısızlığının belirlenmesi). Diğer taraftan, aşılamadan sonra spesifik IgG antikor titrelerine ek olarak, belirli bir IgM veya IgA yanıtın geçici olarak meydana gelebileceği (örn. boğmaca serolojisinde) ve bu da bireysel durumlarda olası birincil enfeksiyonun veya yeniden enfeksiyonun değerlendirmesini önemli ölçüde zorlaştırabileceğine dikkat edilmelidir. Vakaların büyük çoğunluğunda, ek serolojik enfeksiyöz hastalık testi bulgularını ve özellikle yorumlamak için klinik bilgi veya ilgili hekimle bulgular hakkında bir tartışma gereklidir. Serolojik bulaşıcı hastalık testi bulgularını ve özellikle bireysel serumların anlamlı sonuçlarını yorumlamak için de ek klinik bilgiler veya ilgili hekimle bulgular üzerine bir tartışma gereklidir. Mümkün olduğunda, enfeksiyon sırasında bulgularda önemli değişiklikler yaparak enfeksiyon noktasının daha kesin bir karakterizasyonu ve oluşumunu sağlamak için ilerleme izlenmelidir. Bu ayrıca birincil enfeksiyon ve tekrarlanan enfeksiyonlar hakkında yorumların yapılmasına izin verir (Wellinghausen ve ark., 2018).

2.7 Teşhis

Hypodermosis ile ilişkili ekonomik kayıpları önlemek için erken ve güvenilir tanı teknikleri gerekmektedir. Bu durum sistematik bir tedavi için gerekli olan L1'lerin göç fazının başlangıcında saptanabilmesi ve buna ilaveten parazit tarafından konak dokularına verilecek zararın engellenmesi çerçevesinde hypodermosis'in eradike edilmesi için oldukça önem arz etmektedir (Yadav ve ark., 2017). Canlı hayvanlarda teşhis, ilkbahar ve yaz aylarında enfeste hayvanların sırtı üzerinde şişliklerde bulunan L2 ve L3 instarların gözlenmesi veya palpe edilmesine dayanmaktadır. Ancak, yaşam döngüsünün ileri safhalarında bu tanı yöntemi zahmetli ve göreceli olarak duyarsız olabilmektedir. Nitekim eğer hayvanlar larvaların çıkış periyodu boyunca muntazam olarak kontrol edilmez ise enfestasyonlar gözden kaçırılabilmektedir (Argente ve ark., 1996). *Hypoderma lineatum*'un ilk instarları, kesilmiş sığırların özofageal submukozolarında bulundukları birkaç ay boyunca kolayca gözlenebilmektedir (Yadav ve ark., 2017).

Konak dokusunda göç geçirme sırasında, L1'lerin farklı serolojik testlerle saptanabilen antikorların üretimini indükleyen üç adet serin proteinaz (HA, HB ve HC) salgıladıkları bilinmektedir. Son 30 yılda, klinik parazitolojik incelemeye alternatif olarak çeşitli testler geliştirilmiştir. Serolojinin en erken kullanılan yöntemleri pasif hemaglutinasyon (Boulard, 1970), jel difüzyonu (Boulard ve Weintraub, 1973), immünoelektroforez (Boulard ve Petithory, 1977) ve ELISA (Baldelli ve ark., 1981) tabanlı saptama yöntemleridir. İndirekt ELISA tekniği, birçok ülkede hypodermosis enfestasyonun serosürveyansı için kullanılmış olup ayrıca bazı ülkelerde eradikasyon programlarına katkı sağladığı bilinmektedir (O'Brien, 1998). Ancak, bu yöntemlerle ilgili temel sorun, tüm olgun larvalar konaktan ayrıldıktan veya tedavi ile öldürüldükten sonra bile konakta spesifik antikorların kalması durumudur (Sinclair ve ark., 1984; Colwell ve Baron, 1990). Bu sorunun üstesinden gelmek için, Panadero ve ark. (2002), tarafından sandviç ELISA tabanlı bir antijen yakalama tekniği geliştirilmiştir. Bu testin, deneysel olarak enfeste olmuş sığırlarda, enfestasyondan 6 hafta sonra serumdaki HC'yi tespit edebildiği rapor edilmektedir (Panadero ve ark., 2002). Ancak, doğal enfestasyonlarda enfeste larva sayısının oldukça değişken olduğu ve larva gelişiminin eş zamanlı olmadığı bilinmekte olup HC profillerinin kontrollü deneysel koşullardan önemli ölçüde farklı olabileceği de vurgulanmaktadır (Panadero ve ark., 2007b). Aynı zamanda,

ELISA testi havuz oluşturulmuş serum veya süt örneklerine (Boulard ve ark., 1996; Frangipane di Regalbono ve ark., 2003) ve ticari süt örneklerine de (Otranto ve ark., 2001b) uygulanmıştır. Bu tip immuno-serolojik testlerin ticari süt örneklerine uygulanabilir olması kolay ve hızlı olmalarının yanı sıra uygun maliyetli olmaları bakımından birçok avantaja sahip olduğu görülmektedir. Bu tip testlerin esas kullanım amacı, çeşitli coğrafik bölgelerde sığır hypodermosis'in varlığını tespit etmek olup enfestasyonun gerçek durumu hakkında çok kısıtlı bilgi sağlamaktadır (Otranto ve ark., 2001b).

Hypodermosis'in serolojik teşhisi amacıyla yürütülen çalışmalarda daha çok *H. lineatum* L1'lerinin ekskret/sekret (ES) antijenlerinin kullanıldığı görülmektedir. Bu çalışmalardan Pruett ve ark. (1988), *H. lineatum* L1'lerden elde edilen kaba larval antijenler elde edilmiştir. Bu antijenler natif-PAGE üzerinde belirlendikten sonra enfeste ve aşılı sığırlardan elde ettikleri serumları Western Blot ile analiz etmişlerdir. Sonuç olarak, HA ve HC'yi en yüksek immunojenik larval antijenler olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırıcılar (Pruett ve ark., 1988) en yaygın protein olarak buldukları HC'nin HA ile benzer amino asti kompozisyonuna sahip olmasına karşın ortak bir antijenik epitopa sahip olmadığını kaydetmişlerdir. Casais ve ark. (1998), *H. lineatum* L1 dönemine ait cDNA klonlarından elde ettikleri rHC ile uyguladıkları ELISA testi ile *H. lineatum* enfestasyonlarının teşhisinde sensitivite ve spesifiteyi sırasıyla %85 ve %98,2 olarak belirlemişlerdir. Boldbaatar ve ark. (2001), benzer olarak *H. lineatum* L1 dönemlerinden elde ettikleri cDNA'larda HC genini amplifiye ederek bakteriyel ekspresyon sistemine klonlamış ve gen ekspresyonu ile rHC antijenini elde etmişlerdir. ELISA ve Western Blot tekniklerinde kullanılan rHC'nin *H. linetum* ile enfeste hayvanlarda spesifik reaksiyon verdiğini negatif hayvanlarda ise reaksiyon vermediği belirterek ilgili rekombinant antijenin serolojik teşhisteki etkinliğini vurgulamışlardır. Dominguez ve ark. (2010), sığırların özofagusundan elde ettikleri *H. lineatum* L1 dönemlerinden soluble fraksiyonları izole ederek hazırladıkları antijenlerle kızıl geyiklerde (*Cervus elaphus*) *H. actaeon*'un serolojik teşhisinde ELISA ve Western Blot yöntemlerinin değerlendirilmesi yapılmış ve enfeste hayvanların serum antikorlarının *H. lineatum* HC antijeni ile reaksiyon verdiğini tespit etmişlerdir. *Hypoderma bovis* üzerine yapılan çalışmada (Ziomko ve Cencek, 2001), *H. bovis* L1 dönemlerinden izole edilen ES antijenleri SDS-PAGE sonrası jelden elüe edilerek

izoelektrofokuslama ile işlenmiş, Western Blot analizleri sonrasında 22-24 kDa büyüklüğünde belirledikleri HA proteininin önemli bir antijen olduğunu vurgulamışlardır.

Hypodermosis tanısı için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler teknikler henüz kullanılmamış olsa da farklı konak türlerini istila eden larvaların taksonomik sınıflandırılmasında kullanılmaktadır. İtalya'da en yaygın oestrid türlerinin COI gen bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu- restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) analizi sonucunda (*H. bovis, H. lineatum, Przhevalskiana silenus, Oestrus ovis* ve *Gasterophilus intestinalis*), türler arasında belirgin genetik farklılıklar olduğu fakat kullanılan enzimlerle iki *Hypoderma* türü arasında ayrım yapmanın mümkün olmadığı görülmüştür (Otranto ve ark., 2000). Otranto ve ark. (2003a, 2003b), COI geninin değişken bir bölgesinin moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirerek, evcil ve yabani hayvanları etkileyen *Hypoderma* türleri arasındaki farklılıkları ortaya çıkarmışlardır. Son zamanlarda, Ahmed ve ark. (2017), PCR-RFLP ve sekans analizlerine göre Pakistan'daki sığırlarda *H. lineatum* ve *H. sinense*'nin moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

2.8 Proflaksi ve Kontrol

Bin dokuz yüz altmış ve bin dokuz yüz yetmişlerin sonlarında, myiasis tedavisinde rotenon ve organofosfatlar gibi çeşitli kimyasallar kullanılmıştır. Ancak, bu kimyasalların hayvanlarda toksisiteye neden olduğu düşünülmüştür (Brown, 1977). Ağır larva istilasından dolayı, özafagus ve spinal kanalda larva bulunduğunda larval toksinlerin reaksiyonları gözlemlenmiştir. Makrosiklik laktonların (ivermektin, moksidektin, doramektin ve eprinomektin) kullanılmasıyla, WFI kontrolünde için oldukça iyi sonuçlar gözlemlenmiştir. Daha önce hypodermosis tedavisinde kullanılan standart avermektin dozu yaklaşık 200 µg/kg vücut ağırlığı (bw) iken, daha sonra düşük maliyetli mikro doz kavramı (2 µg/kg bw) piyasaya sürülmüş ve bunun altında eradikasyon kampanyalarının başarıyla gerçekleştiği belirtilmiştir (Boulard ve ark., 2008). Benzer şekilde, enjeksiyon (500 µg/kg bw) veya dökme şeklinde mikro doz (50 µg/kg bw) olarak uygulanan ikinci nesil avermektinlerden eprinomektinin, doğal enfeste süt sığırlarında hypodermosis'e karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Rambozzi ve ark., 2006). Eprinomektinin, 1 mg/kg bw doz değerinde poli (D, L-laktide-co-glycolic) asit

(PGLA) tarafından oluşturulan bir matristen salındığı, yavaş salımlı enjeksiyon formülasyonunun (%5 w/v) profilaktik ve terapötik etkinliği, *H. bovis* ve *H. lineatum* instarları üzerinde gösterilmiştir (Rehbein ve ark., 2013). Yakın zamanda, uzun süreli ivermektin formülasyon uygulamasının, *H. bovis* ve *H. lineatum*'un tüm larva evrelerine karşı %100 etkili olduğu ve sineğin etkin olduğu sezon boyunca larva istilasına karşı hayvanları koruduğu kanıtlanmıştır (Otranto ve ark., 2016). İvermektin ve eprinomektin mikrodozu ile tedavi edilen süt ineklerinin insan tarafından tüketilmesi ile ilgili gıda güvenliği endişeleri değerlendirilmiştir. Shoop ve ark. (1996), izinli tüketim sınırına göre daha düşük ivermektin konsantrasyonu nedeniyle mikrodozla tedavi edilen süt sığırları için geri çekilme süresinin (vücuttan atılma süresi) gerekli olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmalar, düşük miktardaki ivermektin dozunun kullanılmasının gübre faunası üzerinde hiçbir zararlı etkisi olmadığını ortaya koymuştur (Alvinerie ve ark., 1998). Bauer (1994) ile Rambozzi ve ark. (2006), bir eradikasyon kampanyasının parçası olarak birbirini izleyen 2-3 yıl boyunca kışın yılda bir kez uygulanan ivermektin ve eprinomektinin mikrodoz kullanımının antiparaziter dirence yol açma olasılığının düşük olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Sığırlarda artropod enfestasyonları, işletmenin besi ya da sütçü karakterine göre ve işletmenin yönetim sistemine (açık/kapalı) bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Örneğin gün boyu merada olan sığır ile meraya çıkarılmayan ve kapalı sistemde bulunan sığır arasında enfestasyon derecesi önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Her türlü artropod enfestasyonu, direkt (et, süt, deri, döl tutma kabiliyeti, abort) veya indirekt (vektör-kaynaklı enfeksiyonlar) etkilerinden dolayı ciddi verim düşüklükleri ve önemli ekonomik kayıplara neden olur. Sığırların artropod enfestasyonları (sinek, bit, pire, kene ve uyuz etkenleri) birbirinden oldukça farklı karakterde seyretmektedir. Bu sebeple enfestasyonlar için farklı kontrol ve mücadele yöntemleri gerekmektedir. Bu yöntemlerden ilki işletme yönetimidir ve burada en önemli husus veteriner hekimin "know-how" prensibine bağlı zekasını ve analitik düşünme yetisini, mesleği gereği ilgili ve bilimsel gelişmeleri yakından takip etmesi ile yakından ilişkilidir. İkincisi kimyasal uygulama olup, çeşitli insektisitler (organikfosfatlar, sentetik piretroidler) ve akarisitler (makrosiklik laktonlar) kullanılarak enfestasyonun karakteri ve olgunun şiddetine göre mücadele noktasında kullanılır. İnsektisid ve akarisitin uygulamasında önem arz eden hususlar vardır. Aynı zamanda, birçok artropod enfestasyonlarında mevsimsel olarak

uygulamanın yanısıra sistemik etkili insektisitlerin kullanımı da önem arz etmektedir. Örneğin; Türkiye'de hypodermosis'in mücadelesinde sistemik insektisitlerin enfeste sığırlara verilmeyeceği takvim aralığı vardır. Bu takvime göre Kasım ayının başından Ocak ayının sonuna kadar olan yaklaşık 3 aylık zaman diliminde ilaçlama yapılmamalıdır çünkü uygulanırsa hayvanlarda felç görülebilir. Üçüncü yöntem ise aşılamadır. Türkiye'de sığırları artopod enfestasyonlara karşı koruyan bir aşı bulunmamaktadır. Son olarak, diğer yöntem ise biyolojik kontrol (predatörler, parazioidler, patojenler) olup özellikle kene ve uyuz etkenlerine yönelik mücalede kullanılabilir (İnci, 2016).

İmmünoprofilaksi amacıyla, hypodermosis'e karşı etkin bir aşı geliştirme noktasında birçok girişimde bulunulmasına rağmen ticari bir başarı yakalanamamıştır. Aşı denemeleri, serin proteazlardan olan HA, HB ve HC temelinde gerçekleştirilmiştir (Pruett ve ark., 1987; Pruett ve ark., 1989; Baron ve Colwell, 1991). Aşı etkinliğinin ilk araştırmalarını, birkaç farklı immünizasyon çalışmaları ve antijen preparasyonlarını içermektedir (Khan ve ark., 1960; Magat ve Boulard, 1970; Pruett ve ark., 1989; Baron ve Colwell, 1991).

Proteazlardan biri olan HA'nın, sığırlarda hem humoral hem de hücresel bağışıklığı ortaya çıkardığı için iyi bir aday aşı antijeni olduğu belirlenmiştir. Buzağıların aşılama/ mücadele çalışmalarında, doğal HA ile ortaya çıkan bağışıklık, larvaların %90'ının konak tarafından öldürülmesine neden olmuştur (Pruett ve ark., 1988). Alhydrogel, amphigen ve Freund's complete adjuvanı gibi çeşitli adjuvanlarla kombinasyon halinde verilen HA'nın, konak tarafından kazanılmış koruyucu bağışıklık üzerine değişken etkileri bildirilmektedir (Pruett ve Stromberg, 1995; Pruett ve Kunz, 1996). *Escherichia coli* bakteriyel ekspresyon sisteminde eksprese edilen rHA antijeni ve alhydrogen/amphigen adjuvanı ile formüle edilen rHA antijeni üzerine aşı geliştirme araştırmaları yürütülmüştür (Temeyer ve ark., 1993). Benzer şekilde Panadero ve ark. (2000b), sığır hypodermosis'inin serolojik teşhisinde doğal parazit antijenine alternatif olarak rHC'nin önemini vurgulamışlardır. WFI'ye karşı korumada immünojen olarak "gizli antijen" kullanımı hypodermosis'e karşı korumada oldukça başarılı olarak değerlendirilmiştir. Örneğin Colwell (2011), adjuvan olarak Quil A ile formüle edilen L3 instarların yağ dokusunun çözünür ekstraktlarıyla immünize edilen buzağılarda %100'e kadar *H. lineatum* larvalarının öldüğünü rapor etmiştir.

Aşı geliştirilmesi için, immünolojik teknikler, genetik ve biyolojik alanlarda ilerlemeler kaydedilmiştir. Fakat günümüzde hypodermosis kontrolü için kullanılabilir bir aşı bulunmamaktadır (Sandeman ve ark., 2014). Bunun en önemli nedenlerinin başında, hypodermosis'e karşı makrosiklik lakton endekositlerinin kullanımının ucuz, yüksek etkili ve kolay olması gelmektedir (Vercruysse ve Rew, 2002).

2.9 Eradikasyon

Birleşmiş Milletler Kalkınma Programı kapsamında 2030 yılında ulaşılması amaçlanan Sürdürülebilir Kalkınma hedeflerinden bir tanesi de iklim eylemidir. Buna göre, iklim değişikliği ve etkileri ile mücadele konusunda acilen eyleme geçilmesi planlanmaktadır. Küresel ısınma uluslararası bir sorundur (UNEP/UNECE, 2016). İklim değişikliği, insan ve ekosistem sağlığı ve sürdürülebilir kalkınma için en büyük tehditlerden biridir. Aynı zamanda diğer çevresel risklerin çoğunda hızlandırıcı etkiye sahiptir. Büyüyen etkileri arasında eriyen buzullar, artan sıcaklık ve kuraklık sıklığı, ekosistem dengesinin bozulması, biyolojik çeşitlilik, gıda verimliliğindeki değişimi, vektör-kaynaklı viral ve paraziter hastalıklar, insekt dinamikleri ve şiddetli hava kirliliği, antibiyotiklerin daha az etkili olduğu bir zamanda insan ve hayvan sağlığını tehdit eden bakteriyel çoğalma oranları gibi kaçınılmaz ekolojik sonuçları doğurmaktadır. İklim değişikliği, biyoçeşitlilik üzerindeki kilit baskılardan biridir. Araştırmalar, iklim değişikliğinin tür davranışını ve ekolojisini etkileyerek 21. yüzyılın sonlarına doğru giderek daha önemli hale geleceğini, örneğin türlerin menzil değişimlerine ve fenolojideki değişikliklere neden olacağını ileri sürmektedir. Küresel olarak, ekosistemlerin iklim ve çevresel değişim etkileri daha da kötüleşmektedir (UNEP/UNECE, 2016). İki bin bir yılı Hükümetler Arası İklim Değişikliği Panelinde (IPCC), son 50 yılda gözlenen ısınmanın çoğunlukla insan faaliyetlerine bağlı olabileceği kanaatine varılmıştır. Küresel ortalama yüzey sıcaklığının 1990'dan 2100'e kadar 1.4-5.8 °C aralığında artış göstereceği düşünülmektedir. IPCC, önümüzdeki 100 yıl içinde sıcaklıklar yaklaşık 2 °C artarsa, küresel ısınmanın olumsuz etkilerinin dünyanın çoğu bölgesine yayılmaya başlayacağını ileri sürmüştür. Olası sıcaklık artış hızı farklı biyolojik sonuçlar doğuracaktır. CO_2'de dahil olmak üzere artan sera gazı konsantrasyonunun neden olduğu küresel ısınma, bitkilerin ve bitki örtüsünün miktarının yanı sıra direkt olarak insektleri de etkileyebilir. Sıcaklık yükselmesinin birçok insekt ve bitki türünün coğrafik dağılımının değişmesine, insekt türlerinin kış aylarında ölüm oranlarının

azalmasına, ilkbaharda daha erken ortaya çıkmalarına ve yıllık nesil verme sayısındaki artışlara neden olabileceği ifade edilmektedir (Kiritani, 2006; Sharma, 2010). Küresel ısınma ve iklim değişikliğinin, artropod enfestasyonları üzerindeki etkisi yüksektir ve bundan dolayı eradikasyonun oldukça zor olacağı düşünülmektedir.

Ektoparazitler, her yerde bulunabilir ve oldukça zararlı olabilirler. Bu yüzden ektoparazitlerin çoğu durumda kalıcı olarak ortadan kaldırılamaz; dolayısıyla, genellikle, insektisit veya endektositlerle lokal ölçekte tedavi edilebilirler (Wall, 2007). Küresel olarak, farklı ektoparazit artropod grupları büyükbaş hayvanlarda önemli morbidite ve mortaliteye neden olur. Ektoparazitler, besin elde etmek ve yaşam döngülerini tamamlayabilmek için sığır sağlığını önemli ölçüde etkiler. Sığırları etkileyen bazı ektoparazit ve ektoparazit-kaynaklı patojenler Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü tarafından listelenmiştir. Miyasis'e neden olan sinekler, bitler, akarlar ve keneler sığır ektoparazitlerinin en önemli gruplarındandır. Bu ektoparaziterin birçoğu halk sağlığı üzerindeki etkileri nedeniyle "Tek Sağlık" konsepti ile ilişkilidir. Tarımsal ekosistemler, sığırlarda parazitizm durumunun değerlendirilmesinde ve artropod ile mücadele yöntemlerinin ilerletilmesinde kritik öneme sahiptir (Pérez de León ve ark., 2020).

Ektoparazitleri kontrol etmek veya ortadan kaldırmak için veteriner ilaçları ve mekanik-çevresel, biyolojik ve genetik yöntemler tek başlarına veya kombinasyon halinde kullanılmaktadır. İnsektisit ve akarisit içeren preparatlar-kimyasallar, hayvanları tedavi etmek veya önlemek ve vektör-kaynaklı patojenlere maruziyeti azaltmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Sığırlarda artropod enfestasyonlarını sürdürülebilir bir şekilde yönetmek için entegre yaklaşımlar gereklidir. İngiltere'de ithal edilen sığırlar için karantina prosedürlerini içeren ulusal ve uluslararası düzenlemeler vardır ve bunlar, İngiltere'den eradike edilen nokra sinekleri (*Hypoderma* spp.) gibi parazitlere yönelik tedavileri içermektedir. (Pérez de León ve ark., 2020).

Büyük çabalara rağmen, sığır hypodermosis'i dünya çapında sadece sekiz ülkede (Danimarka, Hollanda, İrlanda, İngiltere, Çek Cumhuriyeti, Almanya, Fransa, İsviçre) eradike edilmiştir (Boulard, 2002). Ancak Akdeniz bölgesinin farklı alanlarında ve Hint yarımadasında hala yaygınlık göstermektedir. Bir bölgede/ülkede eradikasyon çalışmalarının başarılı olması için, çiftçiler, saha veterinerleri, araştırmacılar ve devlet

kurumları ile iş birliği yapılarak uygun planlamanın olması gerekmektedir. Son zamanlarda, sığır hypodermosis'in Fransa'da eradike edilmesi gereken bir hastalık olduğu vurgulanmış ve 2006'dan bu yana bildirilmesi zorunlu bir hastalık haline gelmiştir (Boulard ve ark., 2008; Yadav ve ark., 2017).

Boulard ve ark. (2008), Fransa'da sığır hypodermosis için başarılı, sürdürülebilir ve düşük maliyetli kontrol programlarını kapsamlı bir şekilde gözden geçirmişlerdir. Araştırıcılar, ucuz ve doğru immün takip prosedürlerin geliştirilmesini, kullanılmasını ve çevresel olarak tehdit edici olmayan mikrodoz (2 µg/kg bw) ivermektinle tedavinin uygulanmasını önermişlerdir. Araştırıcılar, kontrol programlarını bölgesel olarak, art arda en fazla 3 yıl içinde iki ila üç eş merkezli bölgede aşamalı olarak yönetmek için bir stratejinin olması gerektiğini vurgulamışlar. Aynı zamanda, hastalıktan etkilenen her ülkede kontrol startejilerinin belirlenmesinde, tarım koşulları, hayvancılık, iklim koşulları, mevzuat ve ülkedeki hayvan sağlığı yapısının göz önünde bulundurulması gerektiğini ifade etmişlerdir.

Hypoderma spp.'nin yönetimine yönelik ilk girişim, Kuzey Amerika ve Meksika'da vida kurdu sineğinin (*Cochliomyia hominivorax*) ortadan kaldırılması için geliştirilen doğaya steril erkek sinek salınması uygulamasının *Hypoderma* sinekleri için uyarlanması olmuştur (Knipling, 1985). Kanada'nın Alberta kentinde, 1982 ve 1986 arasında Birleşik Devletler-Kanada Sığır Larva Projesi kapsamında bu amaçla ön deneme çalışmaları yürütülmüş ve cesaret verici sonuçlar elde edilmiştir (Weintraub ve Scholl, 1984). Nitekim uygulama sonrası takip eden ilk 3 yılda kimyasal kullanımı önemli ölçüde indirgenmiş ve *Hypoderma* sinek popülasyonunu azaltmak için bu tekniğin oldukça başarılı olduğu gösterilmiştir (Scholl, 1990). Ancak, steril sinek yaklaşımı, salınan steril erişkin sinek başına maliyetin ekonomik değerlendirmesi ve buna ek olarak büyük ölçekli in-vitro yetiştirme için uygun şartların bulunmaması nedeniyle uygulama noktasında daha az kullanım alanı bulmuştur (Klein ve ark., 1990; Kunz ve ark., 1990).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 *Hypoderma* Larvalarının Elde Edilmesi ve Morfolojik Teşhisi

Çalışmada, 2018 ve 2019 yıllarının Mayıs-Eylül tarihleri arasında Kayseri yöresinde mezbahaya kesime gelen sığırların incelemeleri yapılarak dorsal ve lumbal bölgelerinde hypodermosis'e bağlı şişlikler belirlenen sığırlar kesim süresince takip edilmiş ve deri altındaki *Hypoderma* larvaları toplanmıştır. Toplanan larvalar RNAlater® solüsyonu (Sigma-Aldrich) içerisine alınarak soğuk zincir altında muhafaza edilmiştir. Aynı zamanda enfeste belirlenen hayvanlara ait tam kan örnekleri de kesim esnasında silika jelli serum tüplerine alınmıştır. Hayvanlara ait verilerin protokol kayıtları sağlanmış ve larva örneklerinin bulunduğu tüpler ile kan tüpleri ilgili protokollere göre numaralandırılmıştır. Tüm örnekler soğuk zincir altında laboratuvara intikal ettirilmiştir.

Toplanan larva örneklerinin identifikasyonları RNAlater® solüsyonu (Sigma-Aldrich) içerisinde stereo-mikroskop altında ilgili teşhis anahtarları (Zumpt, 1965; Colwell ve ark., 1998) takip edilerek gerçekleştirilmiştir. İncelenen tüm larva örneklerinin görüntüleme işlemleri CellSens Standard 1.13 (Olympus) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İdentifiye edilen örnekler RNA later solüsyonu içerisine moleküler analizlere kadar muhafaza edilmiştir.

3.2 *Hypoderma* Larvalarının DNA Barkodlama ile Tür Konfirmasyonu ve Filogenetik Analizleri

3.2.1 Larva Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu

Morfolojik identifikasyonları sağlanmış her bir larva örneğinden steril bistüri yardımı ile alınan doku parçaları genomik DNA izolasyonunda kullanılmıştır. Genomik DNA izolasyonu, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Moleküler Parazitoloji Laboratuvarının ekstraksiyon ünitesinde yapılmıştır.

Larvalara ait doku örneklerinden genomik DNA izolasyonu, GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) ile gerçekleştirilmiş olup, prosedüre başlamadan önce Wash Buffer I ve Wash Buffer II solüsyonları üzerine saf (%100'lük) ethanol eklendikten sonra aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir.

1. Doku örneklerinden yaklaşık 20 mg tartım yapıldıktan sonra örneklerin karışmaması için steril 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerin üzerine protokol numaraları yazılmış ve her bir örnek tüplere konulmuştur.
2. Tüp içerisindeki örneklerin üzerine 180 µl Digestion Solution ilave edilerek süspanse edilmiştir.
3. Karışım üzerine 20 µl Proteinase K Solution eklenmiş ve numuneler vortekslenerek 56 °C'de 1 gece su banyosunda inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyondan sonra örnekler vortekslenmiştir.
5. Vortekslenen numunelerin üzerine 20 µl RNase A Solution eklenmiş ve numuneler tekrar vortekslenip karışımı sağlandıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir.
6. İnkübe edilen numunelere 200 µL Lysis Solution eklenmiş ve homojen bir karışım elde edilinceye kadar 15 sn vortekslenmiştir.
7. Vortekslenen numunelerin üzerine 400 µL %50'lik ethanol ilave edilmiş ve tekrar vortekslenmiştir.
8. Sonra 2 ml toplama tüplerinin içerisine spin kolonlar yerleştirilmiş ve tüm lizat spin kolonlara transfer edilerek 6.000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
9. Spin kolondan süzülerek ependorfun dibine çöken sıvı dökülmüş ve spin kolonlar yeni 2 ml tüpe yerleştirilerek 6.000 g 'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
10. Üzerine 500 µl Wash Buffer I ilave edilmiş ve 8.000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
11. Toplama tüpündeki kalan süzüntü dökülmüş ve aynı tüpe konulmuştur.
12. Daha sonra 500 µl Wash Buffer II ilave edilmiş ve 17.000 g'de 3 dk santrifüj edildikten sonra toplama tüpündeki süzüntü dökülerek boş şekilde tekrar 17.000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
13. Toplama tüpü atılmış ve spin kolon steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine alınarak 50 µl Elution Buffer ilave edilmiştir.

14. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildikten sonra 8.000 g'de 1 dk santirfüj edilerek genomik DNA izolasyonu tamamlanmıştır.
15. Elde edilen genomik DNA ekstraktlarından alınan örnekler Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) cihazında işlenerek DNA izolasyon etkinliği ve total genomik DNA miktarları (ng/µl) belirlenmiştir.
16. Örneklere ait genomik DNA'lar kullanılana kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2 DNA Barkodlama için Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I (mt-COI) Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Larva örneklerinden elde edilen gDNA izolatları DNA barkodlama ve filogenetik analizler için mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (mt-COI) gen bölgesinin parsiyel 709 bp barkod kısmını universal olarak amplifiye eden, LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') ve HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGT GACCAAAAAATCA-3') (Hebert ve ark., 2003) primerleri ile PCR'da amplifikasyona tabii tutulmuştur. PCR reaksiyonları 25µl final konsantrasyonda, hazır kullanımlık Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific), 0,5 µM her bir primer ve 10-20 ng kalıp DNA olacak şekilde hazırlanmıştır. Thermalcyclerda protokol ön denatürasyon: 95 °C'de 4 dk; 35 siklus, denatürasyon: 95 °C'de 30 sn, bağlanma: 50 °C'de 30 sn, uzama: 72 °C'de 1 dk; final uzama: 72 °C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır (Hebert ve ark., 2003).

PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla pozitif kontrol olarak Anabilim Dalında mevcut referans insekt DNA izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) %1,5'luk agaroz jelde elektoforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

Elektroforez görüntüleme sonucunda hedef baz aralığında görünen bantlar, ilgili genin sekans analizleri öncesinde direkt PCR ürünü kullanılması ile meydana gelebilecek komplikasyonları önlemek amacıyla High Pure PCR Product Purification Kitinin (Roche) üretici firmanın önerisi doğrultusunda jelden ekstrakte işlemi aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

1. Hedef büyüklükteki bant, jelden steril bir bisturi ucu yardımıyla kesilerek daha önce hassas terazide darası alınan 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüp içerisine yerleştirilmiştir.
2. Daha sonra içinde kesilen jel parçası bulunan tüp tekrar tartılmış ve böylelikle jelin ağırlığı hesaplanmıştır.
3. Jel parçasının ağırlığına göre 100 mg ağırlığındaki jel parçası için 300 µl Binding Buffer olacak şekilde solüsyon jel parçasının üzerine eklenmiştir.
4. Ependorf tüpü 30 sn vortekslenmiştir.
5. Önceden 56 ℃'ye ayarlanmış ısıtma bloğu içinde tüp 10 dk inkübasyona bırakılmış ve her 2 dk da bir mikrosantrifüj tüpü vortekslenmiştir.
6. Tüp içerisindeki agaroz jel parçası tamamen çözündükten sonra 100 mg ağırlığındaki jel parçası için 150 µl isopropanol olacak şekilde solüsyon ilave edilerek tüp iyice vortekslenmiştir.
7. Ticari kitin içeriğinde bulunan toplama tüpleri içerisine high pure filter tüpleri yerleştirilmiştir.
8. Mikrosantrifüj tüpünün içerisindeki bütün sıvı pipet yardımıyla tamamen bu filtreli tüpün içerisine boşaltılmıştır.
9. Sıvıyı içeren tüp oda ısısında 15.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
10. Alttaki toplama tüpüne süzülen sıvı boşaltılmış ve üstteki filtreli tüp tekrar aynı toplama tüpü içerisine yerleştirilmiştir.
11. Özel filtresi sayesinde DNA'yı içine hapseden filtreli tüpün içerisine DNA'yı yıkama amacıyla 500 µl Wash buffer ilave edilerek 15.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
12. Santrifüj işleminden sonra alta süzülen sıvı uzaklaştırılmış ve filtreli tüp aynı toplama tüpü içerisine yerleştirilmiştir.
13. İkinci yıkama amacıyla üzerine tekrar 200 µl Wash buffer ilave edilerek 15.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. İkinci yıkama ile sekanslamada muhtemelen problem teşkil edebilecek tuz ve enzim gibi maddelerin uzaklaştırılması sağlanmıştır.
14. Alta süzülen sıvı tekrar uzaklaştırılmış ve filtreli tüp bu kez, yeni 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüp içerisine yerleştirilmiştir.
15. Filtrede hapsolan DNA'yı alttaki mikrosantrifüj tüpe süzmek amacıyla 50 µl Elution buffer ilave edilmiştir.

16. 15.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüp içerisine süzülen sıvı DNA'yı ihtiva eden jel pürifiye PCR ürünü olarak, sekans analizleri için -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3 *Hypoderma* mt-COI Gen Bölgesinin Sekans ve Filogenetik Analizleri

Hypoderma izolatlarının PCR analizleri sonrası mt-COI amplikonları sekans analizleri için jelden pürifiye (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) edilmiştir. Sekans analizleri PCR analizlerinde kullanılan universal forward ve reverse primer dizileri ile çift yönlü olarak gerçekleştirilmiştir (Macrogen Europe). Çift yönlü DNA dizisi belirlenen izolatlara ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious 2020.1.1 (https://www.geneious.com) yazılımında De Novo Assamble ile forward ve reverse dizilimler işlenmiş ve kalite skoru yüksek olan consensus dizilim belirlenmiştir. Bu dizilimden PCR primerleri trimlenmiş ve hedef barkod mt-COI sekansları sağlanarak izolatlar için final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların Geneious 2020.1.1 yazılımı üzerinden BLASTn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) algoritması kullanılarak GenBank'ta mevcut homolog izolatlara ait ilgili gen bölgesi sekanslarıyla çoklu hizalamaları yapılmış, moleküler karakterizasyonları sağlanmış ve akabinde GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada karakterize edilen *Hypoderma* izolatlarının mitokondrial DNA barkod sekansları, Geneious 2020.1.1 (https://www.geneious.com) yazılımı üzerinden BLASTn (http://blast.ncbi.nlm.nih. gov/Blast.cgi) algoritması kullanılarak GenBank'ta çeşitli ülkelerden kayıt edilmiş *Hypoderma* haplotiplerine ait nükleotid sekansları ile birlikte filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Analize alınan sekansların Geneious 2020.1.1 (https://www.geneious.com) yazılımı üzerinden MUSCLE (Edgar, 2004) plug-in kullanılarak çoklu hizalamaları gerçekleştirilmiştir. Intra ve inter-spesifik genetik farklılıklar Kimura-2-Parameter (K2P) uzaklık modeline (Kimura, 1980) göre MEGA versiyon 7 (Kumar ve ark., 2016) genetik yazılımında gerçekleştirilmiştir. Haplotip analizleri ve nükleotid diversite indeksleri DnaSp v.5.1 (Librado ve Rozas, 2009) ve MEGA versiyon 7 yazılımlarında yürütülmüştür.

Filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde Maximum Likelihood (ML) analizi uygulanmıştır. ML analizinde sekans evrimi için en uygun substitution modelinin belirlenmesinde jModelTest v.0.1.1 (Posada, 2008) kullanılmış ve en düşük AIC

(Akaike Information, Criterion, correction) değerine sahip belirlenen GTR+I modeli filogenetik analizlerde kullanılmıştır. ML analizi Geneious 2020.1.1 yazılımı üzerinden PhyML (Guindon ve Gascuel, 2003) plugini kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ML analizleriyle oluşturulan ağaçların güvenilirliğinin tespit edilmesinde 1000 tekrarlı Bootstrap testi kullanılmıştır.

3.3 Hypodermin Genlerinin Moleküler Karakterizasyonu

3.3.1 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

COI barkodlaması sağlanan toplam 10 larva örneğinden öncelikle total RNA izolasyonu yapılmış ve izole edilen RNA'ların konsantrasyonları Qubit® 3,0 Fluorometer (Thermo Scientific) cihazında ölçülerek cDNA sentezi için uygun miktar aralığı belirlenmiştir. Daha sonra cDNA sentez kiti (Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, with dsDNase, Thermo Scientific) ile first-strand complementer DNA eldesi aşağıdaki prosedür takip edilerek yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 *Hypoderma* larvalarından total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Prosedüre başlamadan önce cDNA sentezinde kullanılacak olan kit içerisindeki kimyasal bileşenler ve -80 °C'deki RNA örnekleri ile birlikte buz içerisine gömülmüştür. Buz üzerinde çözündükten sonra bir siklus spin yapılmıştır. İlk olarak, DNA eliminasyonu için buz üzerine alınan RNA'se free tüp içerisine aşağıdaki kimyasal bileşenler eklenerek karışım hazırlanmıştır.

Reaksiyon bileşenleri	Hacim
10x dsDNase buffer	1 µl
dsDNase	1 µl
Total RNA	5 µl
Steril deiyonize su	3 µl
Toplam	10 µl

- Kimyasallar ilave edildikten sonra RNA'se free tüp içerisindeki karışım yavaşça alt üst edilerek karışması sağlanmıştır.
- Karışım önceden ısıtılmış olan thermalcyclerda 37 °C'de 2 dk inkübe edildikten sonra hemen buza alınmış ve 1 siklus spin yapılarak tekrar buz üzerine alınmıştır.
- gDNA eliminasyonunda sonra aynı tüp içerisine aşağıdaki kimyasallar ilave edilmiştir.

Primer	Oligo $(dT)_{18}$ primer	1 µl (100 pmol)
10 mM dNTP Mix		1 µl (0.5 mM final konsantrasyonda)
Steril deiyonize su		3 µl
Toplam		15 µl

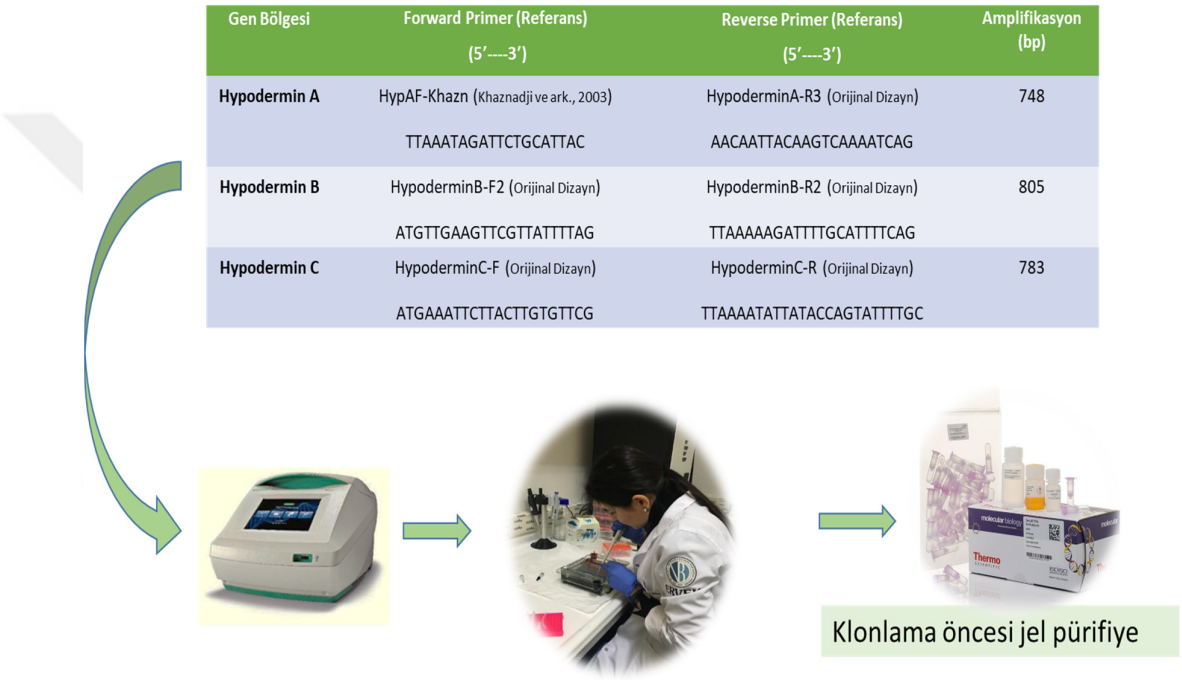
- Oligo dT ile muamele edilmiş RNA aşağıdaki reaksiyon karışımı içerisine eklenerek 1 siklus spin yapılmış ve thermalcyclerda 50 °C'de 30 dk bekletilmiştir.

5x RT Buffer	4 µl
Maxima H Minus Enyzme Mix	1 µl
Toplam hacim	20 µl

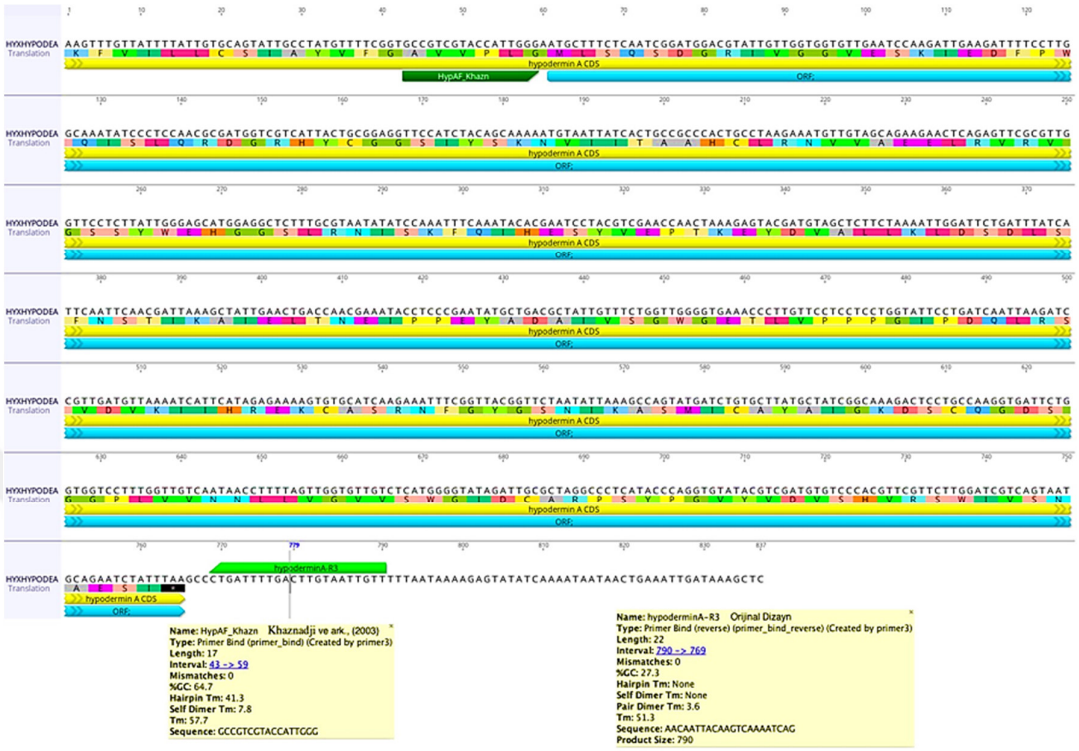
- Daha sonra karışım 85 °C'de 5 dk bekletilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.3.2 Hypodermin Genlerinin Amplifikasyonu

Elde edilen izolatlara ait cDNA'ların Genbank'ta mevcut *H. lineatum*'a ait HA (L24914), HB (L24915) ve HC (AB054066) genleri referans alınarak dizayn edilen primerlerle (Şekil 3.2) PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Primer bağlanmaları ve özellikleri ilgili referans sekanslar üzerinde Şekil 3.3-Şekil 3.5'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2 Hypodermin genlerini amplifiye eden primerler ve amplifikasyon prosesi



Şekil 3.3 HA geninin amplifikasyonunda kullanılan primerlerin referans sekans üzerinde bağlanmaları ve özellikleri



Şekil 3.4 HB geninin amplifikasyonunda kullanılan primerlerin referans sekans üzerinde bağlanmaları ve özellikleri



Şekil 3.5 HC geninin amplifikasyonunda kullanılan primerlerin referans sekans üzerinde bağlanmaları ve özellikleri

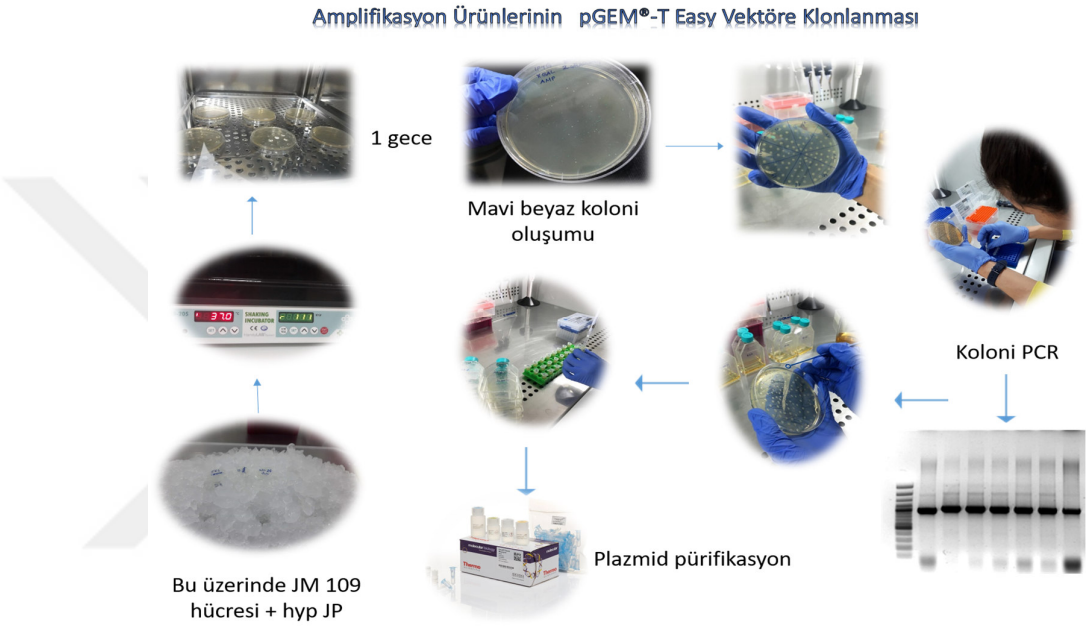
PCR reaksiyonları 25µl final konsantrasyonda, hazır kullanımlık Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific), 0,5 µM her bir primer ve 10-20 ng kalıp DNA olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan PCR reaksiyon karışımı thermalcycler cihazına (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad) yerlestirilerek amplifikasyona tabi tutulmustur.

Amplifikasyon icin protokol; on denaturasyon: 95 °C'de 4 dk; 40 siklus, denaturasyon: 95 °C'de 1 dk, baglanma: 48 °C'de (HA, HB); 45 °C'de (HC) 30 sn, uzama: 72 °C'de 1 dk; final uzama: 72 °C'de 10 dk olacak sekilde dizayn edilmistir. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) %1,5'luk agaroz jelde elektoforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

3.3.3 Hypodermin Genlerinin Plazmid Vektöre Klonlanması ve Rekombinant Plazmid DNA Elde Edilmesi

Elektroforez goruntuleme sonucunda hedef baz aralığında gorunen bantlar, ilgili genin klonlanması öncesinde direkt PCR urunu kullanılması ile meydana gelebilecek

komplikasyonları önlemek amacıyla High Pure PCR Product Purification Kitinin (Roche) onerileri dogrultusunda jelden ekstrakte edilmistir. Jel pürifiye örneklerin klonlanmasında pGEM®-T Easy Vector Sistemi (Promega) ilgili basamaklar takip edilerek kullanılmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Hypodermin genlerinin pGEM®-T Easy Vector Sistemine klonlama basamakları

Klonlama basamakları aşağıda detaylandırılmıştır.

Ligasyon Protokolü

1. Ligasyon basamağında kullanılacak solüsyon miktarları aşağıdaki gibi ayarlanmıştır.

2x Rapid ligation buffer	5 µl
PGEM T-Easy vector	1 µl
T4 DNA ligase	1 µl
Su	1 µl
PCR ürünü	2 µl

2. 2x Rapid ligation buffer içeriği kullanılmadan önce spin vorteks yapılmıştır.
3. Hazırlanan reaksiyonların karışması için pipetaj yapılmış ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.

Transformasyon Protokolü

1. Ligasyon reaksiyonları için, LB katı besiyeri içerisine ampisilin (50µg/ml), IPTG (100mM), X-Gal (50mg/ml) konsatrasyonları belirlenerek ilave edilmiş ve petri kaplarına dökülmüştür.
2. -80 °C'de muhafaza edilen kompetan *E. coli* JM109 hücresi çıkartılarak buz içerisinde eritilmiştir.
3. İnkubasyon sonrası ligasyon reaksiyonundan 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 2 µl alınmış ve üzerine kompetan *E. coli* JM109 hücresinden 50 µl transfer edilmiştir.
4. Karışım hafifçe karıştırılarak buz içerisinde 20 dk bekletilmiştir.
5. Daha sonra tüpler su banyosunda 42 °C'de 45-50 sn bekletilmiştir.
6. Tekrar buza alınarak 2 dk bekletilmiştir.
7. Ligasyon reaksiyonları ile transforme hücreleri içeren tüplere oda sıcaklığında bekletilen S.O.C mediumdan 950 µl ilave edildikten sonra 37 °C'de 200 rpm devirde 1,5 saat çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.
8. İnkübasyon sonrası tarnsforme kültürden 100 µl pleytlere ekimi yapıldı ve daha fazla koloni için geri kalan kültür 1.000 g'de 10 dk santrifüj yapılarak hücrelerin birikmesi sağlanmış ve içerisinden 100 µl alınarak pleytlere ekimi gerçekleştirilmiştir.
9. Pletyler 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır.

Transformantların İnsert Genler Yönünden Kontrolü

1. Bir gece inkübe edilen pleytler üzerinde şekillenen koloniler beyaz/mavi renk oluşumu yönünden kontrol edilmiştir.
2. Beyaz kolonilerden steril pipet uçlarıyla alınan hücreler insert genlerin varlığını teyit amacıyla koloni PCR (Şekil 3.7) analizine tabii tutulmuştur.
3. Pipet ucu ile koloniden alınan örnek PCR tüpünün dip kısmına yayılmış ve sonra pipet ucu 10 ml LB medyum içerisine aktarılarak protokol numarası verilmiştir.

4. Şekillenen kolonilerden alınan örnekleri içeren PCR tüpleri üzerine doğru oryantasyonda gen insert varlığının teyit edilebilmesi amacıyla gen spesifik forward ve vektör spesifik reverse (PUC/M13R-22) primerleri içeren PCR miks ilave edilmiştir.
5. Tüpler thermalcyclera yerleştirilerek ön denatürasyon: 95 °C'de 4 dk; 25 siklus, denatürasyon: 94 °C'de 30 sn, bağlanma: 50 °C'de 30 sn, uzama: 72 °C'de 1 dk; final uzama: 72 °C'de 10 dk olacak şekilde PCR analizine tabii tutulmuştur. PCR sonucu elde edilen amplikonlar %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant) ile UV ışın altında görüntülenip analiz edilmiştir.

Sıvı Besi Yerine Transformasyon ve Rekombinant Plazmid DNA Eldesi

1. Koloni PCR sonucu hedef genlerin varlığı ve oryantasyonu yönünden konfirme edilen kolonilerin aktarıldığı LB medyumlar 37 °C'de 1 gece çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.
2. Üreme gözlenen sıvı besi yerlerinden alınan örnekler 2 ml'lik ependorflar içerisine alınarak 8.000 rpm'de 2 dk santrifüj santrifüj edilmiştir.
3. Santrifüj sonrası üstteki sıvı kısım dökülüp pelletler GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) ile aşağıdaki basamaklarla işlenerek Rekombinant Plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır.
4. -20 °C'de saklanan pelletin oda sıcaklığında çözünmesi sağlandıktan sonra üzerine 250 µl Resuspension Solution eklenmiş ve vortekslenerek tamamen süspanse edilmesi sağlanmıştır.
5. Daha sonra 250 µl Lysis Solution eklendi ve solüsyon viskoz hale gelene ve hafif berraklaşıncaya kadar tüp el yardımıyla 4-6 kez alt üst edilerek karıştırılmıştır.
6. Üzerine 350 µl Neutralization Solution ilave edilmiş ve hemen tüp el yardımıyla 4-6 kez alt üst edilerek karışması sağlanmıştır.
7. Karışım daha sonra 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
8. Santrifüj sonrası supernatant alınıp GeneJET spin kolon içine transfer edilmiş ve 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
9. Alttaki toplama tüpüne süzülen sıvı boşaltılmış ve üstteki GeneJET spin kolon tekrar aynı toplama tüpü içerisine yerleştirimiştir.

10. Yıkama amacıyla her bir Miniprep kolon üzerine 500 µl Wash Solution ilave edilerek 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
11. Santrifüjden sonra alta süzülen sıvı uzaklaştırılmış ve GeneJET spin kolon aynı toplama tüpü içerisine yerleştirilmiştir.
12. Üzerine tekrar 500 µl Wash Solution ilave edilerek 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
13. Toplama tüpüne süzülen sıvı tekrar uzaklaştırılmış ve 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
14. Santrifüj sonrası GeneJET spin kolon steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüp içerisine yerleştirilmiş, plazmid DNA'sı elde etmek amacıyla üzerine 50 µl Elution Buffer eklenmiş ve oda ısında 2 dk beklendikten sonra 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
15. Santrifüj işlemi sonrası 1,5 ml'lik steril tüp içerisine süzülen sıvı plazmid DNA'sı insert genlerin konfirmasyonu amacıyla vektör spesifik primerlerle PCR analizlerine tabii tutularak sekans analizlerine kadar -20 ºC'de muhafaza edilmiştir.

3.3.4 Hypodermin Genlerinin Sekanslanması, Nükleotid ve Amino Asit Sekanslarının Karakterizasyonu

Her üç Hypodermin geni için elde edilen rekombinant plazmid DNA'lar klonlama vektörüne spesifik primerler ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plazmidlere ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious 2020.1.1 yazılımı (https://www.geneious.com) ile forward ve reverse dizilimler DeNovo Assamble kullanılarak contig analizi yapılmış ve ilgili genler için final konsensus dizilimler ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen sekansların blastn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) analizleri yapıldıktan sonra GenBank'ta mevcut diğer *Hypoderma* türlerine ait izolatların ilgili gen bölgesi sekanslarıyla Geneious 2020.1.1 (https://www.geneious.com) yazılımı üzerinden çoklu hizalamaları yapılarak interspesifik ve intraspesifik nükleotid ve aminoasit farklılıkları bölüm 3.2.3'de verildiği gibi analiz edilerek ortaya çıkarılmıştır.

İzolatlara ait amino asit dizilimleri; başlangıç ve bitiş sinyal kodonlarını belirlemek ve fraksiyonlarını göstermek amacıyla web tabanlı ORF Finder yazılımıyla açık okuma

çerçevesi (open reading frame, ORF) analizleri gerçekleştirilmiştir. HA, HB ve HC proteinlerinin transmembran bölgelerindeki amino asit dizilimlerinin sinyal peptid analizleri ve dizilimlerdeki tahmini antijenik peptidlerin varlığı Geneious 2020.1.1 (https://www.geneious.com) yazılımı üzerinden EMBOSS Protein Analysis 1.0 plugin yazılımı kullanılarak yapılnıştır. İlgili proteinlerinin transmembran sarmallarının analizleri ise yine ilgili yazılım üzerinden Transmembrane Prediction Tool 0.9 plugini kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzoelektrik nokta ve proteinlerin tahmini moleküler ağırlıkları ExPASy programı ile hesaplanmıştır. Amino asit dizilimlerindeki polimorfizm oranları ProSeq3 yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. Hypodermin proteinlerinin üç boyutlu yapıları Phyre2 Protein Homology/Analogy Recognition Engine V2.0 programı ile analiz edilmiş ve görüntülenmeleri Jmol: An open-source Java viewer programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

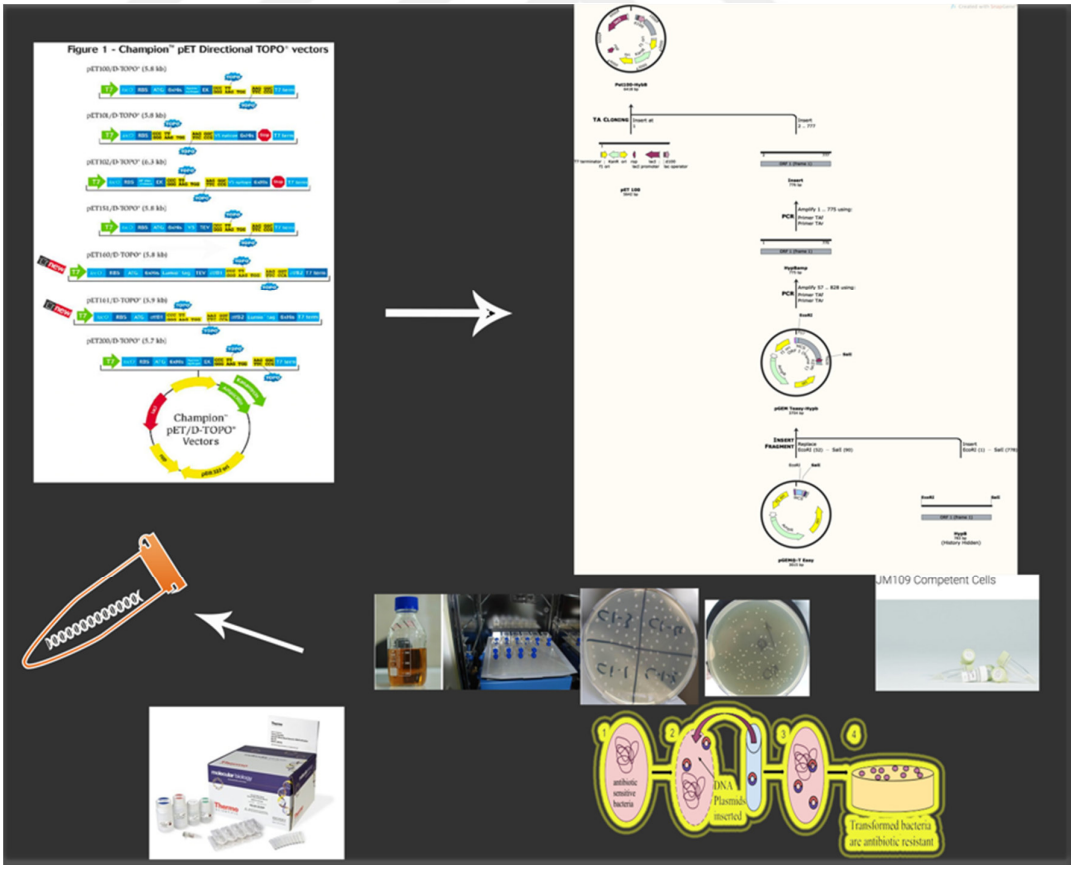
3.4 Hypodermin Genlerinin Ekspresyon Analizleri ve Rekombinant Antijenlerin Eldesi

3.4.1 Hypodermin Genlerinin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması ve Rekombinant Plazmid DNA Eldesi

Ekspresyon analizlerinde rekombinant antijenlerin elde edilmesinde pET 100/D-TOPO Bakteriyel Ekspresyon Sistemi (Thermo Scientific) ilgili basamaklar takip edilerek uygulanmıştır (Şekil 3.7). Ligasyon amacıyla PCR analizinde kullanılacak primerler ChampionTM pET Directional TOPO Expression Kit'de (Thermo Scientific) önerilen şekilde diyazn edilmiştir. Bu amaçla, ORF'yi bütün olarak amplifiye eden primerler gen sekansları üzerinden Geneious 2020.1.1 (https://www.geneious.com) yazılımında belirlenerek, forward primerin 5´ kısmına ligasyon amacıyla "CACC" nükleotid dizisi eklenerek sentezletilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 Hypodermin genlerinin ekspresyon vektörüne klonlanması için dizayn edilen primerler

HypA-pet100F	5´-CAC CAT GCT TTC TCA ATC GGA TGG-3´
HypA-pet100R	5´-TTA CAT AGA TTC TGC ATT ACT GAC-3´
HypB-pet100F	5´- CAC CAT GTT GAA GTT CGT TAT TTT ACT GT-3´
HypB-pet100R	5´-TTA AAT AGA TTT TGC ATT GTC AAT-3´
HypC-pet100F	5´- CAC CAT GAA ATT CTT ACT TGT GTT CGT T -3´
HypC-pet100R	5´- TTA AAA TAT TAT ACC AGT ATT TTG CTG A-3´



Şekil 3.7 Hypodermin genlerinin pET 100/D-TOPO Ekspresyon vektörüne klonlama basamakları

İlgili primer çiftleri ile pGEM®-T Easy Vector-Hypodermin rekombinant plazmidleri kalıp olarak kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuştur. PCR reaksiyonları 25µl final konsantrasyonda, hazır kullanımlık High Fidelity PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific), 0,5 µM her bir primer ve 10-20 ng kalıp DNA olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan PCR reaksiyon karışımı thermalcycler cihazına (Bio-Rad) yerleştirilerek amplifikasyona tabi tutulmuştur.

Amplifikasyon için protokol; ön denatürasyon: 98 ℃'de 30 sn; 35 siklus, denatürasyon: 98 ℃'de 10 sn, bağlanma: 60 ℃'de 30 sn, uzama: 72 ℃'de 30 sn; final uzama: 72 ℃'de 10 dk olacak şekilde dizayn edilmiştir. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) %1,5'luk agaroz jelde elektoforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant) ile görüntülenip analiz edilmiştir. Elektroforez görüntüleme sonucunda hedef baz aralığında görünen bantlar, ilgili genin klonlanması öncesinde direkt PCR ürünü kullanılması ile meydana gelebilecek komplikasyonları önlemek amacıyla High Pure PCR Product Purification Kitinin (Roche) önerileri doğrultusunda jelden ekstrakte edilmiştir. Klonlama basamakları aşağıda detaylandırılmıştır.

Ligasyon Protokolü

Ligasyon basamağında hypodermin gen fragmentlerinin ilgili plazmide yerleştirilmesi için ticari kitin önerileri doğrultusunda aşağıdaki karışım hazırlanmıştır.

PCR ürünü Jel Pürifiye Örnek	4 µl
Tuz Solüsyonu	1 µl
pET 100 vektör	1 µl

Karışım, vortekslenip santrifüj edildikten sonra oda ısısında 30 dk inkübe edilmiştir. Takiben transformasyon işlemine geçilmiştir. Plazmidin BL21 Star (DE3) *E. coli* kompetent hücrelerine (Thermo Scientific) transformasyonu aşağıda açıklandığı gibi yapılmıştır.

Transformasyon Protokolü

1. Ligasyon reaksiyonları için, LB katı besiyeri içerisine ampisilin (100µg/ml) konsantrasyonu belirlenerek ilave edilmiş ve petri kaplarına dökülmüştür.
2. -80 °C'de muhafaza edilen One Shot Top 10 *E. coli* kompotent hücreleri çıkartılarak buz içerisinde eritilmiştir.
3. İnkubasyon sonrası ligasyon raeksiyonundan 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 3 µl alınmış ve üzerine One Shot Top 10 *E. coli* kompetent hücresinden 50 µl transfer edilmiştir.
4. Karışım hafifçe karıştırılarak buz içerisinde 30 dk bekletilmiştir.
5. Daha sonra tüpler su banyosunda 42 °C'de 30 sn bekletilmiştir.
6. Tekrar buza transfer edilmiştir.
7. Ligasyon reaksiyonları ile transforme hücreleri içeren tüplere oda sıcaklığında bekletilen S.O.C mediumdan 250 µl ilave edildikten sonra 37 °C'de 200 rpm devirde 1,5 saat çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.
8. İnkübasyon sonrası transforme kültürden 100 µl pleytlere ekimi yapılmış ve pletyler 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır.

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerin doğru oryantasyonda gen insert varlığının teyit edilebilmesi amacıyla gen spesifik forward ve vektör spesifik reverse (T7 Reverse) primerleri ile koloni PCR taraması "Transformantların İnsert Genler Yönünden Kontrolü" başlığı altındaki protokol takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Koloni PCR sonucu hedef genlerin varlığı ve oryantasyonu yönünden konfirme edilen kolonilerden, ekspresyon vektörüne insert olmuş Hypodermin genlerini içeren rekombinant plazmidlerin eldesi için "Sıvı Besi Yerine Transformasyon ve Rekombinant Plazmid DNA Elde Edilmesi" başlığı altındaki basamaklar takip edilmiştir.

3.4.2 Hypodermin Genlerinin Ekspresyon Analizleri

3.4.2.1 BL21 Star (DE3) *E. coli* Kompotent Hücrelerine Transformasyon

Ekspresyon vektörüne insert olmuş Hypodermin genlerini içeren rekombinant plazmidlerin BL21 Star (DE3) *E. coli* hücrelerine transformasyonu buz üstünde aşağıda belirtildiği şekilde yapılmıştır:

1. Her hypodermin geni için ayrı olmak üzere 3 adet 50 µl BL21 Star (DE3) *E. coli* hücresi buz üstünde eritilmiştir.
2. Eriyen hücrelerin üzerine farklı hacimlerde 5-10 ng plazmid DNA'sı eklenmiş ve tüplerin dip kısımlarına vurularak hafifçe karıştırılmıştır.
3. Karışımlar buz üzerinde 30 dk inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon sonrasında karışımlar hızlı bir şekilde 42 ºC'de 30 sn ısı şokuna tabii tutulmuştur.
5. Isı şokundan hemen sonra tüpler buz üzerine alınmış ve 2 dk inkübe edilmiştir.
6. Tüplerin üzerine 250 µl oda ısısında bekletilmiş S.O.C. medium eklenmiştir.
7. Tüplerin kapağı kapatıldıktan sonra, çalkalayıcılı inkübatörde 37 ºC'de 200 rpm'de 1 saat inkübe edilmiştir.
8. İnkübasyon sonrası transformasyon ürününün tamamı 100 µg/ml ampisilin içeren 10 ml LB sıvı besi yerlerine ekilmiş ve çalkalayıcılı inkübatörde ve 37 ºC'de 200 rpm'de 1 gece inkübe edilmiştir.

3.4.2.2 Pilot Ekspresyon Denemeleri

Pilot ekspresyon denemelerinde 0,5 ve 1 mM IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) konsantrasyonu ve Magic Media (İnvitrogen) medyumu kullanılarak hedef genlerin indüklenmesi gerçekleştirilmiş ve farklı saatlerde hücrelerden örnek alınıp optimum indükleme zamanı araştırılmıştır. Sonuçlar, Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ve Western Blot analizleri ile değerlendirilmiştir.

A. IPTG İndüklemesi

1. Bir gece inkübasyona bırakılan tranformasyonun gerçekleştiği *E. coli* BL21(DE3) bakteri kolonileri içeren LB sıvı besi yerlerinden 100 µg/ml ampisilin içeren 30 ml LB sıvı besi yerlerine 1,5 ml aktarılarak 37 ºC'de çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

2. İnkübasyona bırakılan besi yerlerinden birkaç saat aralıklarla 1000 µl örnekler alınarak spektrofotometrede 600,0 nm dalga boyunda ölçümler yapılmış ve bakterilerin optik yoğunluklarının (OD) 0,5-0,8 arasına gelmesi sağlanmıştır.

3. Her hypodermin geni için uygun konsantrasyona gelen hücreleri içeren LB sıvı besi yeri üçe bölünerek IPTG negatif, 0,5 mM IPTG ve 1mM IPTG olarak işaretlenmiştir.

4. IPTG olarak işaretlenen ve indükleme yapılacak flasklara belirlenen konsantrasyonlarda IPTG ilave edilmiştir.

5. Besi yerleri 37 °C'de inkubasyona bırakılmış ve ilk konulduğu an dahil olmak üzere (sıfırıncı saat) 5 saat boyunca her saat başı 500 µl örnek alınıp ependorf tüplerine konulmuştur.

6. Ependorf tüpleri 15.300 rpm'de 1 dk santrifüj edilip, süpernatant kısmı atılmıştır. Kalan pellet SDS-PAGE analizi yapılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

B. MagicMedia™ E. coli Expression Medyumu ile İndükleme

1. Bir gece inkübasyona bırakılan tranformasyonun gerçekleştiği *E. coli* BL21(DE3) bakteri kolonileri içeren LB sıvı besi yerlerinden 100 µg/ml ampisilin içeren MagicMedia medyumu (İnvitrogen) (Medyum üreticinin açıklamalarına göre hazırlanmıştır) içerisine 1/20 oranında olacak şekilde sıvı besi yerinden aktarılmıştır.

2. Hücreler MagicMedia medyumu içerisinde 30 ºC'de 1 gece çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

3. Ertesi gün flasklardan 500 µl örnek alınıp ependorf tüplerine konulmuştur.

4. Ependorf tüpleri 15.300 rpm'de 1 dk santrifüj edilip, süpernatant kısmı atılmıştır. Kalan pellet SDS-PAGE analizi yapılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

3.4.2.3 SDS-PAGE Analizleri

SDS-PAGE analizlerinde TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 10% (Bio-Rad) aşağıdaki basamaklar takip edilerek Mini Protean Pre Cast Jel Sisteminde (Bio-Rad) uygulanmıştır. Her analiz öncesi aşağıdaki oranlarda taze %10'luk amonyum persülfat (APS) hazırlanmıştır.

%10 APS	50 mg
	500 µl dH_2O

1. Analize başlamadan önce 1 mm'lik cam plakalar kasete yerleştirilmiş ve ardından Mini-PROTEAN Tetra Jel dökme standına sabitlenmiştir. Daha sonra resolving jel içeriği aşağıdaki hacimlerde hazırlanarak elde edilen karışım vortekslenmiştir. Hazırlanan karışım, kasete yerleştirilecek olan tarağın diş kısmına kadar 0,5-1 cm kalacak şekilde dökülmüş ve donması beklenmiştir.

Resolving jel	
Resolver A	6 ml
Resolver B	6 ml
%10 APS	30 µl
Temed	3 µl

2. Ardından stacking jel içeriği aşağıdaki hacimlerde hazırlanarak vortekslenmiştir. Hazırlanan karışım kasetin boş kalan kısmını dolduracak şekilde dökülmüş ve tarak yerleştirilerek elektroforez öncesi 30 dk polimerizasyon için bekletilmiştir.

Stacking jel	
Stacker A	1 ml
Stacker B	1 ml
%10 APS	10 µl
Temed	2 µl

3. Örnekler üzerine 2x SDS-PAGE sample bufferdan (Bio-Rad) 100 µl ilave edilerek homojenizatörde 2 dk karıştırılmıştır.
4. Iyice karışan ve jel kıvamı alan örnekler ısıtmalı kuru blok içerisinde 95 °C'de 5 dk inkübe edilmiş ve proteinlerin denatüre olması sağlanmıştır.
5. Inkübasyon sonrası örnekler oda ısısında soğutulmuştur.
6. Jeller tanka yerleştirildikten sonra iç ve dış kısım 1x SDS elektroforez bufferı ile doldurulmuştur.
7. Taraklar jelden dikkatlice çıkarıldıktan sonra örneklerden 10 µl alınarak kuyulara yükleme yapılmıştır.

8. Protein büyüklüklerinin belirlenmesi için ilgili kuyucuklara protein standartları (Bio-Rad Precision Plus Protein Unstained Standards ve Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards) 5 µl hacimde ilave edilmiştir.
9. Jeller 120 V'da 90 dk yürütülmüştür.
10. Proteinlerin jel içerisinde ilerlemesi tamamlandıktan sonra, jeller dikkatli bir şekilde iki cam plaka arasından çıkarılmış ve 1x SDS elektroforez bufferı içerisine alınmıştır.
11. Jel üzerindeki proteinlerin görüntülenmesi Fusion FX5 (Vilber Lourmat) kemolüminesans görüntüleme sisteminde uygun UV dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

3.4.2.4 Western Blot Analizleri

Western blot analizleri, vektör plazmidte bulunan 6xHis ile füzyon edilmiş hedef proteinin belirlenmesi ve ekspresyon optimizasyonunun konfirme edilmesi amacıyla yapılmıştır. Western Blot Analizleri Trans-Blot Turbo Transfer Sisteminde (Bio-Rad) gerçekleştirilmiştir. Western blot için kullanılan solüsyonlar ve basamakları aşağıda verilmiştir.

1x Transfer Buffer	200 ml 5x Transfer Buffer (Bio-Rad)
	200 ml ethanol
	600 ml dH_2O

10x 1L TBS (Tris Buffered Saline)	24,2 g Tris base
	80 g NaCl
	pH 7.6 için HCl

1x TBS	90 ml dH_2O + 10 ml 10x TBS

Wash Buffer (TBS/T)	45 ml 10x TBS
	405 ml dH_2O
	450 µl Tween 20 (%0,1)

Blocker Buffer (BSA)	90 ml 1x TBS
	10 ml BSA
	50 µl Tween 20 (%0,05)

Western blot basamakları

1. 1x SDS elektroforez buffer içerisindeki SDS-PAGE jel membrana transfer aşamasına kadar bekletilmiştir.
2. PVDF membran blotlama öncesi 30 ml saf ethanolde şeffaf hale gelene kadar yaklaşık 3-4 dk bekletilmiş şeffaflandıktan sonra 30 ml 1x Transfer içerisinde 3 dk bekletilmiştir.
3. Ardından Transfer pedler (alt üst toplam 20 adet) 50ml 1x Transfer buffer içerisinde 3 dk tutulmuştur.
4. Bu basamaklar tamamlandıktan sonra kaset çıkarılmış ve kasetin tabanına birinci ıslatılmış ped (10 ad) ve üzerine PVDF membran daha sonra SDS-PAGE jel düzgün bir şekilde yerleştirildikten sonra jel üzerine ikinci ıslatılmış ped (10 ad) yerleştirilerek sandiviç oluşturulmuştur.
5. Oluşturulan sandiviçteki hava kabarcıkları roller ile giderilmiştir.
6. Kasetin kapağı kapatılarak Trans-Blot Turbo Transfer Cihazına (Bio-Rad) yerleştirilmiş ve 2,5 mA akımda 3 dk'da transferi gerçekleştirilmiştir.
7. Transfer sonrası PVDF membran 35 ml TBS/T içerisine alınmış ve 5 dk çalkalayıcıda tutulmuştur.
8. PVDF membran 30 ml blocking buffer içerisine konulmuş ve oda sıcaklığında bir saat boyunca çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.
9. İnkübasyon sonrasında PVDF membran TBS/T içerisine alınarak 5 dk 3'er kez yıkanmıştır.
10. Yıkama sonrası PVDF membran, Anti-HisG-HRP antikoru (Invitrogen) içeren (1:5000 dilüsyon) blocking buffer içerisinde oda sıcaklığında bir saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır.
11. İnkübasyon sonrasında PVDF membran 5 dk 3'er kez TBS/T ile yıkanmıştır.
12. Yıkama sonrası kemolüminesans görüntüleme için Clarity Western ECL Substrat (Bio-Rad) üreticinin açıklamalarına göre membran üzerine ilave edilerek 5 dk çalkalayıcıda tutulmuştur.

13. Membran üzerinde 6xHis işaretli proteinlerin görüntülenmesi Fusion FX5 (Vilber Lourmat) kemolüminesans görüntüleme sisteminde uygun UV dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

3.4.3 Rekombinant Hypodermin Antijenlerinin Saflaştırılması

Pilot ekspresyon denemelerinde elde edilen sonuçlarla rekombinant Hypodermin proteinlerinin saflaştırılması için uygun hacimde hazırlanan starter kültürlerden 200 ml besi yerine aktarım sağlandıktan sonra optimize edilen indükleme prosesi gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma öncesi proteinlerin *E. coli* bünyesinde soluble veya insoluble karakterde olma durumu için analizler gerçekleştirilmiştir. İlgili analiz basamakları aşağıda verilmiştir.

1. 200 ml LB besi yerinde kültüre elde edilmiş olan hücrelerden 2 ml alınarak mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve tüpler 4 °C'de 4.000 g'de 10 dk santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür.

2. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet üzerine 500 µl PBS ilave edilmiş ve 10 sn pulsasyon verilerek 60 sn boyunca sonikatörde sonikasyona tabii tutulmuştur. Bu işlem sonrası sonikattan 50 µl alınarak yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve "Total" olarak işaretlenmiştir.

3. Sonraki basamakta lizat 4 °C'de 12.000 g'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Süpernatanttan 50 µl alınarak yeni bir mikrosntrifüj tüpüne aktarılmış ve "Soluble" fraksiyon olarak işaretlenmiştir.

4. Santrifüj sonrası kalan pelet üzerine 500 µl 8 M üre solüsyonu (Sigma-Aldrich) ilave edilmiş ve 10 sn pulsasyon verilerek 60 sn boyunca sonikatörde sonikasyona tabii tutulmuştur. Sonikasyon sonrası lizat 4 °C'de 12.000 g'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Süpernatanttan 50 µl alınarak yeni bir mikrosntrifüj tüpüne aktarılmış ve "Insoluble" fraksiyon olarak işaretlenmiştir.

5. Total, soluble ve insoluble fraksiyonlardan alınan örnekler üzerine 100 µl 2x Laemmli buffer eklenerek ısıtmalı kuru blokta 95 °C'de 5 dk kaynatılarak denatürasyon sağlanmıştır.

4. Örneklerden 10 µl alınmış ve yukarıdaki basmaklar takip edilerek SDS-PAGE analizine tabii tutulmuştur.

Soluble veya insoluble karakterizasyonu belirlenmiş olan örneklere ait başlangıç kültüründen (198 ml) çöktürülmüş hücreler afinite kromotografide aşağıdaki basamaklar takip edilerek saflaştırma prosesine alınmıştır.

1. Hücresel peletler üzerine 8 ml/gr olacak şekilde binding buffer ilave edilmiştir. Binding buffer kompozisyonu aşağıda verilmiştir.

Binding Buffer	20 mM sodium phosphate
	0.5 M NaCl
	30 mM imidazole
	8 M Üre
	pH 7.4

2. Hazırlanan karışım üzerine enzimatik parçalanma için 0,2 mg/ml lysozyme, 20 µg/ml DNAse, 1 mM $MgCl_2$ ve 1 mM PMSF ilave edilmiştir.
3. Karışım 30 dk oda sıcakşlığında inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon sonrası karışım 50 ml steril falkon tüp içerisine alınmış 10 sn pulsasyon, 20 sn bekleme verilerek 10 dk boyunca sonikatörde mekanik parçalanmaya tabii tutulmuştur.
5. Sonikasyon sonrası lizat 4 °C'de 12.000 g'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant 0,45 µm pore genişliğine sahip membran filtreden geçirilerek sterilizasyon sağlanmıştır.
6. Steril lizat içerisindeki hedef proteinler Acta Pure Kromotografi Sisteminde (GE Healthcare) saflaştırma basamağına alınmıştır.
7. 6xHis işaretli rekombinant proteinlerin saflaştırılmasında HisTrap FF crude (GE Healthcare) kolonları kullanılmıştır.
8. Kromotografi sisteminde saflaştırma basamaklarında kullanılan Binding buffer ve Elution Buffer içerikleri aşağıda verilmiştir.

Binding Buffer	20 mM sodium phosphate
	0.5 M NaCl
	30 mM imidazole
	8 M Üre
	pH 7.4

Elution Buffer	20 mM sodium phosphate
	0.5 M NaCl
	500 mM imidazole
	8 M Üre
	pH 7.4

9. Saflaştırma sitemine HisTrap FF crude (GE Healthcare) kolonu takıldıktan sonra superloop yardımıyla sterilize lizat yüklenmiş ve aşağıda tabloda verilen protokol takip edilerek rekombinant proteinler 1ml fraksiyonlar halinde cihazın fraksiyon kollektöründe toplanmıştır.

Metod Akışı	**Çalıştırma Parametreleri**
Metod ayarları	Kolon volümü (CV) 1 ml Basınç limiti 0.3 MPa, Akış oranı 1 ml/dk
Prime ve ekulibrasyon	10 CV (Binding buffer)
Örneğin uygulanması	Süperloop içerisinde 25 ml
Bağlanmayan fraksiyonların yıkanması	10 CV (Binding buffer)
Elüsyon ve fraksiyonlama	Gradient elüsyon Step 1: 80% B (Elüsyon Buffer), 5 CV; Step 2: 100% B (Elüsyon Buffer), 15 CV, Peak Frac, 1 ml
Prime and equilibration	5 CV

10. Kollektör içerisinde steril tüplere alınmış olan rekombinant proteinler bir sonraki basamakta tuzlardan ve diğer iyonlardan arındırmak için 5 ml'lik HiTrap™ Desalting kolondan (GE Healthcare) Acta Pure Kromotografi Sistemi kullanılarak geçirilmiştir.

11. Pürifiye rekombinant antijenlerin konfirmasyonu yukarıda verilen protokole göre SDS-PAGE ve Western Blot analizleri ile sağlanmıştır.

3.4.4 Rekombinant Hypodermin Antijenlerinin İmmun Reaktivite Analizleri

Pürifiye Hypodermin antijenlerinin immun reaktivite analizleri için enfeste hayvanlardan elde edilmiş olan serum örnekleri kullanılarak Western Blot analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz basamakları aşağıda verilmiştir.

1. Saflaştırılmış rekombinant hypodermin proteinlerinin konsantrasyonu Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) cihazında işlenerek protein konsantrasyonları belirlenmiştir.
2. 10 µg protein 2x Laemmli buffer içerisinde dilüe edilerek %10'luk SDS-PAGE jellerine yüklenmiştir.
3. Elektroforez basamağından sonra SDS-PAGE jelleri Western Blot analizleri için PVDF membranlarına aktarılmıştır.
4. Western Blot analizlerinde primer antikor olarak enfeste hayvan serumlarının 1/50, 1/100, 1/200 ve 1/400 dilüsyonları kullanılmıştır.
5. Blocking buffer içerisinde 1:5000 olarak dilüe edilmiş rabbit anti-bovine IgG peroxidase konjugatı (Sigma) sekonder antikoru kullanılmıştır.
6. Reaksiyonların görüntülenmesi "Western Blot Analizleri" başlığı altındaki protokol takip edilerek Fusion FX5 (Vilber Lourmat, Germany) kemolüminesans görüntüleme sisteminde gerçekleştirilmiştir.

3.5 Rekombinant Hypodermin Antijenleri ve Sentetik Peptid Bazlı ELISA ile Sığır Serum Örneklerinde Hypodermosis Seropozitifliğinin Karşılaştırmalı Analizi

Elde edilen pürifiye hypodermin antijenleri ve in-silico analizlerle belirlenen sentetik peptidler kullanılarak Kayseri yöresinde çeşitli zamanlarda sığırlardan toplanmış Anabilim Dalı cryobankında muhafaza edilmekte olan serum örnekleri *Hypoderma* seropozitifliği yönünden ELISA metodolojisiyle değerlendirilmiştir. Bu amaçla toplam 200 sığır serum örneği incelenmiştir.

3.5.1 Rekombinant Hypodermin Antijenleri Tabanlı ELISA

En uygun antijen konsantrasyonu ve serum sulandırmasının belirlenmesi için pozitif hayvan serumları ile Checkerboard titrasyon analizleri gerçekleştirilmiştir (Boldbaatar ve ark., 2001). ELISA pleytlerinin kuyucukları hypodermin antijenlerinin 0,3 µg, 0,5 µg ve 1.0 µg konsantrasyonlarını içeren 100 µL coating buffer (50 mM carbonate buffer) ile, pH 9.6'da, 4 °C'de 18 saat inkübe edilerek kaplanmaları sağlanmıştır. Her konsantrasyon üç tekrarlı çalışılmıştır. Sonraki basamakta %0,05 Tween 20 içeren 200 µL 10X TBS'li Blocker BSA (Thermo Scientific) ile 37 °C'de 1 saat inkübasyonla kuyucuklardaki serbest açık alanlar bloklanmıştır. Bu basamağı takiben pleytler TBS-T (Tris Buffered Saline-Tween %0,05) ile 5 kez yıkanmıştır. Kuyucuklara 100 µL TBS-T içerisinde dilüe edilmiş pozitif sığır serumlarının 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 ve 1/1600 konsantrasyonları eklenerek 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası pleytler tekrar 5 kez TBS-T ile yıkanarak anti-bovine IgG horseradish- peroxidase konjugatının (Sigma-Aldrich) bloklama solüsyonu içerisinde 1/1000 dilüsyonu ile 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra pleytler 5 kez TBS-T ile yıkanarak reaksiyon her göze 100 µL TMB substrat (Thermo Scientific) eklenerek reaksiyon gelişimi için oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda kuyucuklara 100 µL stop solüsyonu (Thermo Scientific) eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Kuyucuklardaki optik dansite 450 nm'de ELISA mikroplaka okuyucuda değerlendirilmiştir. En uygun antijen konsantrasyonları ve cut-off değerleri SPSS 20.1 yazılımı üzerinden ROC analizleriyle (Kawada, 2012) belirlenmiştir.

Sığır serum örnekleri, Checkerboard titrasyon analizlerinde en düşük serum sulandırmasında pozitiflik gösteren hypodermin antijeni ile ELISA'da işlenerek cut-off değerine göre seropozitiflik yönünden incelenmiştir.

3.5.2 Sentetik Peptid Tabanlı ELISA

Çalışmada karakterize edilen HA, HB ve HC amino asit sekansları BLAST-p algoritması kullanılarak diğer *Hypoderma* türlerine (*H. lineatum*, *H. diana*) ait amino asit sekansları ile benzerlik açısından kıyaslanmıştır (Gish ve States, 1993). İlgili amino asit sekansları Geneious Prime yazılımı üzerinden Clustal W algoritması kullanılarak hizalanmıştır. Her üç Hypodermin amino asit sekansı için tahmini anijenik epitoplar ABCpred programında threshold 0,84, window length 14 ve overlapping filter: ON

olacak şekilde parametreler girilerek araştırılmıştır (Saha ve Raghava, 2006). Antijenik skoru en yüksek belirlenen epitopların fiziko-kimyasal özellikleri PepCalc server (https://pepcalc.com) üzerinden analiz edilerek GenScript firmasına (ABD) 4 mg konsantrasyonda sentezletilmiştir.

Sentetik peptidlerin ELISA analizinde yukarıda rekombinant antijenlerin kullanımındaki proses takip edilerek 0,5 µg, 1 µg ve 2 µg konsatrasyonları ile Checkherboard titrasyon analizleri gerçekleştirilerek en uygun antijenik konsantrasyonlar ve serum dilüsyonları araştırılmıştır. Uygun antijenik konsantrasyonlar ve serum dilüsyonlarıyla sığır serum örneklerinin ELISA işlenmesi Başlık 3.5.1'deki metodoloji takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Sığır serum örnekleri, Checkerboard titrasyon analizlerinde en düşük serum sulandırmasında pozitiflik gösteren hypodermin peptidi ile ELISA'da işlenerek cut-off değerine göre seropozitiflik yönünden incelenmiştir.

4. BULGULAR

4.1 *Hypoderma* Larvalarının Morfolojik İdentifikasyonu

Çalışmada her iki yıl boyunca mezbaha incelemeleri yapılan toplam 150 sığırdan 15'inin dorsal ve lumbal bölgelerinde hypodermosis'e bağlı nodüller belirlenmiştir (Şekil 4.1). Enfeste belirlenen sığırların cinsiyet ve yaş bilgileri toplanan larva sayıları ile birlikte Tablo 4.1'de verilmiştir. Sığırlardan toplanan toplam 52 adet larvanın stero mikroskop incelemesiyle *H. bovis* L3 oldukları belirlenmiştir. L3'lerin 19-27x8-12 mm büyüklüğünde, fıçı şeklinde oldukları ve ön uçlarının daha geniş yapıda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Larvaların belirli bir şekilde segmentlere ayrıldığı ve her segmentte dorsal ventral yüzde uzunlamasına seyreden iki uzun çizgiyle 8 eşit loba ayrıldıkları görülmüştür. Larvaların dorsal yüzünün 2-9. segmentlerde iki sıra halinde, ventral yüzünde ise 1-8. segmentlerde dikenlerin varlığı belirlenmiştir. Posterior stigmaların yarım daire şeklinde ve peritrem kanalının dar olduğu, iç kısmında buton yer aldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.1 Hypodermosis ile enfeste belirlenen sığırda dorsal ve lumbar bölgedeki nodüller

Tablo 4.1 Mezbaha incelemeleri yapılan sığırların çeşitli faktörlerine göre hypodermosis pozitifliği ve toplanan larva sayıları

Faktör	**İncelenen Hayvan Sayısı**	**Enfeste Hayvan**		**Toplanan L3 sayısı**
		Sayı	**%**	
Yaş				
2-4	85	11	12,9	40
4-6	65	4	6,2	12
Cinsiyet				
Erkek	121	13	10,7	44
Dişi	29	2	6,9	8
Irk				
Simental	51	5	9,8	22
Montofon	28	2	7,1	2
Yerli Kara	25	2	8,0	3
Melez	46	6	13,1	25
Toplam	150	15	10,0	52



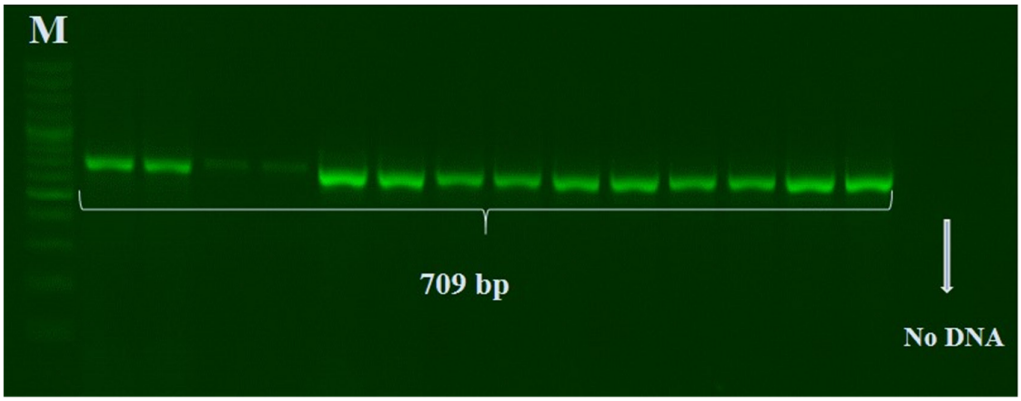
Şekil 4.2 *H. bovis* L3 (orijinal)



Şekil 4.3 *H. bovis* L3'ün posterior peritremi (orijinal)

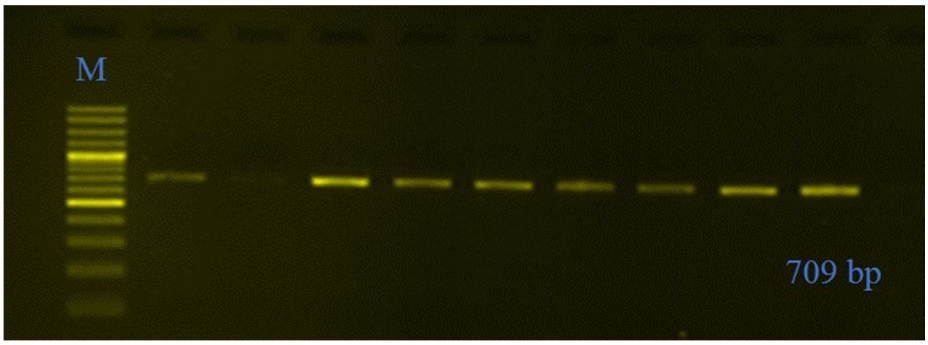
4.2 Mt-COI Barkod Geninin Amplifikasyonu, Sekans Karakterizasyonu ve Filogenetik Analiz Sonuçları

Morfolojik identifikasyonları sağlanan toplam 52 *H. bovis* L3 örneğinden elde edilen genomik DNA izolatlarının mt-COI gen bölgesinin barkod kısmını hedef alan primerlerle PCR amplifikasyonu sonucunda agaroz jel üzerinde hedef büyüklükte (709 bp) amplikonlar belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 *H. bovis* L3'lerine ait izolatların parsiyel mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primer ile PCR sonucu elde edilen amplikonların jel elektroforezde görünümü M: Marker (100bp)

Sekans analizi için tüm izolatlara ait amplikonlar jelden pürifiye edilmiş olup pürifiye amplikonların agaroz jel üzerinde görünümleri Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Jel pürifiye amplikonların PCR primerleri ile çift yönlü olarak sekanslanması sonucu izolatlara ait forward ve reverse kromotogramlar Geneious 2020.1.1 yazılımında De Novo Assamble ile işlenerek kalite skoru yüksek konsensus dizilimler elde edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.5 Mt-COI gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası jel pürifiye edilen bazı örneklerin jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100 bp)



Şekil 4.6 DeNovo analizleri sonucu *H. bovis* izolatına ait konsensus sekans dizilimi

Konsensus dizilimlerden PCR primerleri trimlendikten sonra hedef barkod COI gen bölgesi (658 bp) sekansları belirlenmiş ve izolatlara ait final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların BLASTn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) analizleri yapıldıktan sonra Geneious 2020.1.1 üzerinden genetik yazılımlarla GenBank'a kayıtlı diğer *H. bovis* izolatları ile çoklu ve ikili hizalamaları yapılarak filogenileri araştırılmış ve moleküler karakterizasyonları sağlanmıştır. Elde edilen sekansların haplotip analizleri sonucu birbirine yakın iki *H. bovis* haplotipin varlığı belirlenmiş ve ilgili haplotipler ERU-Hbov1 ve ERU-Hbov2 olarak isimlendirilmiştir. ERU-Hbov1 haplotipi sekanslanan örnekler arasında daha yaygın belirlenmiştir (Tablo 4.2). Belirlenen haplotiplere ait izolatların nükleotid sekansları arasıında %0,6 genetik farklılık tespit edilmiştir. Sekanslanan izolatların haplotiplere göre dağılımları GenBank aksesyon numaraları ile birlikte Tablo 4.2'de verilmiştir.

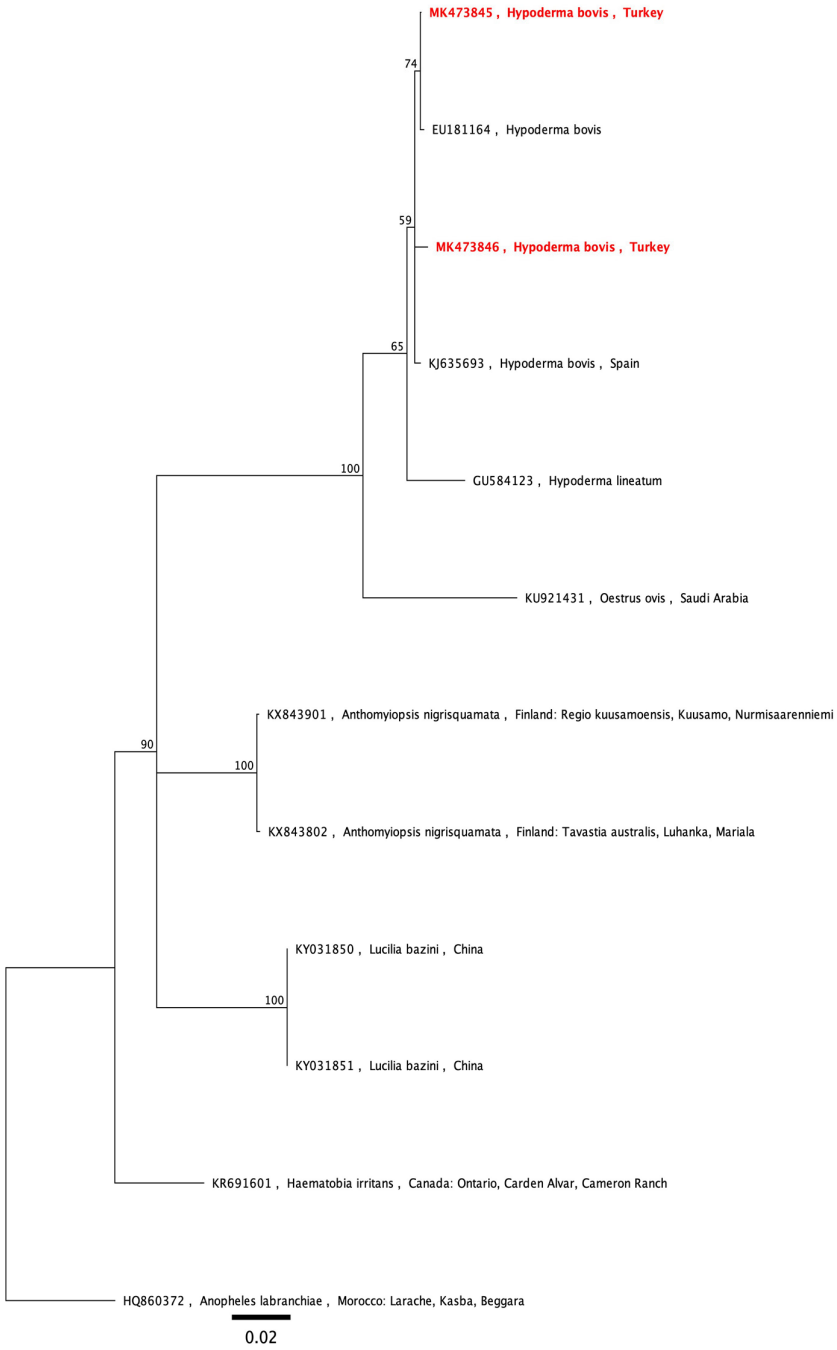
Tablo 4.2 *H. bovis* izolatlarının mt-COI sekans analizine göre belirlenen haplotiplere dağılımı

Tür	Gelişim dönemi	Sekanslanan izolat sayısı	Haplotip	İzolatların haplotiplere dağılımı	Aksesyon numaraları
H. bovis	L3	52	ERU-Hbov1	37	MK473845
			ERU-Hbov2	15	MK473846

Çalışmada karakterize edilen haplotiplerin GenBank'ta kayıtlı olan *H. bovis*, *H. lineatum* ve diğer bazı yakın organizmalara ait barkod sekanslarıyla birlikte filogenetik ilişkileri Şekil 4.7'de verilmiştir. Maximum likelihood analizi temelinde oluşturulan filogenetik ağaç üzerinde izolatların tür bazlı monofiletik küme oluşturduğu görülmüştür. Filogenetik analizlere dahil edilen türlere ait izolatların mt-COI gen bölgesi nükleotid farklılıkları Tablo 4.3'de verilmiştir. Çalışmamızda karakterize ettiğimiz ERU-Hbov1 ve ERU-Hbov2 haplotiplerine ait izolatların Çin'de sığırlardan rapor edilmiş *H. bovis* izolatıyla %99,8 ve %99,5 benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. Her iki haplotipe ait izolatlar İspanya'da sığırlardan bildirilmiş *H. bovis* izolatıyla (KJ635693) sırasıyla %0,5 ve %0,8 genetik farklılık göstermiştir. Mt-COI filogenisine göre *H. bovis* Muscinae alt ailesinde en yakın ilişkiyi ortalama %4,1 farklılıkla *H. lineatum* ile gösterirken en uzak ilişkiyi ise ortalama %19,2 farklılıkla *Haemotobia irritans* ile göstermiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3 *H. bovis* ve Muscinae alt ailesinde yer alan diğer bazı sinek türlerine ait izolatlarının nükleotid farklılıkları

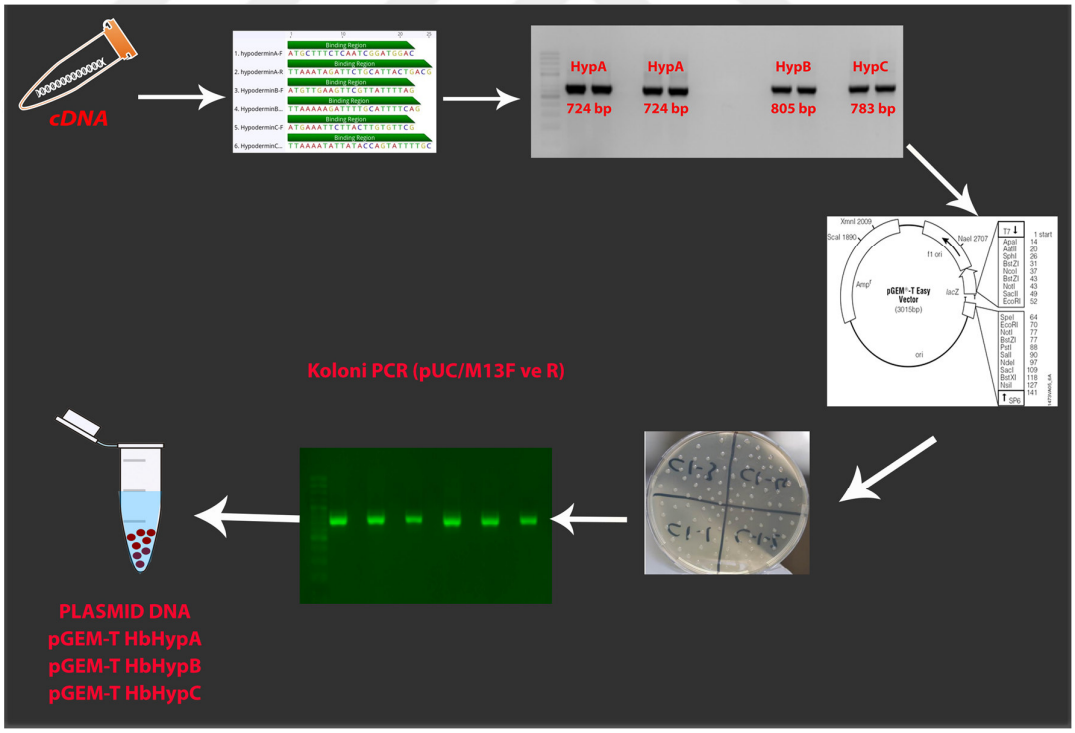
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	MK473845 *H. bovis*										
2	MK473846 *H. bovis*	0.0024									
3	EU181164 *H. bovis*	0.0024	0.0047								
4	KJ635693 *H. bovis*	0.0024	0.0047	0.0047							
5	GU584123 *H. lineatum*	0.0400	0.0427	0.0425	0.0427						
6	KU921431 *O. ovis*	0.0293	0.0318	0.0267	0.0318	0.0725					
7	KX843901 *A. nigrisquamata*	0.1701	0.1701	0.1737	0.1665	0.1527	0.2107				
8	KX843802 *A. nigrisquamata*	0.1701	0.1701	0.1737	0.1665	0.1527	0.2107	0.0024			
9	KY031850 *L. bazini*	0.1700	0.1700	0.1735	0.1665	0.1924	0.2105	0.1015	0.1015		
10	KY031851 *L. bazini*	0.1700	0.1700	0.1735	0.1665	0.1924	0.2105	0.1015	0.1015	0.0000	
11	KR691601 *H. irritans*	0.1916	0.1916	0.1953	0.1880	0.1916	0.2301	0.1043	0.1074	0.1073	0.1073



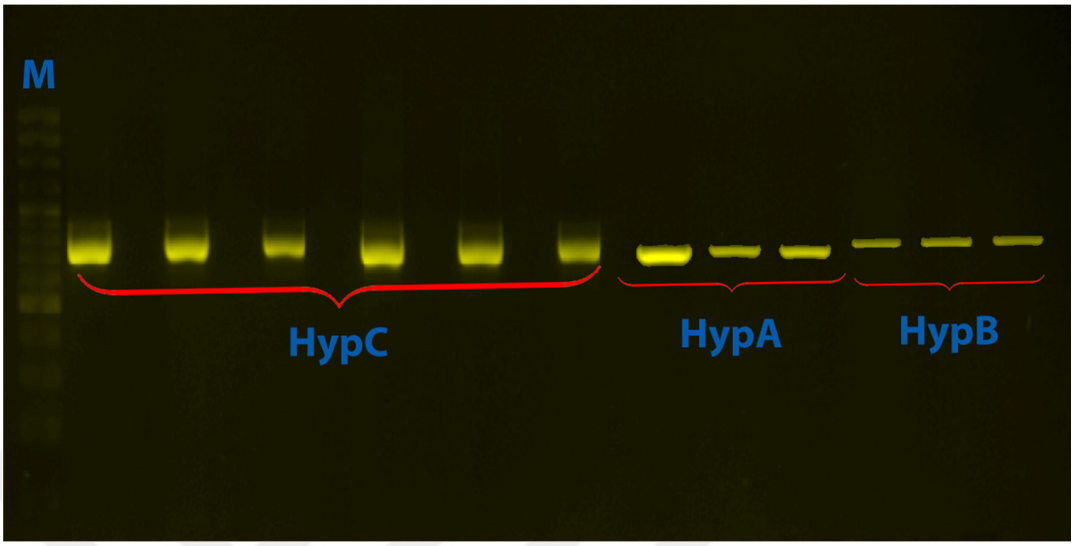
Şekil 4.7 *H. bovis* ve Muscinae alt ailesinde yer alan diğer bazı sinek türlerine ait izolatların mt-COI barkod gen bölgesi Maximum Likelihood (ML) analizine göre filogenetik ilişkileri. Node'ların önündeki rakamlar ML bootstrap desteğini göstermektedir. Dış grup olarak *A. labranchiae* izolatı (HQ860372) kullanılmıştır. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir.

4.3 Hypodermin Genlerinin Amplifikasyon Klonlanma Sonuçları

Hypoderma bovis L3'lerden elde edilen cDNA kalıplarının, tasarlanan spesifik primerlerle PCR analizleri sonucunda HA, HB ve HC genlerinin ORF bölgesi komple olarak amplifiye edilmiştir. PCR sonrası her üç gen için elde edilen hedef büyüklükteki amplikonlar agaroz jel üzerinde Şekil 4.8'de gösterilmiştir. İlgili jel pürifiye amplikonların pGEM-T Easy vektöre klonlanması sonucu LB katı besiyerinde transforme kolonilerin hedef gen bölgelerini içerdikleri koloni PCR analizlerinde teyit edilmiştir (Şekil 4.8). Transformantların sıvı besi yerinde üremelerini takiben rekombinant plazmidler elde edilmiştir. Rekombinant plazmidler gen spesifik primerlerle PCR analizlerine tabii tutularak hedef gen bölgelerini içerdikleri teyit edilmiştir (Şekil 4.9)



Şekil 4.8 HA, HB ve HC genlerinin cDNA kalıplarında PCR ile çoğaltılması, klonlama ve koloni PCR sonrası rekombinant plazmid eldesi



Şekil 4.9 Rekombinant pGEM-T Easy-Hypodermin plazmidlerinin gen spesifik primerlerle PCR analizleri sonucu amplikonların agaroz jelde görünümü M: Marker (100 bp)

Toplam 10 izolata ait konfirme edilen pGEM-T Easy-Hypodermin plazmidleri vektör spesifik primerlerle Sanger sekanslama platformunda çift yönlü olarak sekans analizlerine tabii tutularak nükleotid sekansları elde edilmiştir.

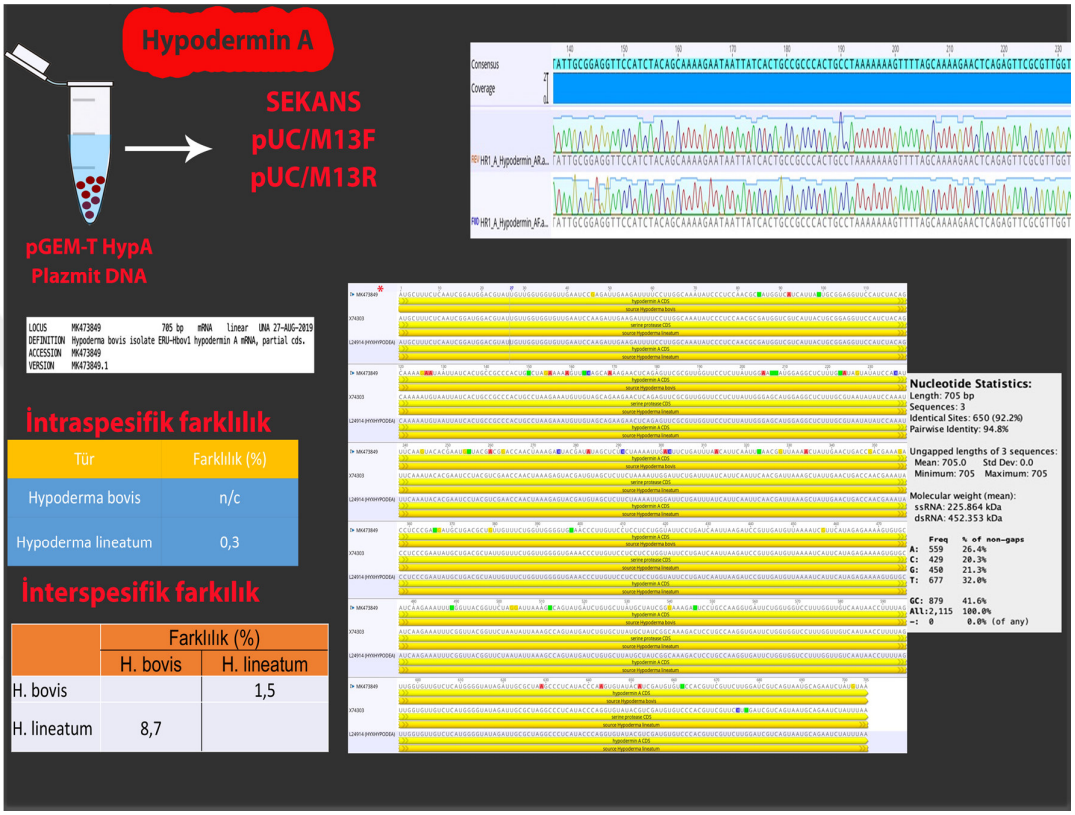
4.4 Hypodermin Genlerinin Nükleotid ve Amino Asit Sekans Karakterizasyon Sonuçları

4.4.1 Hypodermin A

4.4.1.1 Nükleik Asit Sekans Karakterizasyonu

HA genini içeren rekombinant plazmidlerin sekanslanması sonucu kalite skoru yüksek sekans kromotogramları elde edilmiş ve her iki yönde okumalara ait kromotogramların DeNovo uygulaması üzerinden birleştirilmesi ile final konsensus sekanslar elde edilmiştir (Şekil 4.10). Konsensus sekans içerisinde HA geninin açık okuma çerçevesi sekansının 705 bp büyüklüğünde olduğu görülmüştür. Karakterizasyonu yapılan 10 izolata ait nükleotid sekanslarının birbirleriyle tamamen identik olduğu belirlenmiş ve ilgili sekans "MK473849" aksesyon numarası ile Dünya'dan ilk kayıt olarak GenBank veri tabanına yüklenmiştir. GenBank veri tabanında *H. lineatum*'a ait olan Amerika Birleşik Devletleri (L24914) ve Fransa'dan (X74303) bildirilmiş iki izolata ait HA ORF

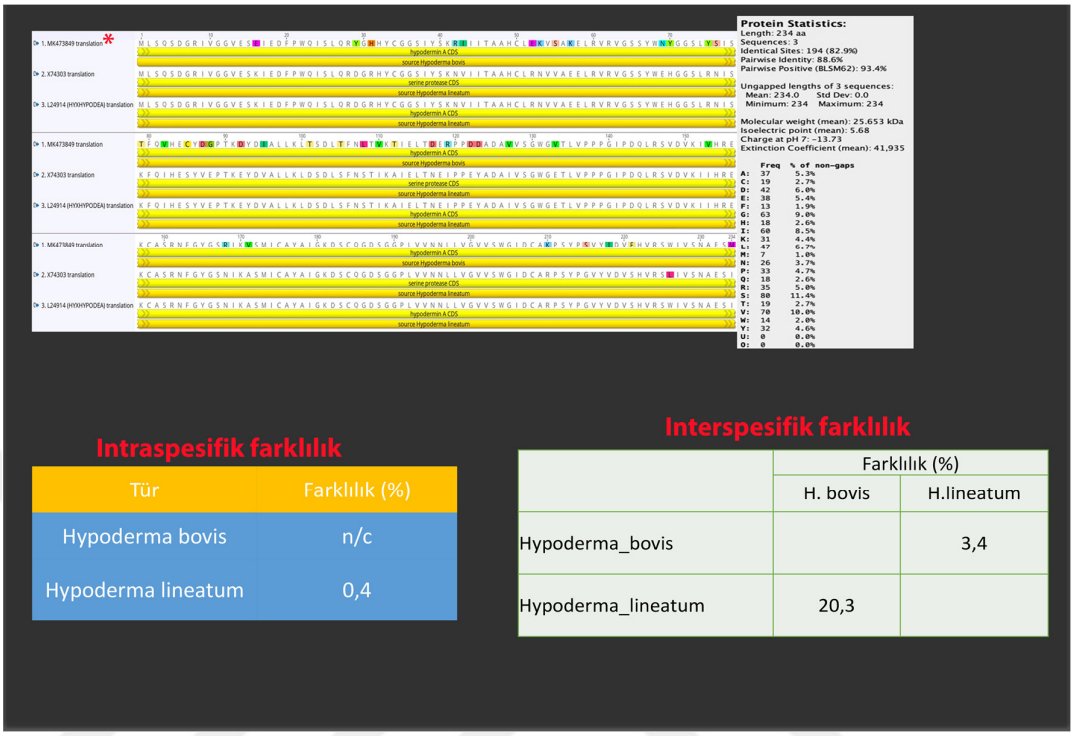
sekanslarıyla karakterize ettiğimiz *H. bovis* HA ORF sekansı arasında inter-spesifik nükleotid farklılığı %8,7±1,5 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 HA geninin nükleotid sekansı, intra ve inter-spesifik genetik farklılıklar

4.4.1.2 Amino Asit Sekans Karakterizasyonu

Çalışmada karakterize edilen HA geninin amino asit dizisinin 234 aa uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir. Amino asit sekansı içerisinde Serine ve Valine amino asitlerinin en yüksek oranda olduğu görülmüştür (Şekil 4.11). Amino asit dizilimlerinin inter-spesifik farklılığı incelendiğinde yukarıda bahsi geçen *H. lineatum* izolatları ile ortalama %20,3±3,4 farklılık belirlenmiştir. Ayrıca GenBank veri tabanında mevcut olan iki *H. lineatum* HA geni arasında %0,4 oranında intra-spesifik farklılık olduğu görülmüştür.



Intraspesifik farklılık

Tür	Farklılık (%)
Hypoderma bovis	n/c
Hypoderma lineatum	0,4

Interspesifik farklılık

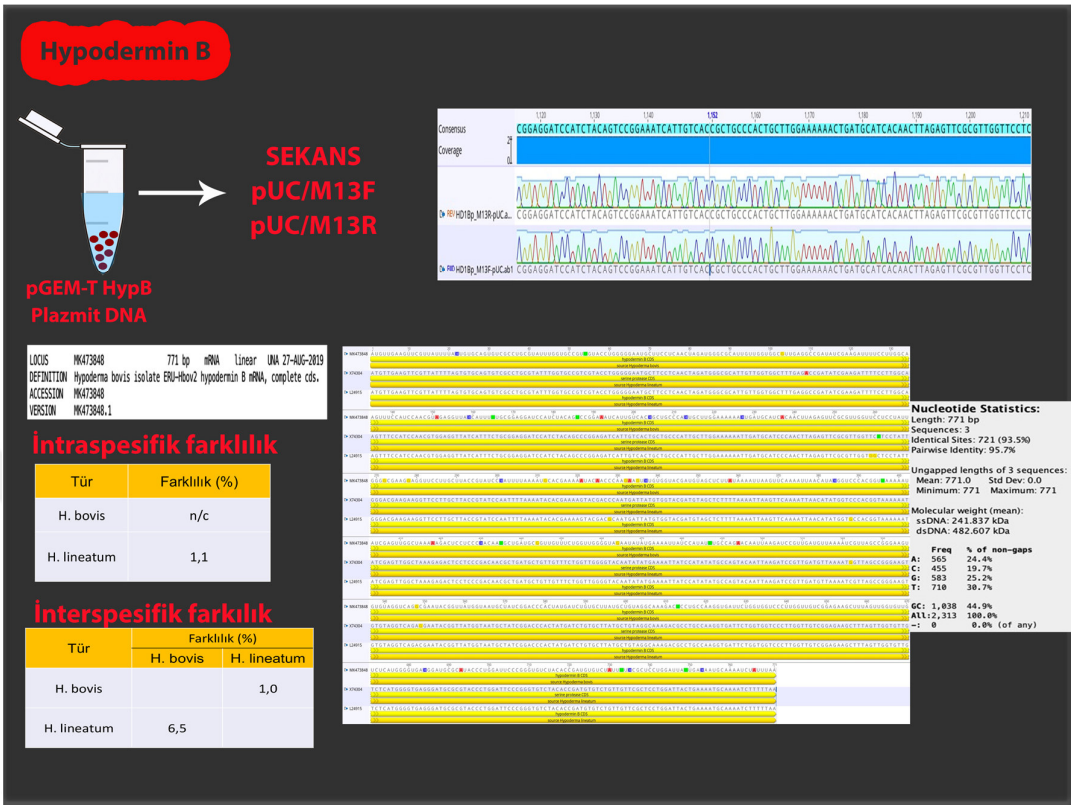
	Farklılık (%)	
	H. bovis	H.lineatum
Hypoderma_bovis		3,4
Hypoderma_lineatum	20,3	

Şekil 4.11 HA geninin amino asit sekansı, intra ve inter-spesifik genetik farklılıklar

4.4.2 Hypodermin B

4.4.2.1 Nükleik Asit Sekans Karakterizasyonu

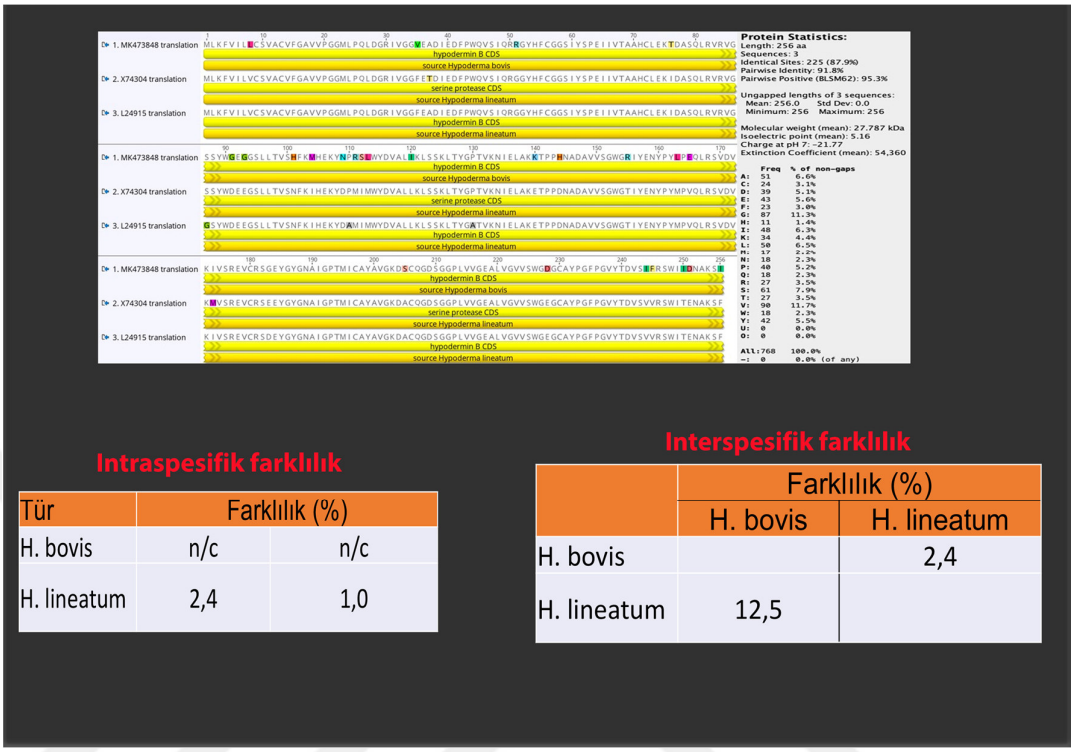
HB genini içeren rekombinant plazmidlerin sekanslanması sonucu kalite skoru yüksek sekans kromotogramları elde edilmiş ve her iki yönde okumalara ait kromotogramların DeNovo uygulaması üzerinden birleştirilmesi ile final konsensus sekanslar elde edilmiştir (Şekil 4.12). Konsensus sekans içerisinde HB geninin açık okuma çerçevesi sekansının 771 bp büyüklüğünde olduğu görülmüştür. Karakterizasyonu yapılan 10 izolata ait nükleotid sekanslarının birbirleriyle tamamen identik olduğu belirlenmiş ve ilgili sekans "MK473848" aksesyon numarası ile Dünya'dan ilk kayıt olarak GenBank veri tabanına yüklenmiştir. GenBank veri tabanında *H. lineatum*'a ait olan Fransa'dan bildirilmiş iki izolata (L24915; X74304) ait HB ORF sekanslarıyla karakterize ettiğimiz *H. bovis* HB ORF sekansı arasında inter-spesifik nükleotid farklılığı %6,5±1,0 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 HB geninin nükleotid sekansı, intra ve inter-spesifik genetik farklılıklar

4.4.2.2 Amino Asit Sekans Karakterizasyonu

Çalışmada karakterize edilen HB geninin amino asit dizisinin 256 aa uzunluğunda olduğu belirlenmiştir. Amino asit sekansı içerisinde Valine ve Glisin amino asitlerinin en yüksek oranda olduğu görülmüştür (Şekil 4.13). Amino asit dizilimlerinin inter-spesifik farklılığı incelendiğinde yukarıda bahsi geçen *H. lineatum* izolatları ile ortalama %12,5±2,4 farklılık belirlenmiştir. Ayrıca GenBank veri tabanında mevcut olan iki *H. lineatum* HB geni arasında %2,4±1 oranında intra-spesifik farklılık olduğu görülmüştür.

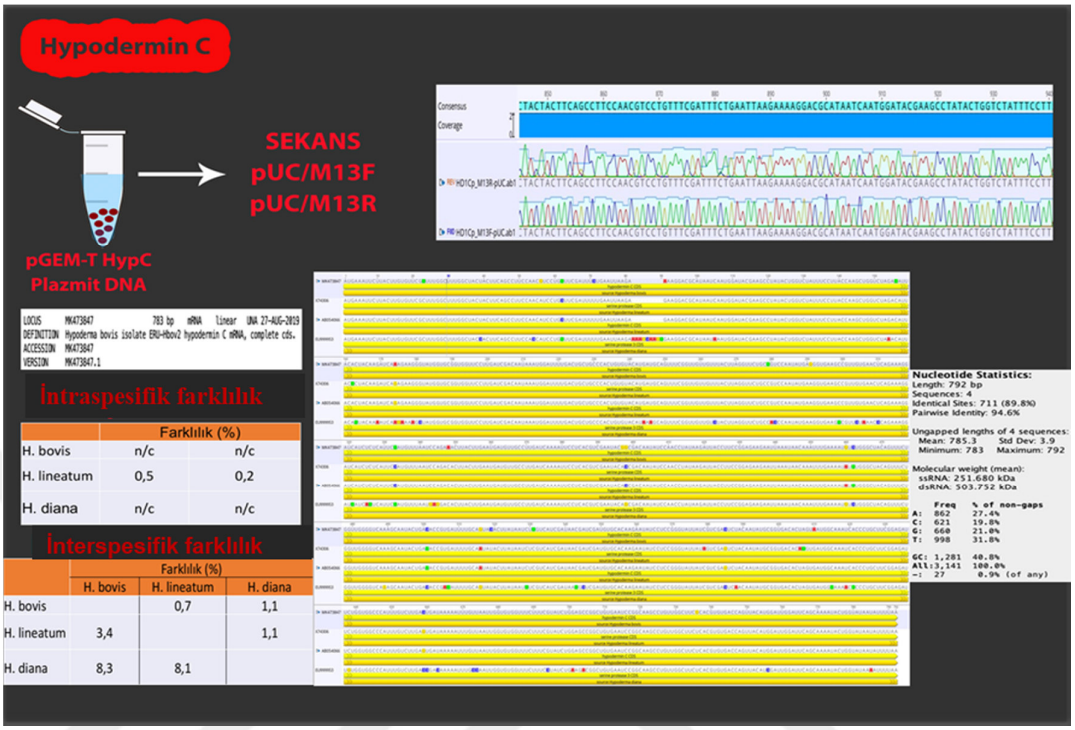


Şekil 4.13 HB geninin amino asit sekansı, intra ve inter-spesifik genetik farklılıklar

4.4.3 Hypodermin C

4.4.3.1 Nükleik Asit Sekans Karakterizasyonu

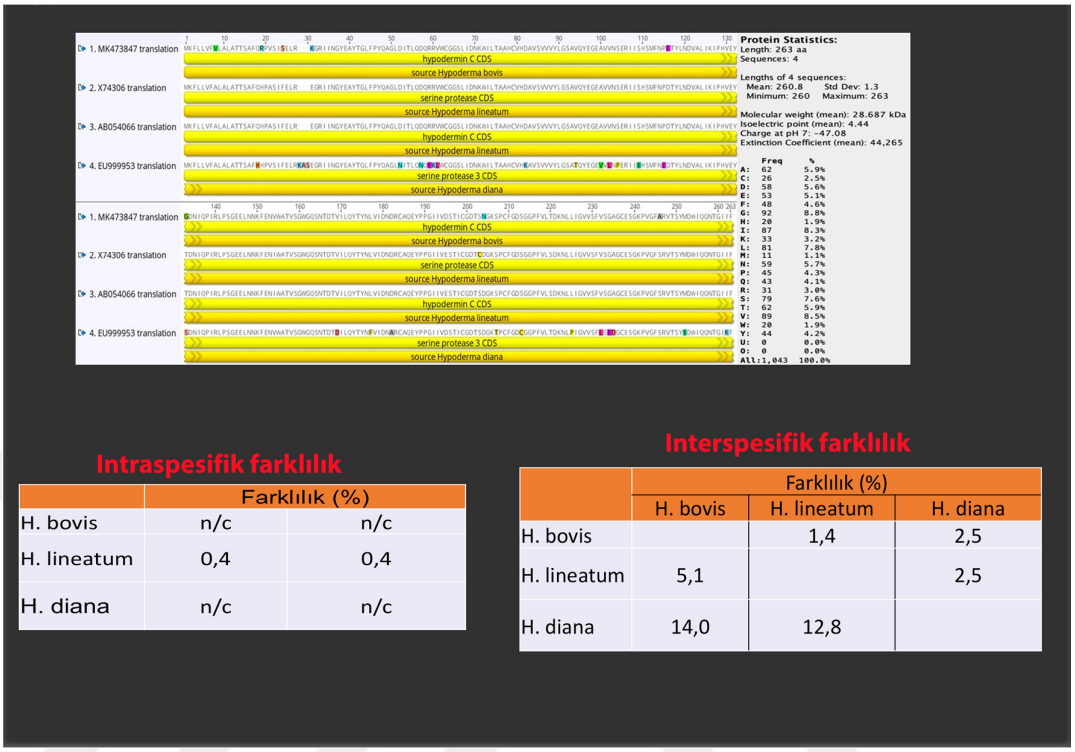
HC genini içeren rekombinant plazmidlerin sekanslanması sonucu kalite skoru yüksek sekans kromotogramları elde edilmiş ve her iki yöne okumalara ait kromotogramların DeNovo uygulaması üzerinden birleştirilmesi ile final konsensus sekanslar elde edilmiştir (Şekil 4.14). Konsensus sekans içerisinde HC geninin açık okuma çerçevesi sekansının 783 bp büyüklüğünde olduğu görülmüştür. Karakterizasyonu yapılan 10 izolata ait nükleotid sekanslarının birbirleriyle tamamen identik olduğu belirlenmiş ve ilgili sekans "MK473847" aksesyon numarası ile Dünya'dan ilk kayıt olarak GenBank veri tabanına yüklenmiştir. GenBank veri tabanında *H. lineatum*'a ait Fransa'dan (X74306) ve Japonya'dan (AB054066) bildirilmiş iki izolat ile *H. diana*'ya ait Polonya'dan (EU999953) bildirilmiş bir izolatın HC ORF sekanslarıyla karakterize ettiğimiz *H. bovis* HC ORF sekansı arasında inter-spesifik nükleotid farklılığı sırasıyla %3,4±0,7, %8,3±1,1 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 HC geninin nükleotid sekansı, intra ve inter-spesifik genetik farklılıklar

4.4.3.2 Amino Asit Sekans Karakterizasyonu

Çalışmada karakterize edilen HC geninin amino asit dizisinin 263 aa uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir. Amino asit sekansı içerisinde Glisin ve İzoleusin amino asitlerinin en yüksek oranda olduğu görülmüştür (Şekil 4.15). Amino asit dizilimlerinin inter-spesifik farklılığı incelendiğinde yukarıda bahsi geçen *H. lineatum* ve *H. diana* izolatları ile sırasıyla ortalama %5,1±1,4 ile %14,0±2,5 farklılık belirlenmiştir. Ayrıca GenBank veri tabanında mevcut olan iki *H. lineatum* HC geni arasında %0,4 oranında intra-spesifik farklılık olduğu görülmüştür.



	Farklılık (%)	
H. bovis	n/c	n/c
H. lineatum	0,4	0,4
H. diana	n/c	n/c

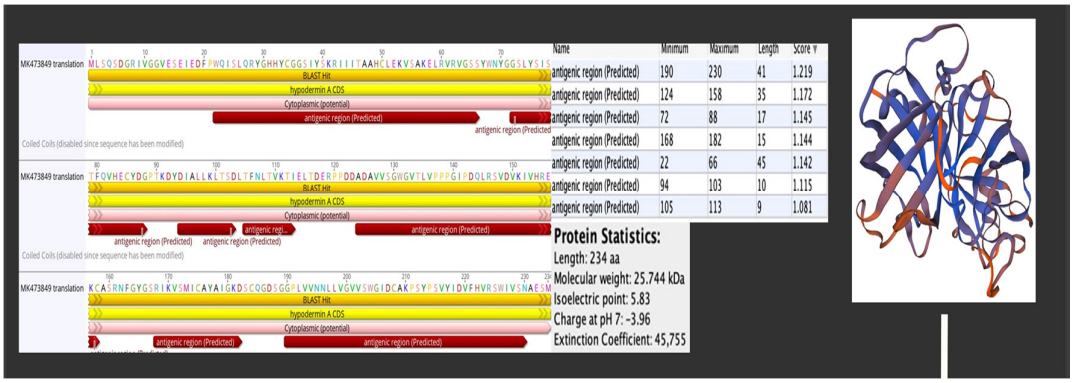
	Farklılık (%)		
	H. bovis	H. lineatum	H. diana
H. bovis		1,4	2,5
H. lineatum	5,1		2,5
H. diana	14,0	12,8	

Şekil 4.15 HC geninin amino asit sekansı, intra ve inter-spesifik genetik farklılıklar

4.5 Hypodermin Genlerinin Kodladığı Proteinlerin In-Silico Analiz Sonuçları

4.5.1 Hypodermin A

Hypoderma bovis HA genin in-silico analizleri sonucu ekprese ettiği proteinin özellikleri Şekil 4.16'da verilmiştir. *Hypoderma bovis* HA genin ekprese ettiği proteinin 25,744 kDa büyüklüğünde olduğu, transmembran bölge içermeyip tamamen sitoplazmik karakterde olduğu tespit edilmiştir. HA geninin ORF aminoasit sekansları içerisinde uzunluğu 9-45 aa arasında değişen 7 antijenik bölgeye sahip olduğu görülmüştür. Bunlar arasında 124-158 aa ile 190-230 aa arasında yer alan antijenik bölgelerin en yüksek skoru gösterdiği belirlenmiştir. İlgili proteinin izoelektronik noktasının 5.83 olduğu ve pH 7'de aktivasyon değerinin de -3,96 olduğu tespit edilmiştir. İlgili proteinin 3 boyutlu yapısı ve katlanma özellikleri de Şekil 4.16'da verilmiş ve antijenik bölgelerin daha çok proteinin dış yüzeyinde lokalize olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.16 HA proteinin in-silico özellikleri

4.5.2 Hypodermin B

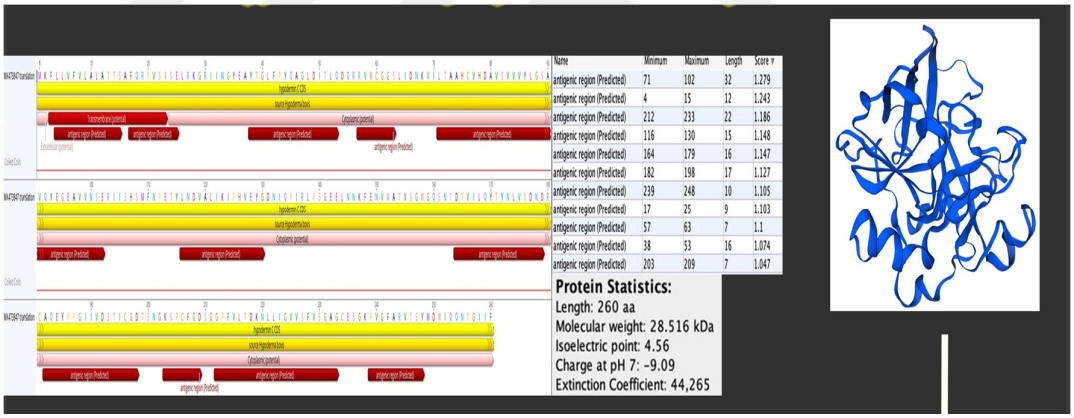
Hypoderma bovis HB genin in-silico analizleri sonucu ekprese ettiği proteinin özellikleri Şekil 4.17'de verilmiştir. *Hypoderma bovis* HB genin ekprese ettiği proteinin 27,795 kDa büyüklüğünde olduğu, üçüncü aminoasit Lyzin'den başlayan 22 aa uzunluğunda transmembran bölge içerdiği ve geri kalan kısmının sitoplazmik karakterde olduğu tespit edilmiştir. HB geninin ORF aminoasit sekansları içerisinde uzunluğu 7-26 aa arasında değişen 13 antijenik bölgeye sahip olduğu ve bunlar arasında 4-22 aa ile 212-227 aa arasında yer alan antijenik bölgelerin en yüksek skoru gösterdiği belirlenmiştir. İlgili proteinin izoelektronik noktasının 6.55 olduğu ve pH 7'de aktivasyon değerinin de -1,13 olduğu tespit edilmiştir. İlgili proteinin 3 boyutlu yapısı ve katlanma özellikleri de Şekil 4.17'da verilmiş ve antijenik bölgelerin daha çok proteinin dış yüzeyinde lokalize olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.17 HB proteinin in-silico özellikleri

4.5.3 Hypodermin C

Hypoderma bovis HC genin in-silico analizleri sonucu ekprese ettiği proteinin özellikleri Şekil 4.18'de verilmiştir. *Hypoderma bovis* HC genin ekprese ettiği proteinin 28,516 kDa büyüklüğünde olduğu, üçüncü aminoasit Fenilalanin'den başlayan 21 aa uzunluğunda transmembran bölge içerdiği ve geri kalan kısmının sitoplazmik karakterde olduğu tespit edilmiştir. HC geninin ORF aminoasit sekansları içerisinde uzunluğu 7-32 aa arasında değişen 11 antijenik bölgeye sahip olduğu ve bunlar arasında 4-15 aa ile 71-102 aa arasında yer alan antijenik bölgelerin en yüksek skoru gösterdiği belirlenmiştir. İlgili proteinin izoelektronik noktasının 4.56 olduğu ve pH 7'de aktivasyon değerinin de -9,09 olduğu tespit edilmiştir. İlgili proteinin 3 boyutlu yapısı ve katlanma özellikleri de Şekil 4.18'de verilmiş ve antijenik bölgelerin daha çok proteinin dış yüzeyinde lokalize olduğu belirlenmiştir.

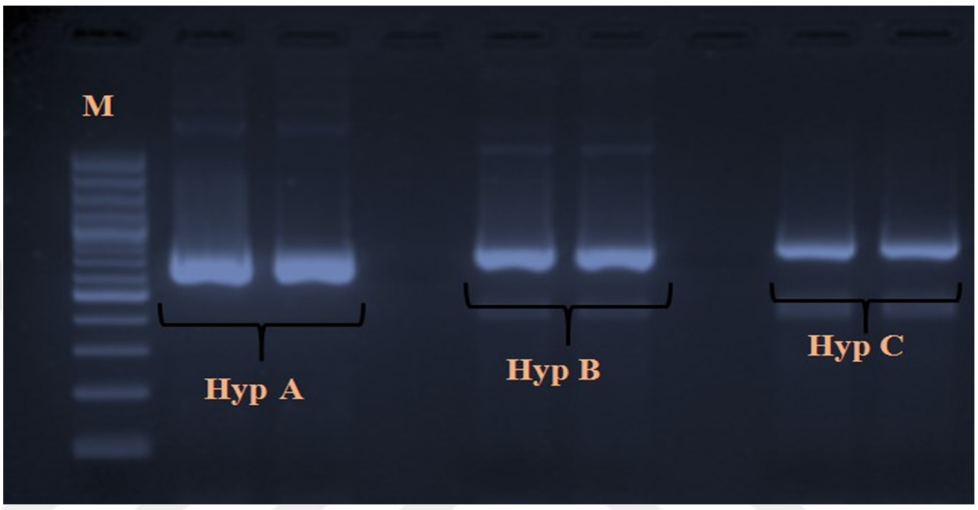


Şekil 4.18 HC proteinin in-silico özellikleri

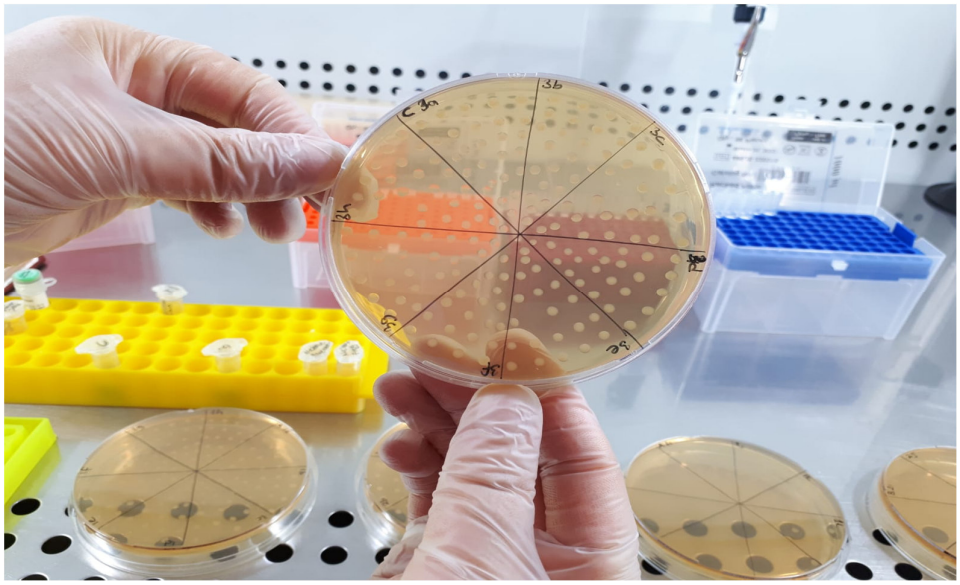
4.6 Hypodermin Genlerinin ORF Bölgesinin Amplifikasyonu ve Ekspresyon Vektörüne Klonlama Sonuçları

pGEM-T Easy-Hypodermin rekombinant plazmid DNA'lar kalıp olarak kullanılarak ORF bölgesinin ekspresyon analizleri için dizayn edilen primerlerle PCR analizleri sonucu her üç gen bölgesi için hedef büyüklükte PCR ürünleri agaroz jel üzerinde belirlenmiştir (Şekil 4.19). Jelden pürifiye edilen amplikonlar pET 100/D-TOPO ekspresyon vektörüne başarılı bir şekilde klonlanmış, LB katı besiyerinde üreyen kolonilerde (Şekil 4.20) vektör DNA'sı içerisine yerleşmiş olan hedef ORF gen bölgesi sekansları ve doğru oryantasyonları koloni PCR analizleri ile belirlenmiştir (Şekil 4.21). LB sıvı besiyerine aktarılan transformantların üremesini takiben çöktürülmüş

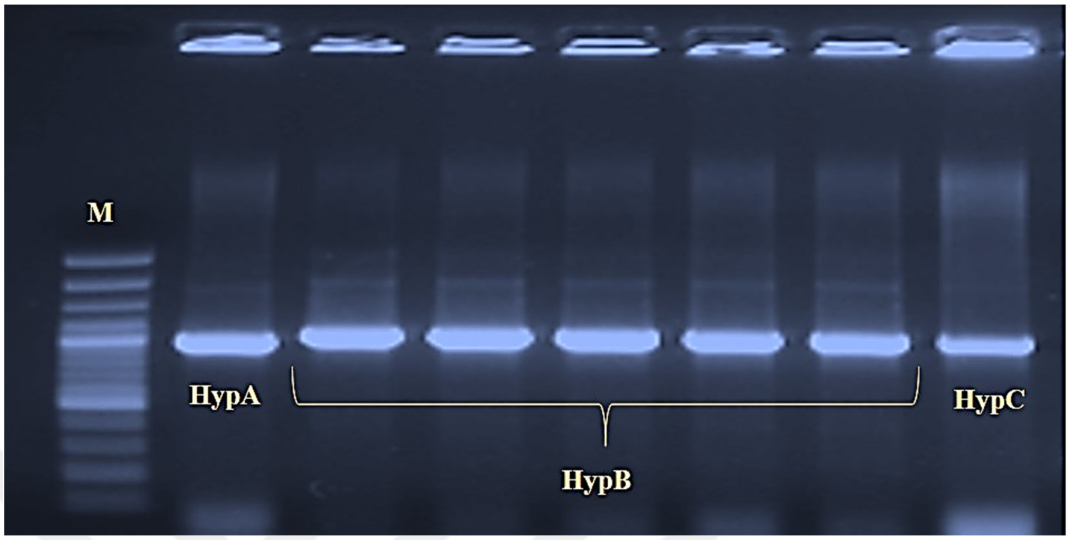
hücrelerden rekombinant plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Rekombinant plazmidlerde hedef genlerin varlığı vektör spesifik primerlerle teyit edilmiştir (Şekil 4.22). Her üç gen bölgesi için elde edilen pET 100/D-TOPO-Hypodermin plazmid DNA izolatları ekspresyon analizlerinde kullanılmıştır.



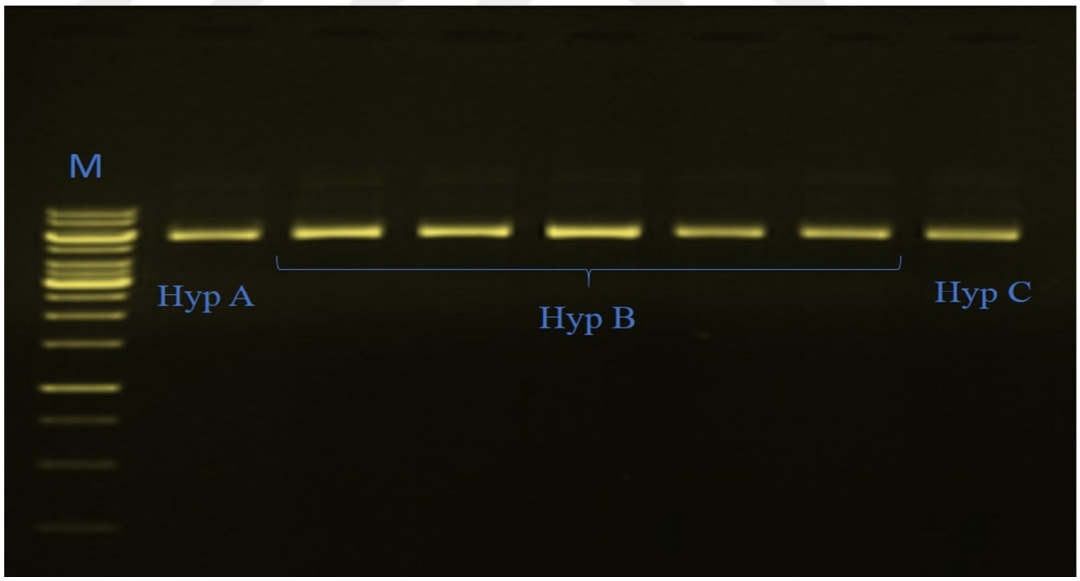
Şekil 4.19 Her üç gen bölgesi için hedef büyüklükte PCR ürünleri; M (100bp)



Şekil 4.20 pET 100/D-TOPO ekspresyon vektörüne klonlanma sonrası LB katı besiyerinde üreyen koloniler



Şekil 4.21 Transforme hücrelerde HA, HB ve HC genlerinin koloni PCR'ı sonucu amplikonların jel agarozda görünümü M: Marker (100bp)

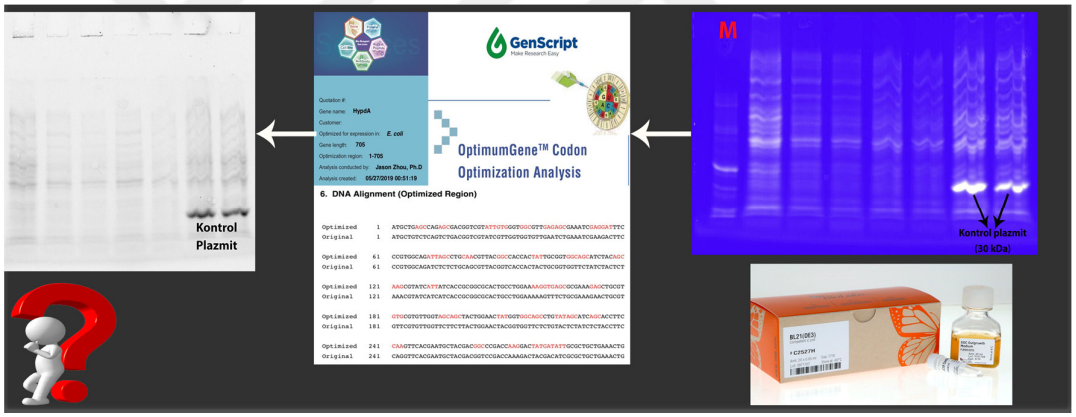


Şekil 4.22 pET 100/D-TOPO-Hypodermin plazmid DNA izolatlarının agaroz jelde görünümü M: Marker (1kb)

4.7 Hypodermin Genlerinin Ekspresyon Analiz Sonuçları

4.7.1 Hypodermin A

HA genini iceren rekombinant plazmidlerin BL21 Star (DE3) *E. coli* hucrelerine transformasyonunu takiben 0,5 mM ve 1 mM IPTG ile Magic Media medyumu kullanılarak tekrarlı indukleme denemelerinde SDS-PAGE analizlerinde ekspresyonun gerçekleşmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.23). Bu sonuçla bakteriyel ekspresyon sistemi ile kodon uyuşmazlığı göz önüne alınarak HA gen sekansının kodon optimizasyonu yapılarak GenScript (ABD) firmasına sentezletilmiştir. Optimize edilmiş HA geni pET 32a(+) ekspresyon vektörü içerisine yerleştirilerek tekrar ekspresyon denemeleri gerçekleştirilmiş ancak ilgili genin eksprese olmadığı görülmüştür (Şekil 4.23).

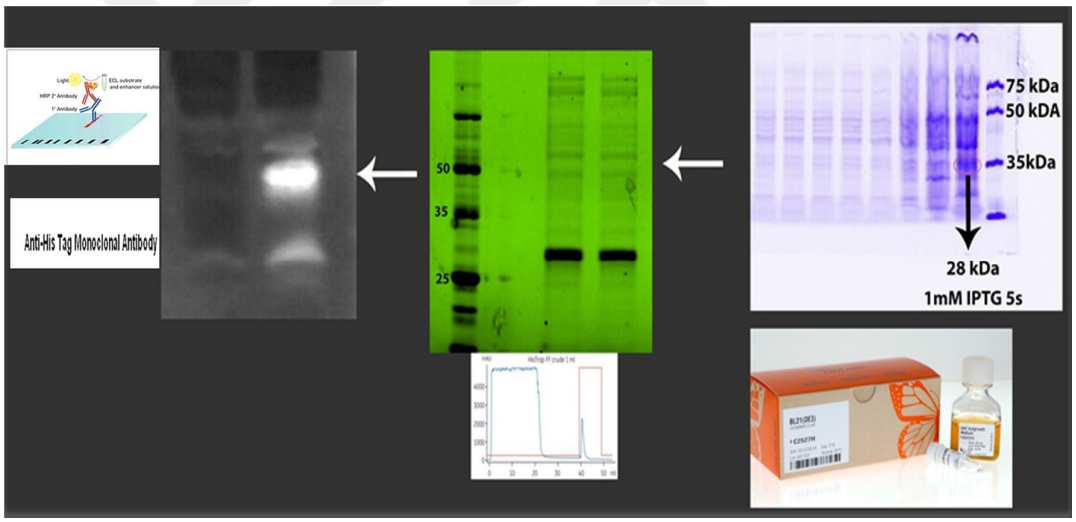


Şekil 4.23 HA geninin ekpresyon analizleri

4.7.2 Hypodermin B

HB genini iceren rekombinant plazmidlerin BL21 Star (DE3) *E. coli* hucrelerine transformasyonunu takiben ekspresyon denemelerinde 0,5 mM ve 1 mM IPTG konsantrasyonları ile Magic Media medyumu kullanılarak tekrarlı ekpresyon seviyeleri belirlenmiş ve SDS-PAGE analizleri sonucu jel üzerinde belirlenen hedef bantlar Şekil 4.24'de gösterilmiştir. Farklı IPTG konsantrasyonlarında proteinin ekprese olduğu görülmüş ve en iyi ekpresyon seviyesinin 1mM IPTG konsantrasyonda 5. saatte olduğu tespit edilmiştir. HB'nin SDS-PAGE jel üzerinde yaklaşık 28 kDa büyüklüğünde olduğu belirlenmiş ve bu sonucun in-silico analizlerle uyumlu olduğu görülmüştür. Ön ekspresyon denemelerini takiben HB rekombinant proteininin geniş hacimde eldesi için rekombinant plazmidler tekrar BL21 Star (DE3) *E. coli* hücrelerine transforme edilmiş

ve 200 ml LB besiyerinde hücreler kültüre edilmiştir. Kültürden 2 ml süspansiyon alınarak ön basamakta proteinin soluble veya insoluble karakterini belirlemek için yürütülen analizlerde HB'nin insoluble özellikte olduğu tespit edilmiştir. Takiben çöktürülmüş olan ana pelet insoluble proteinler için prosedürü takip ederek kimyasal ve mekanik parçalanmaya tabi tutulmuştur. Santrifüj işlemleri sonrası elde edilen süpernatant kromotografik sistemde 6xHis kolonlar ile saflaştırılmıştır. Pürifiye 6xHis ile işaretli HB rekombinant proteini Western Blot analizinde membranın bloklanmasından sonra Anti-His G-HRP antikoru ile PVDF membran üzerinde kemolüminesans görüntülemede spesifik reaksiyon verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.24). Saflaştırılan rekombinant proteinler serolojik tabanlı ELISA tekniğinde kullanılmak üzere uygun koşullarda muhafaza altına alınmıştır.

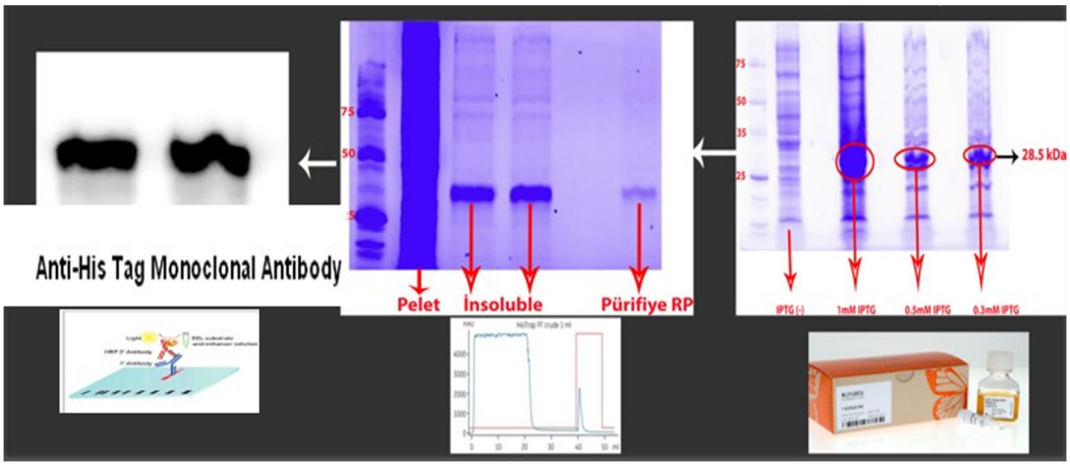


Şekil 4.24 HB geninin ekpresyon analizleri

4.7.3 Hypodermin C

HC genini iceren rekombinant plazmidlerin BL21 Star (DE3) *E. coli* hucrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimum indükleme süresini belirlemek için 0,3 mM, 0,5 mM ve 1mM IPTG konsantrasyonları ve Magic Media medyumu kullanılarak denemeler yapılmıştır. Farklı IPTG konsantrasyonlarında ekpresyon denemeleri SDS-PAGE analiz sonuçları ile teyit edilmiştir (Şekil 4.25). Şekil 4.25'te görüldüğü üzere 0,3 mM, 0,5 mM ve 1mM IPTG konsantrasyonlarında gerçekleştirilen denemelerde proteinin ekprese olduğu belirlenmiştir. En yüksek ekspresyon 1mM IPTG indüklemesi ile 4. saatte tespit edilmiştir. SDS-PAGE analizlerinde HC geninin in-silico analiz

sonuçlarıyla uyumlu olarak yaklaşık 28,5 kDa büyüklüğündeki proteini eksprese ettiği belirlenmiştir. Ön ekspresyon denemelerini takiben HC rekombinant proteininin geniş hacimde eldesi için rekombinant plazmidler tekrar BL21 Star (DE3) *E. coli* hücrelerine transforme edilmiş ve 200 ml LB besiyerinde hücreler kültüre edilmiştir. Kültürden 2 ml süspansiyon alınarak ön basamakta proteinin soluble veya insoluble karakterini belirlemek için yürütülen analizlerde HC'nin insoluble özellikte olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.25). Takiben çöktürülmüş olan ana pelet insoluble proteinler için prosedürü takip ederek kimyasal ve mekanik parçalanmaya tabi tutulmuştur. Santrifüj işlemleri sonrası elde edilen süpernatant kromotografik sistemde 6xHis kolonlar ile saflaştırılmıştır. Pürifiye 6xHis ile işaretli HC rekombinant proteini Western Blot analizinde membranın bloklanmasından sonra Anti-His G-HRP antikoru ile muamale edilmiş ve ECL substrat ilave edilerek kimyasal reaksiyona girmesiyle membran üzerindeki proteinin varlığı gösterilmiştir (Şekil 4.25). Saflaştırılan rekombinant proteinler serolojik tabanlı ELISA tekniğinde kullanılmak üzere uygun koşullarda muhafaza altına alınmıştır.

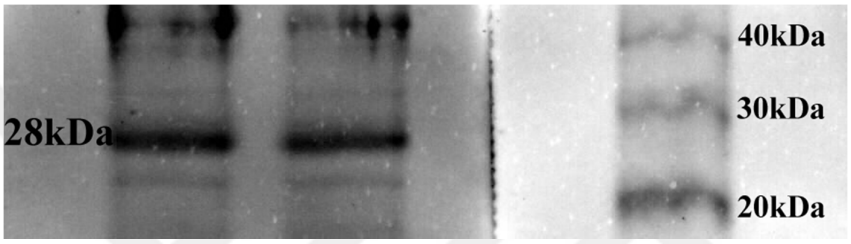


Şekil 4.25 HC geninin ekpresyon analizleri

4.8 Rekombinant Hypodermin Antijenlerinin İmmun Reaktivite Analiz Sonuçları

4.8.1 Rekombinant Hypodermin B Antijeni

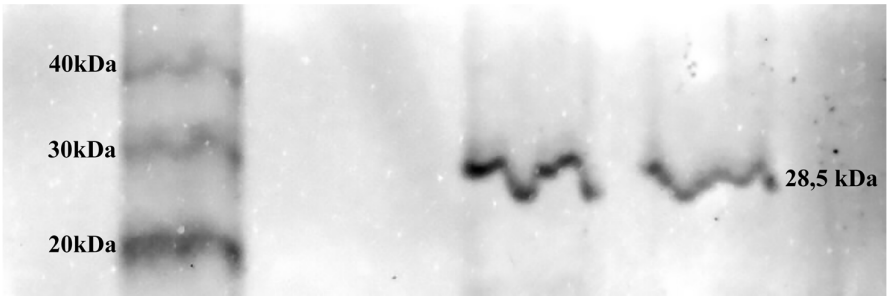
rHB antijeni kullanılarak yapılan SDS-PAGE ve Western Blot analizlerinde *H. bovis* ile enfeste iki sığır serumunun 1/200 dilüsyonları ile immun reaktivite gösterdiği ECL görüntüleme ile membran üzerinde belirlenmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 rHB antijeninin enfeste sığır serumları ile PVDF membran üzerinde immun reaktifliği

4.8.2 Rekombinant Hypodermin C Antijeni

rHC antijeni kullanılarak yapılan SDS-PAGE ve Western Blot analizlerinde *H. bovis* ile enfeste iki sığır serumunun 1/200 dilüsyonları ile immun reaktivite gösterdiği ECL görüntüleme ile membran üzerinde belirlenmiştir (Şekil 4.27).

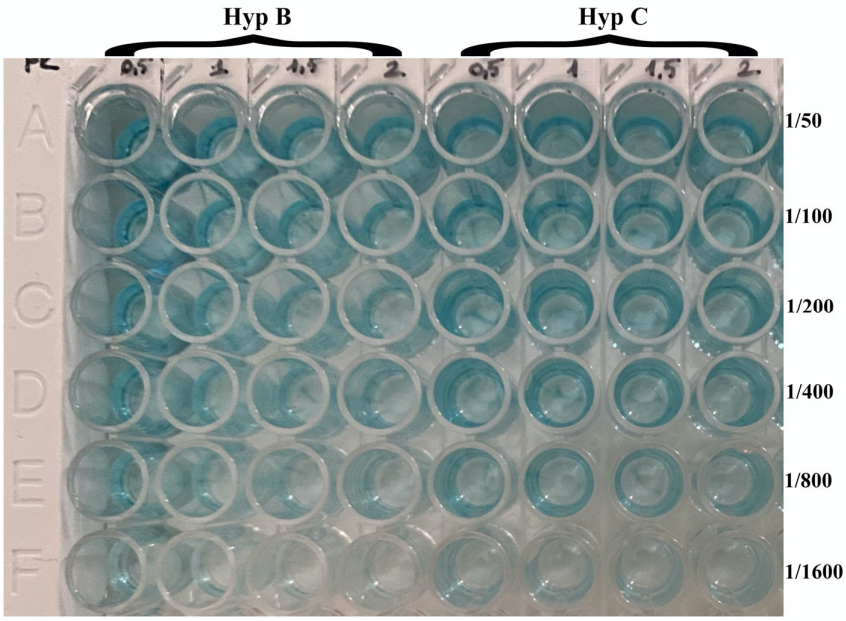


Şekil 4.27 rHC antijeninin enfeste sığır serumları ile PVDF membran üzerinde immun reaktifliği

4.9 Rekombinant Antijen ve Peptid Tabanlı ELISA Analiz Sonuçları

4.9.1 Rekombinant Hypodermin B ve C Antijenleri ile Checkerboard Titrasyon ve ROC Analiz Sonuçları

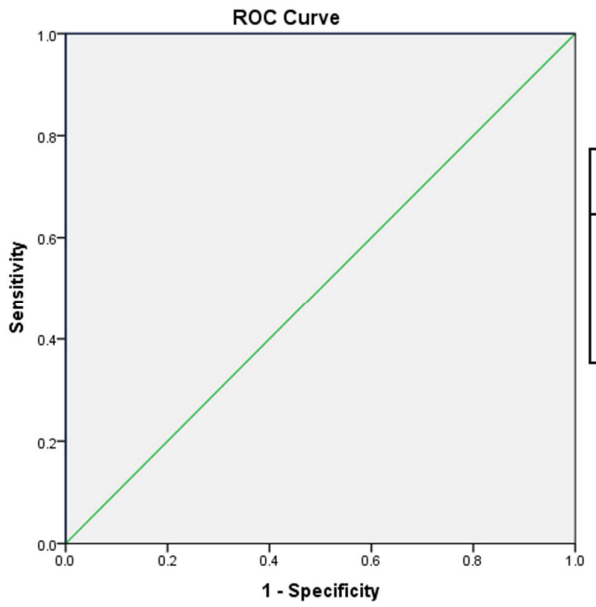
Hypoderma bovis ile enfeste sığır serumu kullanılarak her iki Hypodermin antijeni için yapılan Checkerboard Titrasyon analizlerinde her iki rekombinant antijenin de immun reaktivite gösterdiği (Şekil 4.28) ve bunların arasında en düşük serum sulandırmasında (1/1600) HC antijeninin en yüksek OD değerine sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.4). Bu yönüyle serolojik taramalar için rHC antijeni hedef olarak seçilmiş ve uygun konsantrasyonda cutt-off değerinin belirlenmesi için ROC analizleri uygulanmıştır. Pozitif ve negatif kontrol serumlarının farklı dilüsyonları (1/50-1/1600) ile yapılan ROC analizlerinde HC antijeninin 0,5 µg konsantrasyonunun 1/100 ve 1/200 serum dilüsyonlarında en yüksek sensitivite ve spesifite gösterdiği ve bu konsantrasyonda cut-off değerinin 0,67 olduğu saptanmıştır (Şekil 4.29).



Şekil 4.28 rHB ve rHC antijenleri ile Checkerboard Titrasyon sonucu ELISA pleytlerinde gelişen reaksiyonlar

Tablo 4.4 rHB ve rHC antijenleri ile Checkerboard Titrasyon sonucu ELISA'da belirlenen OD değerleri

Kuyucuk	Serum dilüsyonları	HB				HC			
		0,5 µg	1 µg	1,5 µg	2 µg	0,5 µg	1 µg	1,5 µg	2 µg
A	1/50	1,100	1,063	1,005	0,995	1,115	0,951	1,003	1,054
B	1/100	1,012	0,857	0,935	0,875	1,074	0,988	1,064	0,996
C	1/200	0,801	0,713	0,863	0,714	0,993	0,885	0,901	0,899
D	1/400	0,705	0,639	0,707	0,649	0,896	0,794	0,800	0,790
E	1/800	0,565	0,405	0,489	0,431	0,793	0,695	0,704	0,700
F	1/1600	0,351	0,297	0,306	0,358	0,690	0,601	0,622	0,615



Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): HypC 0.5

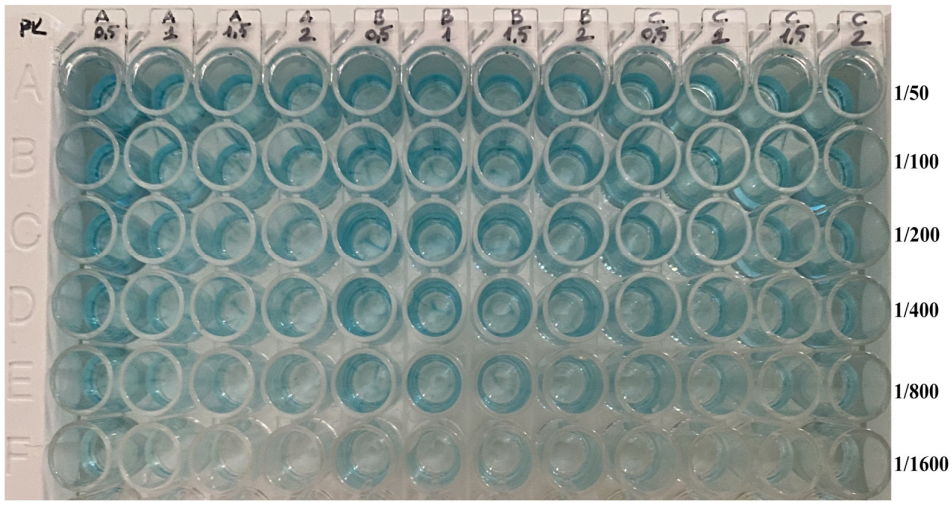
Positive if Greater Than or Equal To[a]	Sensitivity	1 - Specificity
-.6320	1.000	1.000
.3785	1.000	.500
.6680	1.000	.000
.9490	.750	.000
.9740	.500	.000
.9985	.250	.000
2.0000	.000	.000

a. The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.

Şekil 4.29 rHC antijeninin farklı serum dilüsyonları ile elde edilen OD değerlerinin ROC analizi sonucu belirlenen cut-off değerleri ve istatistiksel analizi

4.9.2 Hypodermin A, B ve C Peptidleri ile Checkerboard Titrasyon Analizleri

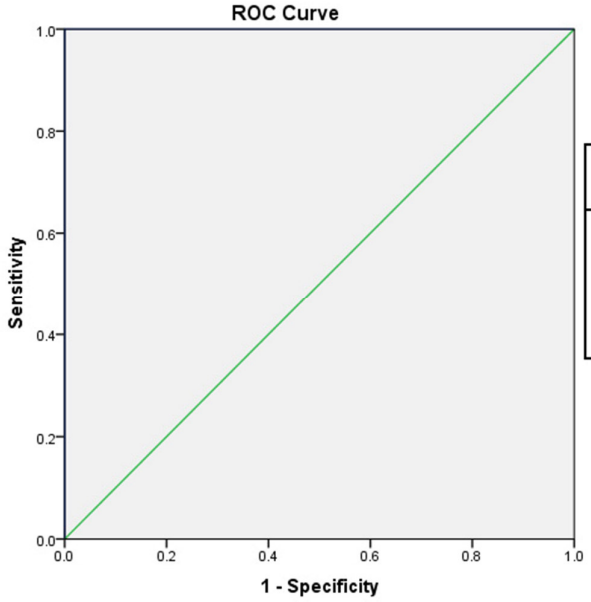
Hypoderma bovis ile enfeste sığır serumu kullanılarak HA, HB ve HC peptidleri ile yapılan Checkerboard Titrasyon analizlerinde her üç peptidin de immun reaktivite gösterdiği (Şekil 4.30) ve bunların arasında en düşük serum sulandırmasında (1/1600) HC peptidinin en yüksek OD değerine sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.5). Bu yönüyle serolojik taramalar için HC peptidi hedef olarak seçilmiş ve uygun konsantrasyonda cutt-off değerinin belirlenmesi için ROC analizleri uygulanmıştır. Pozitif ve negatif kontrol serumlarının farklı dilüsyonları (1/50-1/1600) ile yapılan ROC analizlerinde HC peptidinin 2 µg konsantrasyonunun 1/100 ve 1/200 serum dilüsyonlarında en yüksek sensitivite ve spesifite gösterdiği ve bu konsantrasyonda cut-off değerinin 0.63 olduğu saptanmıştır (Şekil 4.31).



Şekil 4.30 HA, HB ve HC peptidleri ile Checkerboard Titrasyon sonucu ELISA pleytlerinde gelişen reaksiyonlar

Tablo 4.5 pHA, pHB ve pHC ile Checkerboard Titrasyon sonucu ELISA'da belirlenen OD değerleri

Kuyucuk	Serum dilüsyonları	pHA				pHB				pHC			
		0,5µg	1µg	1,5µg	2µg	0,5µg	1µg	1,5µg	2µg	0,5µg	1µg	1,5µg	2µg
A	1/50	1,115	1,001	1,132	0,991	1,039	1,138	1,137	1,089	0,976	0,951	1,107	1,096
B	1/100	1,047	0,914	0,848	0,93	1,022	1,16	1,147	1,027	0,951	0,988	1,056	0,901
C	1/200	0,83	0,701	0,749	0,726	0,998	1,017	0,955	0,903	1,074	1,065	1,119	0,938
D	1/400	0,725	0,696	0,702	0,684	0,868	0,852	0,849	0,87	0,896	0,993	1,004	0,895
E	1/800	0,58	0,493	0,52	0,469	0,677	0,708	0,609	0,663	0,793	0,777	0,866	0,780
F	1/1600	0,339	0,278	0,263	0,251	0,356	0,364	0,359	0,383	0,526	0,446	0,511	0,695



Coordinates of the Curve
Test Result Variable(s): pHA, pHB,pHC HypC2.0son

Positive if Greater Than or Equal To[a]	Sensitivity	1 - Specificity
-.6320	1.000	1.000
.3785	1.000	.500
.6295	1.000	.000
.9095	.750	.000
.9600	.500	.000
1.0655	.250	.000
2.1600	.000	.000

a. The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.

Şekil 4.31 pHA, pHB ve pHC ile Checkerboard Titrasyon sonucu ELISA pleytlerinde gelişen reaksiyonlar cut-off değerleri ve istatistiksel analizi

4.10 Sığır Serum Örneklerinde Hypodermosis Seropozitifliği Sonuçları

Çalışmada rHC antijeni ve pHC ile belirlenen antijenik konsantrasyonlarda (rekombinant antijen 0,5 µg; peptid 2 µg) 1/200 serum dilüsyonunda yürütülen ELISA'da Anabilim Dalı cryobankında muhafaza edilmekte olan toplam 200 sığır serum örneği incelenmiş ve her iki ELISA yönteminde de aynı sonuçlar elde edilmiş olup seroprevalans %62 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.6). Yaş gruplarına göre sığırlarda *H. bovis* seropozitifliği en yüksek %73,4 ile 5-7 yaş grubunda belirlenmiş bunu sırasıyla %72,7 ve %29,2 ile 2-4 yaş ile 1-2 yaş grupları izlemiştir (Tablo 4.6). Yaş gruplarına göre *H. bovis* seropozitiflik dağılımında 1-2 yaş grubu ile 2-4 ve 5-7 yaş grupları arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunurken ($p<0,05$) 2-4 ve 5-7 yaş grupları arasındaki farklılık önemsiz belirlenmiştir ($p>0,05$). Erkek ve dişi sığırlar ile ırk grupları arasında seroprevalans oranları birbirlerine benzer bulunmuş olup (Tablo 4.6) cinsiyete ve ırka göre istatiksel bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.6 Sığır serum örneklerinde *H. bovis* seropozitifliğinin dağılımı ve istatistiksel analizi

Faktör	**İncelenen Hayvan Sayısı**	**Seropozitiflik**		**χ^2**	**p**
		Sayı	**%**		
Yaş (yıl)					
1-2	48	14	29,2[a]	28,976	0,000
2-4	73	52	71,2[b]		
5-7	79	58	73,4[b]		
Cinsiyet					
Erkek	88	54	61,4	0,027	0,884
Dişi	112	70	62,5		
Irk					
Simental	42	26	61,9	0,022	1,000
Holstein	48	30	62,5		
Montofon	34	21	61,8		
Yerli Kara	36	22	61,1		
Melez	40	25	62,5		
Toplam	200	124	62,0		

[a,b]: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasındaki istatistiksel farklılık önemlidir ($p>0,001$)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hypodermosis, özellikle Kuzey Yarımkürede sığırların ekonomik olarak önemli paraziter hastalıklarından birisidir. Bu hastalık özellikle karkas verimliliğini azaltmakta ve enfeste sığırlarda verim kayıplarına yol açmaktadır (Soulsby, 1982). *Hypoderma* larvaları ayrıca üçüncü dönemlerinde deride oluşturdukları hasarla dericilik endüstrisinde de büyük ekonomik kayıplara sebebiyet vermektedir. Bu yönüyle hastalığın çeşitli ülkelerde yıllık 22 milyon Amerikan Dolardan fazla kayıplara yol açtığı rapor edilmiştir (Khan ve ark., 2006). Türkiye'de bu hastalığın yaygınlığı üzerine gözlem ve mezbaha incelemeleriyle çeşitli araştırmalar yapılmış olmakla birlikte ortaya çıkan ekonomik kayıbın derecesi net olarak bilinmemektedir. Afyonkarahisar'da yapılan bir çalışmada, Cicek ve ark. (2011) 6.598 sığırda hypodermosis'e bağlı deri tahribatı sonucu oluşan ekonomik kaybı yaklaşık 18.288 TL (12.192 Amerikan Doları), Sayin Ipek ve Diker (2016), Diyarbakır'da farklı bölgelerde bulunan mezbahanelerdeki hayvan sayılarını baz alarak tahmini 9.210 hayvanda 101.310 TL (47.563 Amerikan Doları), Taşcı ve ark. (2018), Kars'da, 1.114 hayvanda 18.615 TL (yaklaşık 5.170 Amerikan Doları) ve aynı zamanda Kars platosundaki toplam 132.419 sığır populasyonunda tahmini ekonomik zararı 407.507 TL (113,000 Amerikan Doları) olarak rapor etmişlerdir. İlgili çalışmaların sonuçlarına bakıldığında hypodermosis'in deride meydana getirdiği tahmini ekonomik kayıplar arasında farklılıklar gözükmektedir. Bunun sebepleri arasında, çalışma yıllarındaki döviz kuru değeri, incelenen hayvan sayıları ve prevalans oranlarındaki farklılıklar sayılabilir. TÜİK'in 2019 verilerine göre, Türkiye'de toplam sığır sayısı yaklaşık 17 milyon civarındadır. Hayvan sayısı dikkate alındığında, Türkiye'de hypodermosis prevalansının artması durumunda dericilik sektörüne vereceği mali kayıpların ciddi boyutlara ulaşması demektir. Bu yüzden hastalığın mali açıdan etkisinin değerlendirilmesi ve multidisipliner iş birlikleri kurularak büyük ölçekli ortak proje yaklaşımlarına ihtiyaç olduğu gözükmektedir. Nitekim, deri, et ve süt verim kayıpları başta olmak üzere

Türkiye ekonomisi için önem arz eden konulardan biri olan hypodermosis'in bütün olarak ele alınması gerektiği düşünülmektedir. Ülkemizin çeşitli bölgelerinde yapılan gözlem ve palpasyona dayalı çalışmalarda hypodermosis'in %5,3-68 arasında yaygınlık gösterdiği kaydedilmiştir (Zeybek, 1988; Celep ve ark., 1994; Kara ve ark., 2005; Cicek ve ark., 2011). Diğer yandan mezbaha incelemelerinde ise bu oran %0,3-35,9 olarak rapor edilmiştir (El-Metanawy ve Zayed, 1992; Ozdal ve Deger, 2005; Karatepe ve Karatepe, 2008; Cicek ve ark., 2011). Çalışmamızda mezbaha incelemesi yapılan 150 sığırın 15'i (%10,0) hypodermosis ile enfeste belirlenmiş olup bu oranın ülkemizden rapor edilen prevalans sınırları içerisinde yer aldığı dikkati çekmiştir. Mezbaha incelemelerine göre yürütülen tüm bu araştırmalar Türkiye'de *H. bovis* ve *H. lineatum* olmak üzere iki türün yaygınlık gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Çalışmamızda enfeste belirlenen tüm hayvanlardan elde edilen 3. dönem larvaların morfolojik ve moleküler identifikasyonlarla *H. bovis* türüne ait olduğu görülmüştür. Nitekim yapılan bazı araştırmalarda *H. bovis* baskın tür olarak belirlenirken diğer bazı araştırmalarda ise *H. lineatum*'un daha yaygın olduğu dikkati çekmiştir (Panadero ve ark., 2000a; Ahmed ve ark., 2013; Yadav ve ark., 2013). Diğer bazı çalışmalarda ise her iki türün miks olarak enfestasyon oluşturduğu da görülmektedir (Karatepe ve Karatepe, 2008; Ahmed ve ark., 2017).

Tıbbi öneme sahip birkaç parazitin genom dizilerinin ortaya çıkarılmış olması, bu parazitlerin biyolojilerini anlamada önemli ilerlemelere yol açmış ve biyoteknolojik kontrol noktasında da potansiyel hedeflerin belirlenmesine olanak sağlamıştır (de Azevedo ve Soares, 2009). Ayrıca, genom dizileme teknolojisinde devam eden gelişmeler, hemen hemen her ilgili alanda benzer hedeflerin gerçeklemesi için büyük umut vaat etmektedir (Coombs, 2008). Virüsler ve bakteriler gibi insan ve veteriner hekimlik açısından önem taşıyan diğer patojenlerle karşılaştırıldığında, parazitlerin virülans ve patogenez mekanizmaları hakkındaki mevcut bilgide halen büyük bir boşluk mevcut olup, aşılama veya tedavi yoluyla paraziter hastalıkların eradikasyonu veya kontrolü için etkin metodolojilerin uzak gelecekte gerçekleşebileceği öngörülmektedir. Bu genomların içerisinden çıkarılarak identifiye edilen ilgili hedef genlerin karakterizasyonu ve potansiyel etkilerinin belirlenebilmesi, uygun protein ekspresyon sistemlerinin eksikliği nedeniyle birçok parazit için net olarak ortaya konulamamıştır. Bu duruma en iyi örnek, sıtmanın etiyolojik ajanı olan *Plasmodium falciparum* olup bu

protozoon için ruhsatlandırılmış etkili bir biyoteknolojik aşı bulunmamakta ve ilaca dirençli suşların hızlı bir şekilde ortaya çıkması da çoğu müdahale girişimini son derece zorlaştırmaktadır (Greenwood ve ark., 2008). Bu nedenle, parazitlerden rekombinant proteinlerin ekspresyonu için yenilikçi ve etkin sistemlerin geliştirilmesi, acil bir veteriner ve halk sağlığı meselesi haline gelmiş olup oldukça önem arz etmektedir. Rekombinant proteinler, tanı araçlarının geliştirilmesi, aşılama için immünojenlerin belirlenmesi ve parazitlerdeki hedef proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının ortaya çıkarılması gibi çok sayıda uygulama için gereklidir. Etiyolojik ajanın hızlı ve başarılı tanısı, paraziter hastalıkların etkin kontrolünde anahtar bir role sahip olup antiparaziter ilaçların gereksiz kullanımından kaçınılmasında ve dolayısıyla da ilaç-dirençli suşların gelişiminin engellenmesinde de oldukça önemlidir. Tanı araçlarının geliştirilmesi, ya belirli bir gelişim evresindeki yeterli miktardaki paraziti ya da ilgili gelişim evrelerinde ekprese olan hedef proteinleri gerektirir (Murray ve Bennett, 2009; Seitzer ve ark., 2008). Hedeflenen proteinler için, rekombinant proteinler doğal eşdeğerleri temsil etmelidir. Aksi takdirde, diagnostik testin çalışma performansı olumsuz etkilenebilir (Lee ve ark., 2006). Malaria, trypanosomiasis, babesiosis, leishmaniasis, echinococcosis, taeniasis, fascioliasis, schistosomiasis, onchocerciasis, haemonchosis ve toxocariasis gibi birçok paraziter hastalığın teşhisi rekombinant antijen tabanlı tekniklerle yapılabilmektedir (Hunfeld ve ark., 2008; Hewitson ve ark., 2009; Fernández-Robledo ve Vasta, 2010; Hewitson ve Maizels, 2014). Aşı, herhangi bir hastalık için en çok arzu edilen profilaktik yöntemdir. Direkt parazitlerden izole edilen proteinlerin aşı olarak kullanımı, rekombinant proteinlere göre daha avantajlıdır, çünkü organizmaya özgü tüm yapısal ve immünojenik özellikleri barındırmaktadır. Bununla birlikte, gerekli saflıkta ve miktarda olma gereksinimleri, aşı olarak kullanımlarında sınırlayıcı bir faktör olmuştur. İlaveten, ilgili proteinin polimorfizm göstermesi tekrarlanabilirliği düşük aşılara da neden olabilir. *Plasmodium, Toxoplasma, Cryptosporidium, Theileria, Babesia canis, Eimeria, Haemonchus contortus, Ancylostoma caninum, Taenia ovis* ve *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* gibi parazitler için seçilen çoğu subunit aşılar, rekombinant antijenin üretimine dayanır (Fernández-Robledo ve Vasta, 2010; Kebede ve ark., 2016; Noon ve Aroian, 2017). Ayrıca, tüm organizma aşıları ile karşılaştırıldığında, subunit aşıların üretim süreçlerindeki doğal güvenlik riskleri çok daha düşüktür. Önemli parazit enzimlerini etkin ve spesifik olarak hedeflemek için yeni yaklaşımlar geliştirilmektedir (Ripley,

2007). Ancak, hedeflenen proteinlerin fonksiyonlarının kesin olarak tescillenmesi, bu proteinlerin biyokimyasal, biyofiziksel ve fonksiyonel karakterizasyonunu gerektirir (Fatumo ve ark., 2009). Rekombinant antijenlerin bu denli önemlerine karşı günümüze kadar Türkiye'de paraziter hastalıklar üzerine başta theileriosis (Bilgic ve ark., 2016; Nural ve ark., 2016), babesiosis (Ciloglu ve ark., 2018), leishmaniosis (Ozensoy ve ark., 1998; Zeyrek ve ark., 2007) ve echinococcosis (Korkmaz ve ark., 2004; Kilimcioğlu ve ark., 2013) olmak üzere diagnostik ve aşı etkinliği tabanlı sınırlı sayıda çalışmalar yapılmıştır. Sığırların en önemli myiasis etkenlerinden birisi olan *H. bovis* üzerine rekombinant antijen tabanlı yürütülen bu tez çalışması hem Türkiye hem de dünya literatürü için ilk moleküler verileri sağlamış ve hastalığın rekombinant antijen tabanlı serolojik teşhisi noktasında yaygın etki gösterecek biyoteknolojik yaklaşım tarzı ortaya çıkarmıştır.

Bu çalışmada, rekombinant antijenler üzerine araştırmalara başlanmadan önce morfolojik identifikasyonları yapılan *H. bovis* L3'lerinin mt-COI barkod gen bölgesinin sekans analizleriyle karakterizasyonları yapılmış ve filogenetik yapılanmaları ortaya çıkarılmıştır. DNA barkodlama, bir veya birkaç kısa standart DNA bölgesi kullanılarak hızlı ve doğru tür identifikasyonunu sağlayan bir moleküler yaklaşım olup birçok organizmanın tür düzeyinde efektif olarak tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Virgilio ve ark., 2010; Chakraborty ve ark., 2014). Yeterli uzunluktaki (800 bp'yi geçmeyen) ideal bir barkod gen bölgesi, evrensel primer çifti kullanılarak kolayca çoğaltılabilir ve tüm türler arasında ayrımı sağlayacak değişkenlikte olmalıdır (Hebert ve ark., 2003). Mitokondriyal (COI, 16S rRNA) ve nükleer genler (18S rRNA; ITS bölgeleri) gibi çeşitli DNA bölgeleri uygun potansiyel barkodlar olarak kullanılmıştır (Chen ve ark., 2012; Xia ve ark., 2012; Giudicelli ve ark., 2015). Bu genler arasında, 658 bp'lık mt-COI bölgesi, tüm hayvan taksonları için evrensel ve standart bir belirteç olarak kabul edilmektedir (Hebert ve ark., 2004; Hajibabaei ve ark., 2006). Son 10 yıl boyunca moleküler araçlar, özellikle mt-COI DNA barkodları, kene (Zhang ve Zhang, 2014; Zhang ve ark., 2017), sivrisinek (Murugan ve ark., 2016; Vadivalagan ve ark., 2017; Karthika ve ark., 2018) ve *Culicoides* türleri (Pages ve ark., 2009; Nielsen ve Kristensen, 2015; Yildirim ve ark., 2019) gibi birçok medikal ve veteriner önemi olan artropodların identifikasyonunda ve kriptik türlerin varlığını ortaya çıkarmada etkin olarak kullanılmıştır. Diğer yandan *Hypoderma* türleri için mt-COI

barkod sekansları üzerine GenBank veri tabanında sınırlı sayıda kayıt bulunduğu ve filogenetik ilişkileri üzerine de mevcut verilerin sınırlı olduğu görülmüştür. Çalışmamızda sekans analizleri ile toplam 52 izolatın mt-COI barkod sekansları (658 bp) kayıpsız olarak elde edilmiş olup yapılan haplotip analizleri sonucu birbirine yakın iki *H. bovis* haplotipin (ERU-Hbov1, ERU-Hbov2) varlığı ortaya çıkarılmıştır. Sekanslanan izolatlar arasında ERU-Hbov1 haplotipinin daha yaygın olduğu belirlenmiş ve bu iki haplotip arasında %0,6 genetik farklılık bulunduğu görülmüştür. Bunun yanında farklı coğrafik bölgelerden bildirilen izolatlarla birlikte yapılan filogenetik analizlerde de intraspesifik genetik farklılığın %0,2-0,8 arasında olması, *H. bovis*'in monofiletik bir yapılanma içerisinde genetik çeşitliliğinin yüksek olmadığına dair kanıtlar ortaya çıkarmıştır. Nitekim çalışmada belirlenen iki haplotip, birbirlerine coğrafik olarak oldukça uzak bulunan Çin ve İspanya'dan rapor edilen *H. bovis* izolatıyla sırasıyla %99,2 ile %99,5 benzerlik göstermiştir. Ancak bu görüşün desteklenmesi noktasında dünyanın farklı bölgelerinden geniş sayıda izolatın incelenerek özellikle mitogenom bazlı filogenetik ilişkilerin ortaya çıkarılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Diğer yandan *H. bovis*'in yakın tür olan *H. lineatum* ile %4,1 interspesifik farklılık gösterdiği belirlenmiş olup, bu sonuç da mt-COI barkodlamasının tür ayrımlarında yukarıda da bahsedildiği üzere etkin bir marker olduğunu destekler veriler ortaya koymuştur. Türkiye'de ayrıca *H. bovis*'in Elazığ, Tokat, Samsun, Ordu, Sinop ve Amasya yörelerinden elde edilmiş izolatlarına ait mt-COI sekansları bulunmaktadır. Ancak ilgili izolatlara ait mt-COI sekansları barkod bölgenin dışında kaldığı için çalışmada karakterize ettiğimiz haplotiplerle genetik ilişkilerinin karşılatırılması mümkün olmamıştır. Bu açıdan Türkiye'de *Hypoderma* türlerinin genetik çeşitliliğinin ortaya çıkarılması noktasında farklı bölgelerden geniş sayıda örneklemler ile özellikle mitogenom bazında çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Hypoderma türlerinin L1'leri göçleri esnasında HA, HB ve HC olmak üzere üç adet serin proteazı salgılar (Moiré ve ark., 1994). Bu proteolitik enzimler sadece konak dokusuna invazyonda değil aynı zamanda konağın immun yanıtından (hem spesifik hem de spesifik olmayan) kaçmada da önemli rol oynarlar (Moiré, 1998). Bu serin proteazlarını kodlayan cDNA sekansları *H. lineatum* (HA: L24914; HB: L24915; HC: AB054066) ve *H. diana* (HC: EU999953) türleri için karakterize edilmiştir. Ülkemizde de yaygın olan *H. bovis* için her üç hypodermin geninin ilgili proteinleri kodlayan

sekansları ilk kez bu tez çalışmasıyla ortaya çıkarılmış olup HA için MK473849, HB için MK473848 ve HC için MK473847 aksesyonları GenBank'a özgün veriler olarak kayıtları sağlanmıştır. *Hypoderma lineatum* üzerinde yapılan çalışmalarda (Lecroisey ve ark., 1979) HC'nin sekans analizi ve inhibitörlere karşı duyarlılığı bu serin proteazın chymotrypsin ailesinin bir üyesi olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu proteaz kollajenolitik aktivitesiyle larvaların doku penetrasyonunda işlev görmektedir. HA ve HB ise trypsin ailesiyle ilişkili olup ortak biyokimyasal özellikleri paylaşırlar (Tong ve ark., 1981). HA larva ekstraktlarında en bol bulunan üç proteinden biridir. *Hypoderma lineatum* L1'lerin total protein ekstraktlarından HA pürifiye edilmiştir. Tripsin ile ilişkili bu serin proteazın, moleküler ağırlığı 30 kDa olan bir glikoprotein olduğu ifade edilmiştir. HA'nın konak immun yanıtından kaçınmada görev aldığı bilinmektedir (Moiré, 1998). Bu proteaz sığır komplement C3 proteinini sindirerek komplement yolağını inhibe eder ve böylece yangısal reaksiyon gelişimini azaltır (Boulard ve Bencharif, 1984). HA, prostaglandin E2'nin (PGE2) yüksek düzeyde üretimini stimüle ederek sığır IL2 üretimini azaltır ve bu şekilde spesifik immün yanıtın interfere edilmesinde görev alır. Bununla birlikte lenfosit aktivasyonu ve poliferasyonunda görev alan bazı lenfosit membran antijenleri de HA tarafından degrade edilir (Moiré ve ark., 1997). HA'nın ayrıca sığır serumundaki immünoglobulinleri (Igs) ve proteinleri de degrade ettiği bilinmektedir (Moiré, 1998). Serin proteazlardan HB *H. lineatum*'un larval homojenatından pürifiye edilmiş olup moleküler ağırlığı 23 kDa olarak rapor edilmiştir (Lecroisey ve ark., 1983). HB trypsinin hem amidi hem de ester substratlarını hidrolize eder, fakat sentetik substratlar üzerine kemotryptik aktivite göstermez. *Hypoderma lineatum* HB'nin amino asit kompozisyonu ve N-terminal sekansı aynı sinek türüne ait larvadan izole edilen trypsin familyasının serin proteazları ile benzer yapıya sahip olduğunu destekleyen kanıtlar ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte HB ve HA'nın inhibisyon özellikleri ve spesifiklikleri ile ilgili olarak oldukça benzer oldukları ancak *Hypoderma* kollagenazlarından güçlü bir şekilde farklılık gösterdikleri rapor edilmiştir (Lecroisey ve ark., 1983). Görüldüğü üzere hypodermin antijenleri *Hypoderma* türlerinin konaktaki gelişiminde ve immün sistemin modüle edilmesinde kritik rollere sahiptirler. Bu yönleriyle de ilgili proteazlar *H. lineatum*'un serolojik teşhisi amacıyla hedef antijenler olarak çalışılmış (Casais ve ark., 1998; Panadero ve ark., 2000b; Boldbaatar ve ark., 2001; Colwell ve ark., 2003; Khaznadji ve ark., 2003) ayrıca aşı adayı olabileceklerinin de önemi vurgulanmıştır.

Çalışmamızda *H. bovis*'in HA kodlayan gen bölgesinin ORF sekansının 705 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiş olup sekans karakterizasyonu yapılan 10 adet L3 izolatın da sekanslarının homolog ve bu yönüyle de yüksek düzeyde korunmuş bir gen bölgesi olduğu ortaya çıkarılmıştır. *Hypoderma lineatum*'a ait gen veritabanında bulunan Amerika Birleşik Devletleri (L24914) ve Fransa (X74303) sekanslarının incelenmesinde ise ilgili gene ait ORF sekansının 771 bp uzunluğunda olduğu ve mevcut iki izolat arasında da %0,3'lük bir genetik farklılığın bulunduğu dikkati çekmiştir. Diğer yandan interspesifik farklılıklar incelendiğinde karakterize ettiğimiz *H. bovis* HA sekanslarının *H. lineatum* ile %8,7'lik bir farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç HA'nın farklı *Hypoderma* türleri arasında korunmuş bir yapı sergilemediğini ve genetik diversiteye sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Nitekim iki tür arasındaki bu nükleotid farklılığının amino asit sekansları da yansıdığı ve %20,3'lük bir farklılık olduğu görülmüştür. *Hypoderma bovis* HA amino asit sekanslarının in-silico analizlerinde 25,744 kDa büyüklüğünde bir proteini oluşturduğu ve bu proteinin transmembran bölge içermeyip tamamen sitoplazmik karakterde olduğu belirlenmiştir. Gen veri tabanında mevcut *H. lineatum* amino asit sekanslarının incelenmesinde ise ilgili proteinin *H. bovis* ile benzer büyüklükte (25,571 kDa) ve sitoplazmik karakterde olduğu dikkati çekmiştir. *Hypoderma bovis* HA geninin ORF aminoasit sekansları içerisinde uzunluğu 9-45 aa arasında değişen 7 antijenik bölgeye sahip olduğu belirlenmiş olup bunlar arasında 124-158 aa ile 190-230 aa arasında yer alan antijenik bölgelerin en yüksek skoru gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan in-silico analizlerde *H. bovis* ve *H. lineatum* amino asit sekansları arasında %100 homoloji gösteren herhangi bir antijenik bölgeye rastlanmamıştır. Her iki türe ait HA proteininin birbirine yakın izoelektronik noktası ve aktivasyon değerine sahip olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlarla özellikle rekombinant antijen tabanlı aşı geliştirme çalışmaları ile sero diagnostik yaklaşımlarda HA'nın cins bazında etkinliğinin düşük olabileceği ve türe özgü çalışmalarda hedeflenmesinin daha uygun olduğuna dair kanıtlar ortaya çıkarılmıştır. Diğer yandan çalışmamızda *E. coli* bazlı ekpresyon sisteminde gerçekleştirilen analizlerde HA'nın ekprese olmadığı görülmüştür. Bu noktada olası kodon uyşmazlık problemleri göz önüne alınarak ilgili gen sekansı ticari bir firmaya gönderilerek kodon optimizasyonları sağlanmış ve sentetik olarak pET 32a (+) ekpresyon vektörüne yerleşimleri sağlanarak tekrar ekpresyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda da HA'nın *E. coli* bazlı ekpresyon sistemde

ekprese olmadığı görülmüştür. Bunun yanında Khaznadji ve ark. (2003), Drosophila S2 hücrelerinde *H. lineatum*'un HA genini başarılı bir şekilde ekprese etmişler ancak ilgili proteinin natif proteinle benzer moleküler büyüklükte olduğunu ve enzimatik aktivite gösterdiğini kaydetmişlerdir. Bu noktada insekt ekpresyon sistemlerinin rekombinant HA'nın eldesinde daha uygun olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda karakterize edilen *H. bovis* HB'yi kodlayan gen bölgesinin ORF sekansının 771 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiş ve HA'da olduğu gibi sekanslanan izolatlar arasında %100 identik olduğu görülmüştür. Gen veritabanında bulunan *H. lineatum* sekansları incelendiğinde ise Fransa'dan bildirilmiş iki izolata ait ORF sekanslarının aynı uzunlukta olduğu ve aralarında da %1,1'lik bir genetik farklılığın bulunduğu dikkati çekmiştir. *H. bovis* HB sekansları ile *H. lineatum* HB sekansları arasında da interspesifik farklılığın (%6,5) HA'dan daha düşük olduğu belirlenmiş olup bu nükleotid farklılıklarının da %12,5'lik bir amino asit farklılığı oluşturduğu tespit edilmiştir. Ancak HA'ya benzer olarak bu antijenin de sero diagnostik ve aşılama çalışmalarda türe özgü olarak hedeflenmesinin daha duyarlı sonuçlar vereceğine dair kanıtlar sağlanmıştır. Nitekim 27,795 kDa büyüklükte ve 22 aa uzunluğunda transmembran bölgeye sahip olduğu belirlenen *H. bovis* HB proteinin toplam 13 antijenik bölge içerdiği ve bu antijenik bölgelerden 7 ve 16 aa uzunluğunda 3 bölgenin (24-30, 43-49, 212-227) *H. lineatum* ile %100 homoloji gösterdiği görülmüştür. *Hypoderma bovis* HB proteinin izoelektronik noktası ve aktivasyon değerinin de *H. lineatum*'dan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bakteriyel ekspresyon sistemlerinde yürütülen analizlerde HB'nin ekprese olduğu görülmüş ve in silico analizlere göre de bu sonucun uyum gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu çalışma ile karakterize ettiğimiz, *H. bovis* HC'yi kodlayan gen bölgesinin ORF sekansının 783 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiş olup HA ve HB'de olduğu gibi sekanslanan izolatların birbiriyle %100 identik olduğu belirlenmiştir. GenBank veri tabanında mevcut olan iki *H. lineatum* HC geni arasında %0,4'lük genetik farklılık olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan *H. bovis* HC sekansları ile *H. lineatum*'a ait HC sekansları kıyaslandığında %3,4'lük interspesifik farklılığın ve bu nükleotid farklılıklarının da %5,1'lik bir aminoasit farklılığı oluşturduğu belirlenmiş olup HA ve HB'ye göre daha düşük olduğu dikkati çekmiştir. Elde dilen bu sonuçla HC'nin HA ve HB'ye göre farklı *Hypoderma* türlerinde daha az genetik diversiteye sahip olduğu ve

diğer hypoderminlere göre daha düşük farklılıklar sergilediği ve bu sebeple hypodermosis'in teşhisi noktasında daha etkin olabileceğini desteklemektedir. *Hypoderma bovis* HC geninin 28,516 kDa büyüklüğünde olduğu, ORF aminoasit sekanslarına göre 21 aa uzunluğunda transmembran bölge içerdiği ve geri kalan kısmın sitoplazmik karaktere sahip olduğu belirlenmiştir. HC geninin 7-32 aa arasında değişen 11 antijenik bölgeye sahip olduğu ve 4-15 aa ile 71-102 aa arasındaki antijenik bölgelerin en yüksek skora sahip olduğu tespit edilmiştir. *Hypoderma bovis* HC proteinin izoelektronik noktasının *H. lineatum*'dan daha yüksek aktivasyon değerinin ise daha düşük olduğu belirlenmiştir. *Hypoderma bovis* HC proteinin, bakteriyel ekspresyon sistemlerinde yapılan analizlere göre 28,516 kDa büyüklükteki proteini ekprese ettiği görülmüş olup in silico analizlere göre de benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Proteinler tüm organizmaların önemli bir bileşeni olup her protein molekülü bir veya daha fazla polipeptid zincirlerinden oluşan amino asitlerden teşekkül eder. Farklı aminoasit dizileri protein zincirlerini oluşturmak üzere peptid zincirleri ile bağlanarak birarada bulunurlar. Her proteinin özgün bir amino asit dizilimi vardır. Proteinlerin tüm fonksiyonları kendi yapılarına bağlıdır. Hayat için gerekli olan bilgi DNA veya RNA tarafından kodlansa da proteinler organizmalar içinde enzim katalizi, savunma, taşıma, destek, hareket ve regülasyon gibi fonksiyonları içeren geniş çapta biyolojik fonksiyonları gerçekleştirir. Vücuttaki fonksiyonlarına göre proteinler hücre içine bilgi aktarımı, yapısal bileşenler ve transport/depolama gibi özellik gösteren, antikorlar, enzimler, sitokinler, hormonlar ve sinyal peptidler gibi farklı katagorilere ayrılabilirler. Bu önemli özelliklerinden dolayı proteinler yoğun olarak çalışılmakta ve farklı alanlarda geniş olarak kullanılmaktadır. Geçmişte spesifik bir proteini elde etmenin major yolu doğal kaynağından izolasyon olup bu metodoloji genel olarak etkisiz ve zaman alıcı olmuştur. Moleküler biyolojik tekniklerdeki güncel gelişmeler, spesifik bir proteini kodlayan DNA'nın bir ekpresyon vektörü içerisine klonlanmasını ve bakteri, mantar, insekt ve memeli hücreleri gibi ekpresyon sistemlerinde ifade edilmelerini mümkün hala getirmiştir. Basitçe rekombinant proteinler, canlı hücredeki eksojen DNA'nın translasyon ürünleri olarak nitelendirilebilirler. Rekombinant protein üretimi genel olarak moleküler klonlama ve protein ekpresyonu olmak üzere iki ana basamağı içerir. Rekombinant proteinler medikal, araştırma ve biyoteknoloji gibi birçok alanda kullanım alanına sahiptir. Bunlar arasında rekombinant antijen olarak nitelenen farklı ekpresyon

sistemlerinden elde edilmiş proteinler birçok paraziter enfestasyonun serolojik teşhisinde yaygın olarak çalışılmış ve bazı önemli paraziter etkenler için ticari tanı kitleri de kullanılabilir olmuştur. Çeşitli paraziter etkenlerin serolojik tanısı amacıyla hedeflenen rekombinant antijenlerin duyarlılık ve özgünlükleri en önemli faktörler olup yapısal ve fonksiyonel özellikleriyle birlikte deyatlı analizlerle ortaya çıkarılmaları gerekmektedir (Saraswat ve ark., 2013; Rosano ve ark., 2019). Günümüze kadar sığırlarda hypodermosis'in rekombinant antijen tabanlı serolojik teşhisi amacıyla sınırlı sayıda (başta ELISA tabanlı olmak üzere) çalışmaların yapıldığı görülmektedir. Bu çalışmalardan Casais ve ark. (1998), *E. coli* ekspresyon sisteminde *H. lineatum*'un HC antijenini rekombinant olarak elde etmişler ve geliştirdikleri ELISA yönteminde duyarlılık ve özgünlüğü sırasıyla %85 ve %98,2 olarak tespit etmişlerdir. Boldbaatar ve ark. (2001), benzer olarak *E. coli* ekspresyon sisteminde elde edilen *H. lineatum* rekombinant HC antijeni ile Western blot analizleri sonucu inceledikleri enfeste ve enfeste olamayan sığırlarda testin yüksek duyarlılıkta olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada enfeste 48 hayvanın 46'sında serumda spesifik antikorların saptandığını buna karşın enfeste olmayan hayvanlarda ise reaksiyon şekillenmediğini kaydetmişler ve bu yöntemin sığır hypodermosis'in tanısında kullanışlı bir araç olduğunu ifade etmişlerdir. Panadero ve ark. (2002), rekombinant HC'ye karşı monoklonal antikorları fare modelinde elde etmişler ve ilgili antijenin yüksek immünojenite ve reaktifliğe sahip olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada (Panadero ve ark., 2002) rekombinant antijenlere karşı oluşturulmuş monoklonal antikorlar kullanılarak geliştirilen antijen ELISA yöntemi için, duyarlılık ve özgünlük sırasıyla %96,4 ve %95,6 saptanmış olup ayrıca antijenlerin ilk enfestasyondan 6 hafta sonra belirlenebildiği kaydedilmiştir. Panadero ve ark. (2007a), hypodermosis'in teşhisinde HC tabanlı antijen ELISA (Panadero ve ark., 2002) ve antikor ELISA testlerini özafagusta gelişen L1'ler temelinde değerlendirmişlerdir. Aynı çalışmada (Panadero ve ark., 2002) HC antijeninin enfestasyonun erken ve geç dönemleri boyunca düşük düzeyde seyrettiği belirlenmiş ancak orta fazda L1'in özafagusta görülmesiyle birlikte konsantrasyonun artış gösterdiği tespit edilmiştir. Spesifik antikorların ise larvaların sırt bölgesinde ilk görünümüne kadar progresif olarak artış gösterdiği belirlenmiştir. Araştırıcılar antijen veya antikor düzeyleriyle sırt bölgesinde gelişen larva sayısı arasında bir korelasyonun bulunmadığını kaydetmişlerdir. Ziomko ve Cencek (2001), *H. bovis* ile enfeste 163 sığırda sekret/ekskret antijenlerinin jelden elüsyonu ve izoelektrik fokulasma ile *H.*

bovis L1'lerinden elde ettikleri antijenik fraksiyonlardan HA'nın en iyi antijenik özelliğe sahip olduğunu kaydetmişler ve bu antijenle oluşturulacak ELISA kitinin enfestasyonun tanısında önemli olabileceğini vurgulamışlardır. Aynı araştırıcılar kesilen sığırların özafaguslarında L1'lerin prevalansının %21,9 olduğunu buna karşın dolaşımdaki antijen yönünden pozitif sığır sayısının ise bu orandan biraz daha yüksek olduğunu (%24,8) belirlemişler ve bu durumu da bazı hayvanlarda göç geçiren larvaların immün sistem tarafından tahribata uğramış olabileceği hipoteziyle açıklamışlar, L1 sayısı ile HC antijen düzeyleri arasında korelasyon olmadığı kaydedilmiştir. Öte yandan aynı araştırıcılar antikor ELISA'da hayvanların %79'unu *Hypoderma* yönünden pozitif belirlemişler ve hayvanlardaki bu yüksek seroprevalansın parazite maruz kalmayla ilişikli olduğunu fakat ilgili hayvanlarda görünür mevcut bir enfestasyonun bulunmadığını, antijen ELISA'nın konaktaki larval gelişim takibi için iyi bir araç olabileceği, antikor ELISA'nın ise risk faktörlerin ortaya konulabilmesi açısından uygun bir yaklaşım olduğu vurgulanarak belirtilmiştir (Ziomko ve Cencek, 2001).

Çalışmamızda *H. bovis*'in rekombinant HC ve HB antijenleri ile oluşturulan ELISA metodolojisinde her iki rekombinant antijenin de immun reaktivite gösterdiği ancak en düşük serum sulandırmasında HC antijeninin en yüksek OD değerine sahip olduğu ve dolayısıyla da immün reaktifliğinin HB'ye göre daha yüksek olduğu ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen bu sonuç yukarıda bahsi geçen çalışmalarla (Casais ve ark., 1998; Ziomko ve Cencek, 2001; Panadero ve ark., 2002; Panadero ve ark., 2007a) paralel olarak HC antijeninin serolojik taramalarda hedef olarak seçilmesinin daha uygun olabileceğini görüşünü doğrulamıştır. Aynı zamanda pozitif ve negatif kontrol serumlarının farklı dilüsyonları ile yapılan ROC analizlerinde HC antijeninin 0,5µg konsantrasyonda cut-off değerinin 0,668 olduğu ve bu cut-off değerinde duyarlılık ve özgüllüğünün %100 olduğu tespit edilmiştir.

Peptidler, peptid (amid) bağları ile birbirine bağlı aminoasitlerin kısa zincirleridir. En basit peptidler dipeptidler, ardından tripeptidler ve benzeri tetrapeptitlerdir. Bir polipeptid uzun, sürekli ve dallanmamış bir peptid zinciridir. Bu nedenle peptidler, nükleik asitler, oligosakkaritler, polisakkaritler ve diğerlerinin yanı sıra biyolojik oligomerlerin ve polimerlerin geniş kimyasal sınıfları altında yer almaktadır. Peptitler, büyüklük bazında proteinlerden ayırt edilir ve göreceli bir kıyaslama ile yaklaşık 50

veya daha az aminoasit içerdiği anlaşılabilir. Peptid bilimi, 20 aa uzunlukta aminoasitlerin kombine edilmeleri ve standardizayonu ile tanı, tedavi ve profilaktik önlemler için yeni metodolojiler sağlayabilir. Ayrıca, üstün özellikli sentetik peptid tasarımları bu metodolojilerin pratik uygulamalarını arttırabilir. Peptidler, ilaç tasarımı, hedefe yönelik ilaç yönelimi, kemoterapi, serodiagnoz, onkoloji ve aşı gibi çeşitli alanlarda daha geniş biyomedikal uygulamalara sahiptir (Joshi ve ark., 2013). Enfeksiyöz hastalıkların teşhisinde performansı artırmak için spesifik epitopların sentetik peptidleri ile yapılan çalışmalar umut verici sonuçlar göstermiştir. Genel olarak, sentetik peptidler, kaba veya rekombinant antijenlere kıyasla immüno analizlerin teşhis parametrelerini arttırır. Artan duyarlılık ve özgüllük, konakta veya diğer organizmalarda bulunmayan, sıklıkla serodiagnoz olarak çapraz reaktivite ile ilişkili olan potansiyel immünodominant parazit proteinlerinin spesifik immünojenik bölgeleri ile ilişkilidir (Menezes-Souza ve ark., 2015). Sentetik peptidler, yüksek saflıkta büyük miktarlarda kolayca üretilebildikleri için avantajlıdır (List ve ark., 2010). Ayrıca, türe özgü korunmuş epitoplardan oluşan sentetik peptidlerin kullanımı, belirli antijenlerde bulunan özgüllük ve duyarlılık problemlerinin üstesinden gelebilir (Noya ve ark., 2003). Çalışmamızda hypodermosis'in serolojik teşhisi amacıyla aminoasit karakterizasyonu yapılan *H. bovis* nesillerinin her üç hypodermin antijeni için peptid dizaynı yapılmış olup ilgili peptidler gen veritabanındaki diğer *Hypoderma* türlerine ait aminoasit sekansları da göz önüne alınarak korunmuş bölgelerden antijenik skorlarına göre seçilerek sentezletilmiştir. Bu yaklaşımla seçilen peptidlerin tüm *Hypoderma* türlerine ait antikorları yakalayabileceği hipotez edilmiş ve hypodermosis'in tanısında etkin bir yaklaşım tarzı oluşturulmak istenmiştir. Nitekim Uniport gibi protein veri tabanlarında yapılan in silico analizlerde seçilen peptidlerin *Hypoderma* türlerine özgün olduğu görülmüştür. Rekombinant antijenlerde olduğu gibi *Hypoderma bovis* ile enfeste sığır serumu kullanılarak HA, HB ve HC peptidleri ile yapılan Checkerboard Titrasyon analizlerinde her üç peptidin de immun reaktif olduğu ve bunların arasında en düşük serum sulandırmasında Hypodermin C peptidinin en yüksek OD değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç rekombinant antijen ELISA analizleriyle uyumlu bulunmuş olup ROC analizlerinde HC peptidinin 2µg konsantrasyonda cut-off değerinin 0,629 olduğu ve bu cut-off değerinde duyarlılık ve özgüllüğünün %100 olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar rekombinant antijenlerin üretim maaliyetleri de göz önüne

alındığında özgün sentetik peptid tabanlı tanı yöntemlerinin hypodermosis'in teşhisinde de alternatif etkin bir yaklaşım olduğunu destekler kanıtlar ortaya çıkarmıştır.

Hypodermosis'in serodiagnostik teşhisteki etkinliklerinin değerlendirilmesi amacıyla bu çalışmada elde edilen rHC antijeni (0,5µg) ile sentezletilen sentetik pHC (2µg) ile ELISA testi geliştirilmiştir. Bu sebeple Anabilim Dalı cryobankında muhafaza edilen toplam 200 sığır serum örnekleri geliştirilen ELISA yöntemiyle incelenmiştir. Nitekim hem rekombinant HC antijen hem de HC sentetik peptidi ile geliştirilen ELISA analizlerinde aynı sonuçlar elde edilmiş olup hypodermosis seropozitifliği %62'i olarak bulunmuştur. Elde edilen seropozitivite oranının Simsek ve ark. (2008)'nın Malatya, Elazığ ve Diyarbakır illerinde sığırlarda belirledikleri %23,3, Özkutlu ve Sevgili (2005)'nin Şanlıurfa merkez, Suruç, Siverek, Viranşehir ve Akçakale illerinde saptadıkları %38,6 ve Balkaya ve ark. (2010)'nın Erzurum yöresinde tespit ettikleri %28,6 orandan daha yüksek olduğu görülmüştür. Diğer yandan İspanya (Panadero ve ark., 2007b) ve Kanada'da (Colwell, 2000) sığırlarda yürütülen seroprevalans araştırmalarında çalışmamıza benzer olarak seroprevalans oranları %60'ın üzerinde belirlenmiştir. Farklı coğrafyalarda belirlenen seroprevalans farklılıklarında, konak ve sinek popülasyon yoğunluğu, çevresel ve iklimsel faktörlerin yanı sıra yine serolojik tanı amacıyla kullanılan antijenler ve yöntemlerin duyarlılığı ve özgüllüğü gibi faktörlerin rol oynadığı düşünülmüştür.

Çalışmamızda incelenen sığırların yaş gruplarına göre *H. bovis* seropozitifliği, en yüksek %73,4 ile 5-7 yaş grubunda belirlenmiş bunu sırasıyla %72,7 ve %29,2 ile 2-4 yaş ile 1-2 yaş grupları izlemiştir. Yaş gruplarına göre *H. bovis* seropozitiflik dağılımında 1-2 yaş grubu ile 2-4 ve 5-7 yaş grupları arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunurken ($p<0,05$) 2-4 ve 5-7 yaş grupları arasındaki farklılık önemsiz belirlenmiştir ($p>0,05$). Yaş gruplarına göre hypodermosis'in prevalansı üzerine elde edilen verilerin çeşitli araştırıcıların bulguları ile paralel seyrettiği dikkati çekmiştir. Nitekim iki yaş üzeri sığırların buzağılar veya daha genç sığırlara oranla meraya daha çok çıkmaları ve dolayısıyla da *Hypoderma* sineklerine maruziyetin daha yüksek olması yaş gruplarındaki farklılığın ana sebeplerinden biri olabileceği vurgulanmıştır (Özkutlu ve Sevgili, 2005; Simsek ve ark., 2008; Ahmed ve ark., 2013a; Yadav ve ark., 2013).

Çalışmamızda incelenen erkek sığırlarda %10,7, dişi sığırlarda ise %6,9 oranında seroprevalans belirlenmiş ancak istatiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır. Benzer olarak Yadav ve ark. (2013) ile Özkutlu ve Sevgili (2005), yaptıkları çalışmalarda dişi sığırlara göre erkek sığırlarda daha yüksek seroprevalans belirlenmiş fakat istatiksel olarak farklılık bulunmamıştır. Diğer yandan Ahmed ve ark. (2013a) ile Simsek ve ark. (2008), dişi sığırlarda erkeklere göre daha yüksek seroprevalans tespit etmişlerdir. İlgili araştırıcılar cinsiyete bağlı farklılıkları yetiştirme koşulları ile ilişkilendirmişlerdir.

Çalışmamızda hypodermosis'in seroprevalansında sığırların ırkına bağlı istatiksel bir farklılık bulunmamıştır. Benzer olarak Simsek ve ark. (2008), kültür ırklarında yerli ve melez ırklara göre daha düşük seropozitiflik saptamışlar ancak ırka bağlı istatistiksel önem bildirmemişlerdir. Diğer yandan ile Özkutlu ve Sevgili (2005), melez ırklarda kültür ırklarına göre hypodermosis'in seroprevalansını istatistiksel olarak daha yüksek belirlemişlerdir. Bunun sebebininin kültür ırklarında yüksek verim ve yetiştirme maliyetlerine bağlı olarak kapalı sistemde bulunmaları, dolayısıyla daha az sinek popülasyonuna maruz kalmalarıyla ilişkili olabileceği ifade edilmiştir (Özkutlu ve Sevgili, 2005; Simsek ve ark., 2008). Aksine Kara ve ark. (2005), yerel ırklarda, kültür ve melez ırklardan daha düşük bir yaygınlık bildirmişlerdir. Çalışmamızda hypodermosis'in dağılımında ırklar arası bir farklılık saptanmamış olması araştırma yöresindeki sığırların meraya bağlı veya yarı açık sistemlerde yetiştiriliyor olması ve dolayısıyla *Hypoderma* sineklerinin enfestasyonuna maruz kalmalarıyla ilişikli olabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak; bu tez çalışmasıyla Türkiye'de hypodermosis'in epidemiyolojisi üzerine genomik ve proteomik yaklaşımlarla özgün veriler sağlanmıştır. Çalışma ile ayrıca *H. bovis*'in önemli antijenleri olan Hypoderminleri kodlayan gen bölgeleri dünyada ilk kez moleküler olarak karakterize edilmiştir. Ayrıca GenBank veri tabanına bu verilerin Türkiye'den özgün veriler olarak kayıtlarıda sağlanmıştır. Diğer yandan bu verilerin dünyada sınırlı sayıdaki diğer *Hypoderma* türlerine ait moleküler verilerle ve ilgili genlerle ilişkileri ve filogenetik yapılanmaları karşılaştırılarak moleküler karakterizasyonları yapılmıştır. Yine bu tez çalışmasıyla, HC ve HB rekombinant teknolojiyle elde edilmiş, protein yapıları, antijenik önemleri ve immun reaktiviteleri hem in silico analizler hem de SDS-Page ve Western Blot yöntemleriyle detaylı olarak ortaya çıkarılmıştır. Tüm bu karakterizasyon çalışmaları sonrası HC antijenik yapısı ve

immun uyarıcılığıyla diğer iki hypodermin antijenine göre daha etkin belirlenmiş ve serolojik teşhis amacıyla rekombinant antijenleriyle özgün ELISA metodolojisi geliştirilmiştir. Aynı zamanda her üç hypodermin antijeninin amino asit sekansları üzerinde detaylı in silico analizler gerçekleştirilerek diğer *Hypoderma* türlerini de kapsayacak peptid dizaynı gerçekleştirilmiş ve hypodermosis'in serolojik tanısı için özgün bir yaklaşım tarzı ortaya konulmuştur. Bu tez çalışmasında elde edilen veriler ve geliştirilen metodolojiler sığırlarda hypodermosis'in epidemiyolojisi ile kontrol ve mücadele yöntemleri üzerine yapılacak araştırmalar için bir model oluşturacaktır. Özellikle hastalıkla mücadelede, aşılamayla immunizyonun sağlanması gelişme basamağına ulaşılmasında, HC'nin aşı adayı olabilirliği üzerinde çalışmaların yoğunlaştırılmasına zemin oluşturması önemlidir. Bu çalışma ile ayrıca hypodermosis'in sığırlarda yüksek düzeyde yaygınlık gösterdiği, geliştirilen özgün serolojik testlerle net olarak ispatlanmıştır. Ayrıca bu çalışma, sonuçları itibarıyla yüksek ekonomik kayıplara yol açan hypodermosis'in kontrolü ve mücadelesi üzerine ülkesel çapta mücadele stratejilerinin geliştrilmesinin ve bu alanda hazırlanacak projelere öncelikli alan karakteristiği ile araştırma desteği sağlanmasının gerekli olduğunu da ortaya koymuştur.

6. KAYNAKLAR

Abul-Hak J. Seasonal occurrence of *Hypoderma* spp. (Diptera: Oestridae) warble flies on cattle in Baghdad area, Iraq. J. Bull. Endem. Dis. 1973; 14: 73-81.

Ahmed H, Afzal MS, Mobeen M, Simsek S. An overview on different aspects of hypodermosis: current status and future prospects. Acta Trop. 2016; 162: 35-45.

Ahmed H, Khan MR, Panadero-Fontán R, López-Sández CL, Asif S, Mustafa I, Qayyum M. Influence of epidemiological factors on the prevalence and intensity of infestation by *Hypoderma* spp. (Diptera: Oestidae) in cattle of Potowar Region, Pakistan. Pak. J. Zool. 2013a; 45: 1495-1500.

Ahmed H, Khan MR, Panadero-Fontán R, López-Sández CL, Farooq M, Naqvi SMS, Qayyum M. Geographical distribution of hypodermosis (*Hypoderma* sp.) in Northern Punjab Pakistan, Kafkas. Univ. Vet. Fak. Derg. 2012; 18: 1215-1219.

Ahmed H, Khan MR, Panadero-Fontán R, López-Sández CL, Mustafa I, Ghani A, Hussain M, Asif S, Ahmad A, Naqvi SMS, Qayyum M. Prevalence of bovine hypodermosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) from Jhelum District, Pakistan. Kafkas. Univ. Vet. Fak. Derg. 2013b; 19: 79-84.

Ahmed H, Simsek S, Saki CE, Kesik HK, Kilinc GS. Molecular characterization of *Hypoderma* spp. in domestic ruminants from Turkey and Pakistan. J. Parasitol. 2017; 103: 303-308.

Alvinerie M, Sutra JF, Galtier P, Lifschitz A, Virkel G, Sallovitz J, Lanusse C. Persistence of ivermectin in plasma and faeces following administration of a sustained-release bolus to cattle. Res. Vet. Sci. 1998; 66: 57-61.

Anteplioğlu H, Samsar E, Akın F, Güzel N, Tınar N. Sığırlarda görülen amaurosis olguları ve bunların sagıtımları üzerinde denemeler. Ankara Üniv.Vet. Fak. Derg. 1977; 223-232.

Argente G, Vaillant J, Boulard C. Methods for evaluating a warble population in a warble cleaned area. In: Boulard C, Brien D, Pithan K, Sampimon O, Sol J, Webster K. (Edts), Improvements in the Control Methods for Warble Fly in Livestock. COST 811. European Comission, Brussels, 1996: 68-70.

Ayaz MM, Anwar M. Hypodermosis in buffaloes in Pakistan. J. Biol. Sci. 2002; 2: 204.

Ayaz MM, Khan MQ. Hypodermatosis in buffaloes. Pak. Vet. J. 1999; 19: 213.

Baldelli B, Olidori GA, Grelloni V, Principato M, Moretti A. The ELISA method for the detection of antibodies in bovines affected by *Hypoderma* infestation: preliminary results. Parasitologia. 1981; 23: 115-119.

Balkaya I, Simsek S, Saki CE. A serological and molecular survey of hypodermosis in east-Turkey. Vet. Parasitol. 2010; 173: 287-291.

Baron RW, Colwell DD. Enhanced resistance to cattle grub infestation (*Hypoderma lineatum* de Vill.) in calves immunized with purified hypodermin A, B and C plus monophoryllipid A (MLP). Vet. Parasitol. 1991; 38: 185-197.

Baron RW, Weintraub J. Lymphocyte responsiveness in cattle previously infested and uninfested with *Hypoderma lineatum* (de Vill.) and *H. bovis* (L.) (Diptera: oestridae). Vet. Parasitol. 1987; 24: 285-296.

Bauer C. Does the use of microdosed ivermectin to control bovine hypodermosis increase the risk for selecting drug resistant nematodes? In: Pfister K, Charbon JL, Tarry DW, Pithan K. (Edts), Improvements in the Control Methods for Warble–fly in Cattle and Goats, 23-25 September 1993, Thun, Switzerland, COST 811. C.E.C., Luxembourg, 1994: 145-147.

Benakhla A, Bencheikh-Lefgoun MC, Zinc C, Sedraoui SL. Bovine hypodermatosis in East Algeria: frequency and economics; preliminary study. Maghreb Vétérinaire. 1990; 21: 13-17.

Benakhla A, Boulard C, Sedraqui S, Oussaid F. L'hypodermose bovine: approche épidémiologique et caractérisation du cycle biologique en vue de l'établissement d'un plan de profilaxie dans le nord est Algérien. Rev. Med. Vet. 1993; 144: 693-700.

Benakhla A, Jemli M, Sahibi H, Boulard C. Bovine hypodermosis in maghreb. In: Boulard C, Sol J, O'Brien D, Webster K, Sampimon OC. (Edt), COST 811 Improvements in the Control Methods for Warble Fly in Livestock. European Commission, Brussels, 1998: 34-37.

Benakhla A, Lonneux JF, Mekroud A, Losson B, Boulard C. Bovine hypodemosis in North-eastern Algeria: prevalence and intensity of infestation. Vet. Res. 1999; 30: 539-545.

Bilgic HB, Karagenc T, Bakırcı S, Shiels B, Tait A, Kinnaird J, Eren H, Weir W. Identification and Analysis of Immunodominant Antigens for ELISA-Based Detection of *Theileria annulata.* PLoS One. 2016; 11: e0156645.

Boldbaatar D, Xuan X, Kimbita E, Huang X, Igarashi I, Byambaa B, Battsetseg B, Battur B, Battsetseg G, Batsukh Z, Nagasawa H, Fujisaki K, Mikami T. Detection of antibodies to *Hypoderma lineatum* in cattle by Western blotting with recombinant hypodermin C antigen. Vet. Parasitol. 2001; 99: 147-154.

Boulard C, Alvinerie M, Argenté G, Languille J, Paget L, Petit E. A successful, sustainable and low cost control-programme for bovine hypodermosis, France. Vet. Parasitol. 2008; 158: 1-10.

Boulard C, Alvinerie M, Argenté G, Languille J, Paget L, Petit E. A successful, sustainable and low cost control-programme for bovine hypodermosis, France. Vet. Parasitol. 2008; 158: 1-10.

Boulard C, Argente G. Hypodermose bovine: description et incidence economique. Point Vet. 1988; 20: 105-115.

Boulard C, Bencharif F. Changes in the haemolytic activity of bovine serum complement by *Hypoderma lineatum* (insect oestridae) larval proteinases in naive and immune cattle. Parasite Immunol. 1984; 6: 459-67.

Boulard C, Petithory J. Serological diagnosis of human hypodermosis: a preliminary report. Vet. Parasitol. 1977; 3: 259-263.

Boulard C, Villejoubert C, Moire N. Cross-reactive, stage-specific antigens in the Oestrid family. Vet. Res. 1996; 27: 535-544.

Boulard C, Weintraub J. Immunological responses of rabbits artificially infested with the cattle grub *Hypoderma bovis* and *Hypoderma lineatum*. Int. J. Parasitol. 1973; 66: 109-117.

Boulard C. Avantages de l'immunodiagnostic de l'hypodermose bovine établi par hemaglutination passive et par ELISA à partir du sérum et du lactosérum sur la nu- meration des varrons. Ann. Rech. Vet. 1985; 16: 335-343.

Boulard C. Durably controlling bovine hypodermosis. Vet. Res. 2002; 33: 455-464.

Boulard C. Etude preliminaire d'une collagenase brute extraite de la larve de premier stade d'*Hypoderma lineatum*. Comptes Rendus de l'Académie des Sci. 1970; 270: 1349-1351.

Brown FG. Toxicological hazards in warble fly eradication programmes. Vet. Parasitol. 1977; 3: 265-270.

Cabanelas E, Panadero R, Fuertes M, Fernández M, Benavides J, López C, Pérez-Creo A, Díaz P, Morrondo P, Díez-Baños P, Pérez V. Histological and immunohistochemical characterization of *Hypoderma lineatum* (Diptera: oestridae) warbles. Vet. Parasitol. 2015; 212: 361-367.

Can MF. Hayvan Sağlığı Ekonomisi alanında kullanılan modelleme teknikleri ve çeşitli modelleme çalışmaları. Vet. Hekim Der. Derg. 2009: 80: 7-12.

Casais R, Martoan JM, Boga JA, Parra F. *Hypoderma lineatum*: expression of enzymatically active in *Escherichia coli* hypodermin C and its use for the immunodiagnosis of hypodermosis. Exp. Parasitol. 1998; 90: 14-19.

Celep A, Acici M, Cetindag M, Gurbuz I. Epidemiological studies on cattle parasites in Samsun province. Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg. 1994; 7: 153-162.

Celep A, Açıcı M, Çetindağ M, Gürbüz İ. Samsun yöresi sığırlarında paraziter epidemiyolojik çalışmalar. Etlik Vet. Mikrob. Derg. 1994; 7: 153-162.

Cencek T. Prevalence of warbles in enzootic hypodermosis foci in eastern Poland. In: Improvement in the Control Methods for Warble-fly in Farm Livestock. Proc. XII European COST 811, Kinsale, 21-23 September, Ireland, 1995.

Chakraborty C, Doss CGP, Patra BC, Bandyopadhyay S. DNA barcoding to map the microbial communities: current advances and future directions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014; 98: 3425-3436.

Chen R, Jiang LY, Qiao GX. The effectiveness of three regions in mitochondrial genome for aphid DNA barcoding: a case in Lachininae. PLoS One. 2012; 7: e46190.

Chomiczewska D, Trznadel-Budźko E, Kaczorowska A, Rotsztejn H. The role of Langerhans cells in the skin immune system. Pol. Merkur. Lekarski. 2009; 26: 173-177.

Cicek H, Cicek H, Eser M, Tandogan M, Sarımehmetoglu HO. Prevalence and economic significance of bovine hypodermosis in Afyonkarahisar province of Turkey. Trop. Anim. Health Pro. 2011; 43: 17-20.

Ciloglu A, Inci A, Yildirim A, Onder Z, Duzlu O. Babesia bigemina Kayseri/Türkiye suşunun in vivo ve in vitro izolatlarında apikal membran antijen-1 proteininin moleküler karakterizasyonu ve ekspresyonu. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 2018; 65: 239-246.

Colwell DD, Baron RW. Early detection of cattle grub infestation (*Hypoderma lineatum* and *H. bovis*) (Diptera: oestridae) using ELISA. Med. Vet. Entomol. 1990; 4: 35-42.

Colwell DD, Martınez-Moreno FJ, Martınez-Moreno A, Hernandez-Rodrıguez S, de la Fuente-Lopez C, Alunda JM, Hall MJ. Comparative scanning electron microscopy of third-instar *Hypoderma* spp. (Diptera: Oestridae). Med. Vet. Entomol. 1998; 12: 81-186.

Colwell DD, Panadero-Fontan R, López-Sandez C, Parra-Fernandez F, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Díez-Baños P. Effect of treatment on the dynamics of circulating hypodermin C in cattle naturally infested with *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). Vet. Parasitol. 2003; 113: 263-272.

Colwell DD. Hidden antigens from *Hypoderma lineatum*: impact of immunization on larval survival in artificial infections. Vet. Parasitol. 2011; 175: 313-319.

Colwell DD. Life cycle strategies. In: Eds.Colwell DD, Hall MJR, Scholl PJ. Oestrid Flies: Biology, Host-Parasite Relationships, Impact and Management. Wallingford, Oxfordshire, GBR: CABI Publishing, 2006; 5: 67-77.

Colwell DD. Persistence of cattle grub (Diptera: Oestridae) on a Canadian ranch with long term, continuous therapeutic control. Vet. Parasitol. 2000; 94: 127-132.

Colwell DD. Stage specific mortality and humoral immune responses during pulse and trickle infestations of the common cattle grub, *Hypoderma lineatum* (Diptera: oestridae). Vet. Parasitol. 2001; 99: 231-239.

Coombs A. The sequencing shakeup. Nat. Biotechnol. 2008; 26: 1109-1112.

Çiçek H, Çiçek H, Şenkul Ç, Tandoğan M. Paraziter hastalıkların kontrolünde coğrafi bilgi sistemlerinin kullanım olanakları ve hayvan sağlığı ekonomisi açısından önemi. Türkiye Parazitol. Derg. 2008; 32: 288-294.

Dacal V, Colwell DD, López C, Pérez V, Vázquez L, Cienfuegos S, Díaz P, Morrondo P, Díez-Baños P, Panadero R. Local and systemic cytokine responses during

larval penetration in cattle experimentally infested with *Hypoderma lineatum* (Diptera: oestridae). Vet. Immunol. Immunopathol. 2009; 131: 59-64.

Dacal V, López C, Colwell DD, Vázquez L, Díaz P, Morrondo P, Díez P, Panadero R. Immunohistochemical characterization of inflammatory cells in the skin of cattle undergoing repeated infestations with *Hypoderma lineatum* (Diptera: oestridae) larvae. J. Comp. Pathol. 2011; 145: 282-288.

de Azevedo WF Jr, Soares MB. Selection of targets for drug development against protozoan parasites. Curr. Drug Targets. 2009; 10: 193-201.

Deiana S, Arru E. *Hypoderma bovis* e *Hypoderma lineatum*, localizzazione stagio-nale delle larve. Parasitologia 1960; 2:141-144.

Dik B. Veteriner Entomoloji. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları. 1998; 139-149.

Dinçer Ş. İnsan ve Hayvanlarda Myiasis. Ed: Özcel MA, Daldal N. eds. Parazitoloji'de Artropod Hastalıkları ve Vektörler. İzmir. Ege Üniversitesi Basımevi, 1997: 169-234.

Dominguez J, Panadero R, Fuente-López C. Detection of *Hypoderma actaeon* infestation in *Cervus elaphus* with ELISA and Western Blotting. J. Wildl. Dis. 2010; 46: 934-938.

Drummond RO, Lambert G, Smalley HE, Terrill CE. Estimated losses of livestock to pests. CRC Handbook of Pest Management in Agriculture, Vol. 1. CRC Press Inc., Boca Ra- ton, Florida, USA, 1981: 111-127.

Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 2004; 32: 1792-1797.

El-Metenawy TM, Zayed AA. The prevalence of *Hypoderma lineatum* and *Hypoderma bovis* (Diptera: oestridae) infesting cattle in Istanbul region, Turkey. Vet. Med. J. Giza. 1992; 40: 145-151.

Fatumo S, Plaimas K, Mallm JP, Schramm G, Adebiyi E, Oswald M, Eils R, König R. Estimating novel potential drug targets of *Plasmodium falciparum* by analysing the metabolic network of knock-out strains in silico. Infect. Genet. Evol. 2009; 9: 351-358.

Fernández-Robledo JA, Vasta GR. Production of recombinant proteins from protozoan parasites. Trends Parasitol. 2010; 26: 244-254.

Francesconi F, Lupi O. Myiasis. Clin. Microbiol. Rev. 2012; 25: 79-105.

Frangipane di Regalbono A, Capelli G, Otranto D, Pitrobelli M. Assessment of cattle grub (*Hypoderma* spp.) prevalence in northeastern Italy: an immunoepidemiological survey on bulk milk sample using ELISA. Vet. Parasitol. 2003; 111: 343-350.

Gingrich RE, Barrett CC. Effect of dietary vitamin a on the innate resistance of cattle to infestation by larvae of *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). J. Med. Ent. 1975; 1: 13-15.

Gingrich RE. Acquired resistance to *Hypoderma lineatum*: comparative immune response of resistant and susceptible cattle. Vet. Parasitol. 1982; 9: 233-242.

Gingrich RE. Differentiation of resistance in cattle to larval *Hypoderma lineatum*. Vet. Parasitol. 1980; 7: 243-254.

Gish W, States DJ. Identification of protein coding regions by database similarity search. Nat. Genet. 1993; 3: 266-272

Giudicelli GC, Mader G, Brandao de Freitas L. Efficiency of ITS sequences for DNA barcoding in Passiflora (Passifloraceae). Int. J Mol. Sci. 2015; 16: 7289-7303.

Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SH, Alonso PL, Collins FH, Duffy PE. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. J. Clin. Invest. 2008; 118: 1266-1276.

Groß A, Hashimoto C, Sticht H, Eichler J. Synthetic Peptides as Protein Mimics. Front. Bioeng. Biotechnol. 2016; 3: 211.

Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst. Biol. 2003; 52: 696-704.

Gulanber A, Tuzer E, Gargili A, Toparlak M, Efill I, Keles V, Ulutas M. A survey of hypodermosis cattle slaughtered in Thrace (Trakya) Turkey. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2000; 24: 429-430.

Gül Y, İssi M. Amorozisli Buzağıların Kan Serumlarında β-Karoten ve A Vitamini Düzeyleri. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 2011; 17: 849-852.

Haine D, Boelaert F, Pfeiffer DU, Saegerman C, Lonneux JF, Losson B, Mintiens K. Herd-level seroprevalence and risk-mapping of bovine hypodermosis in Belgian cattle herds. Prev. Vet. Med. 2004; 65:93-104.

Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006; 103: 968-971.

Hassan M, Khan MN, Abubakar M, Waheed HM, Iqbal Z, Hussain M. Bovine hypodermosis-a global aspect. Trop. Anim. Health Prod. 2010; 42: 1615-1685.

Hassan M, Khan MN, Iqbal Z, Khan IA, Chaudhry SA, Sajid MS. Surveillance of cattle hypodermosis in district Chakwal, Pakistan. Int. J. Agric. Biol. 2008; 10: 337-339.

Hassan M, Khan MN, Mushtaq M, Iqbal Z, Farooq AA, Sajid MS, Waheed MH. Prevalence of warble fly infestation in buffalo in Chakwal, Punjab. Ital. J. Anim. Sci. 2007; 6: 942-944.

Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc. R. Soc. B. 2003; 270: 96-99.

Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM. Identification of birds through DNA barcodes. PLoS Biol. 2004; 2: e312.

Hennings R. Hypodermosis control and simultaneous treatment for fascioliasis in Steinfurt, Germany. Vet. Parasitol. 1977; 3: 211-216.

Hewitson JP, Grainger JR, Maizels RM. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. Mol. Biochem. Parasitol. 2009; 167: 1-11.

Hewitson JP, Maizels RM. Vaccination against helminth parasite infections. Expert Rev. Vaccines. 2014; 13: 473-487.

Hunfeld KP, Hildebrandt A, Gray JS. Babesiosis: recent insights into an ancient disease. Int. J. Parasitol. 2008; 38: 1219-1237.

İnci A, Yildirim A, Duzlu O. Kenelerin Medikal ve Veteriner Önemleri. Ed: İnci A. Kayseri: Erciyes Üniversitesi Yayınları. 2016: 26-27.

İnci A. Sığırların Artropod Enfestasyonları ve Vektör-Borne Hastalıkları. TÜSEDAD. 2015; 46-55.

Jang DH, Han HR, Chung JY. Survey for the exotic ox-warble fly, *Hypoderma bovis* in the high mountain region in Korea. Korean J. Vet. Res. 1987; 27: 301-306.

Joshi VG, Dighe VD, Thakuria D, Malik YS, Kumar S. Multiple antigenic peptide (MAP): a synthetic peptide dendrimer for diagnostic, antiviral and vaccine strategies for emerging and re-emerging viral diseases. Indian J. Virol. 2013; 24: 312-320.

Kan B, Åsbakk K, Fossen K, Nilssen A, Panadero R, Otranto D. Reindeer warble fly-associated human myiasis, Scandinavia. Emerg. Infect. Dis. 2013; 19: 830-832.

Kar S, Güven E, Vatansever Z. Artropod Enfestasyonlarında Immunite. Ed: Özcel MA, İnci A, Turgay N, Köroğlu E, Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji. ISBN 978-975-94646-8-4. Türkiye Parazitoloji Derneği, İzmir, 2007: 673-677.

Kara M, Arslan OM, Gicik Y. The prevalence of bovine hypodermosis in Kars Province. Turkey. Trop. Anim. Health Pro. 2005; 37: 617-622.

Karatepe M, Karatepe B. Hypodermosis in cattle slaughtered in Nigde province, Turkey. Trop. Anim. Health Prod. 2008; 40: 383-386.

Karthika P, Vadivalagan C, Thirumurugan D, Kumar RR, Murugan K, Canale A, Benelli G. DNA barcoding of five Japanese encephalitis mosquito vectors (*Culex fuscocephala*, *Culex gelidus*, *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex pseudovishnui* and *Culex vishnui*). Acta Trop. 2018; 183: 84-91.

Katoch R, Singh MM, Agnihotri RK, Mitra S. Increasing incidence of hypodermosis in kangra valley of himachal pradesh. J. Vet. Parasitol. 2005; 19: 67-68.

Kawada T. Receiver operating characteristic curve analysis, sensitivity comparison and individual difference. Clin Radiol. 2012; 67: 940.

Kaya, S. Orta Karadeniz Bölgesinde sıgır hypodermosis'inin sero-epidemiyolojisi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi. Doktora tezi. 2014

Kebede B, Sori T, Kumssa B. Review on Current Status of Vaccines against Parasitic Diseases of Animals. J. Veterinar. Sci. Techno. 2016; 7: 327.

Kelin KK. The economics of warble fly control. Can. Farm. Econ. 1980; 4:20-27.

Khan MA, Connell R, Darcel CQ. Immunization and parenteral chemotherapy for the control of cattle grubs *Hypoderma lineatum* (De Viii.) and *H. bovis* (L.) in cattle. Can. J. Comp. Med. 1960; 24: 177-180.

Khan MA. Eradication of hypodermosis. Vet. Parasitol. 1977; 3: 205-209.

Khan MN, Iqbal Z, Sajid MS, Anwar M, Needham GR, Hassan M. Bovine hypodermosis Prevalence and economic significance in southern Punjab, Pakistan. Vet. Parasitol. 2006; 141: 386-390.

Khan MR, Ahmed H, Panadero-Fontán R, Lopez-Sandez C, Khan MA, Asif S, Mustafa I, Ali MI, Raza H, Qayyum M. Risk mapping of bovine hypodermosis using geographical information system (GIS) in cattle of subtropical region, Pakistan. J. Infect. Dev. Ctries. 2015; 9: 872-877.

Khaznadji E, Boulard C, Moiré N. Expression of functional hypodermin A, a serine protease from *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae), in Schneider 2 cells. Exp. Parasitol. 2003; 104: 33-39.

Kilani M, Jaballah A, Franc M, Dorchies PH. Observation sur İinfestation des bovins par Hypoderma sp au Cap-Bon en Tunisie. Rev. Med. Vet. 1986; 137: 681-684.

Kilimcioğlu AA, Girginkardeşler N, Korkmaz M, Özkol M, Düzgün F, Östan I, Pabuşcu Y, Dinç G, Ok UZ. A mass screening survey of cystic echinococcosis by ultrasonography, Western blotting, and ELISA among university students in Manisa, Turkey. Acta Trop. 2013; 128: 578-583.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 1980; 16: 111-120.

Kiritani K. Predicting impacts of global warming on population dynamics and distribution of arthropods in Japan. Popul. Ecol. 2006; 48: 5-12.

Klein KK, Fleming CS, Colwell DD, Scholl PJ. Economic analysis of an integrated approach to cattle grub (*Hypoderma* spp.) control. Can. J. Agric. Econ. 1990; 38: 159-173.

Knipling EF. Sterile insect technique as a screwworm control measure: the concept and its development, Symposium on eradication of the screwworm from the United States and Mexico. Misc. Pub. Entomol. Soc. Am. 1985; 62: 4-7.

Korkmaz M, Inceboz T, Celebi F, Babaoglu A, Uner A. Use of two sensitive and specific immunoblot markers, em70 and em90, for diagnosis of alveolar echinococcosis. J. Clin. Microbiol. 2004; 42: 3350-3352.

Kumar D, Jatkar PR, Raisinghani PM, Gahlot GC, Kayum A, Jairath LK. Implications of warbles (*Hypoderma lineatum*) infestation in drought-affected cattle at Bikaner, Rajasthan. Indian J. Anim. Sci. 1990; 60: 433-435.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol. Biol. Evol. 2016; 33: 1870-1874.

Kunz SE, Scholl PJ, Colwell DD, Weintraub J. Use of the sterile insect technique for control of cattle grubs (*Hypoderma lineatum* and *H. bovis*) (Diptera: oestridae). J. Med. Entomol. 1990; 27: 523-529.

Kurtpinar H. Anadolu ehli hayvanlarında görülen *Hypoderma* türleri ve mücadeleleri ile ilgili araştırmalar. Ankara Yüksek Ziraat Enst. Derg. 1947; 153: 1-60.

Kutzer E. Present situation of hypodermosis in Austria. In: Warble Fly control in Europe: A symposium in the EC Programme of coordination of research animal pathology, Brussels, Belgium, Sept. 16-17, 1984: 59-64.

Lecroisey A, Tong N. Keil B. Hypodermin B, a trypsin-related enzyme from the insect *Hypoderma lineatum*. FEBS Letters. 1983; 261-267.

Lecroisey AC, Boulard C, Kiel B. Chemical and enzymatic characterization of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. Eur. J. Biochem. 1979; 101: 385-393.

Lee N, Baker J, Andrews KT, Gatton ML, Bell D, Cheng Q, McCarthy J. Effect of sequence variation in *Plasmodium falciparum* histidine- rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: Implications for rapid diagnostic tests for malaria. J. Clin. Microbiol. 2006; 44: 2773-2778.

Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehen- sive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. 2009; 25: 1451-1452.

List C, Qi W, Maag E, Gottstein B, Müller N, Felger I. Serodiagnosis of *Echinococcus* spp. infection: explorative selection of diagnostic antigens by peptide microarray. PLoS Negl. Trop. Dis. 2010; 4: e771.

López C, Colwell DD, Panadero R, Paz A, Pérez J, Morrondo P, Díez P, Cascallana JL, Santamaría V, Bravo A. Skin immune responses in cattle after primary and secondary infections with *Hypoderma lineatum* (Diptera: oestridae) larvae. Vet. Immunol. Immunopathol. 2005; 108: 285-294.

López C, Colwell DD, Panadero R, Paza A, Perez J, Morrondo P, Diez P, Cascallana JL, Santamaria V, Bravo A. Skin immune responses in cattle after primary and secondary infections with *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae) larvae. Vet. Immunol. Immunopathol. 2005; 108: 285-294.

Macchioni G. Economic aspects of control of bovine hypodermosis in Italy. In: Warble Fly Control in Europe. Proceedings of a Symposium in the EC Programme of Coordination of Research on Animal Pathology, Brussels, 1984: 33-38.

Magat A, Boulard C. Trial vaccination against cattle hypodermosis. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris. 1970; 270: 728-730.

Martinez-Moreno J, Reina D, Navarrete I, Jimenez V, Martinez- Moreno A, Hernandez S. Epidemiological survey of hypodermosis in western Spain. Vet. Rec. 1996; 139: 340-343.

Menezes-Souza D, Mendes TA, Gomes MS, Bartholomeu DC, Fujiwara RT. Improving serodiagnosis of human and canine leishmaniasis with recombinant *Leishmania braziliensis* cathepsin l-like protein and asynthetic peptide containing its linear B-cell epitope. PLoS Negl. Trop. Dis. 2015; 9: e3426.

Moiré N, Bigot Y, Periquet G, Boulard C. Sequencing and gene expression of hypodermins A, B, C in larval stages of *Hypoderma lineatum*. Mol. Biochem. Parasitol. 1994; 66: 233-240.

Moiré N, Nicolas-Gaulard I, Le Vern Y, Boulard C. Enzymatic effect of hypodermin A, a parasite protease: on bovine lymphocyte membrane antigens. Parasite Immunol. 1997; 19: 21-27.

Moiré N. Hypodermin A and inhibition of lymphocyte proliferation. Parastitol. Today 1998; 14: 455-457.

Mukhtar B, Omarkhan B. Hypodermosis of domestic and wild animals of Kazakhstan. Chinese J. Vet. Parasitol. 2004; 12: 80-81.

Murray CK, Bennett JW. Rapid diagnosis of malaria. Interdiscip. Perspect. Infect. Dis. 2009; 2009: 415953.

Murugan K, Vadivalagan C, Karthika P, Panneerselvam C, Paulpandi M, Subramaniam J, Wei H, Alsalhi MS, Devanesan S, Nicoletti M, Paramasivan R, Parajulee MN, Benelli G. DNA barcoding and molecular evolution of mosquito vectors of medical and veterinary importance. Parasitol. Res. 2016; 115: 107-121.

Navarrete I, Reina D, Hernadez-Rodriguez S, Martinez-Moreno FJ, Galeano C. Preliminary studies on bovine hypodermosis in the province of Caceres (Spain). Proc. of symposium on the control methods for warble fly in cattle and goats held, 16-18 September 1993, Brussels, 3-11.

Nielsen SA, Kristensen M. Delineation of *Culicoides* species by morphology and barcode exemplified by three new species of the subgenus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from Scandinavia. Parasit. Vectors 2015; 8: 151.

Nogge G, Staack W. Das flugverhalten der dasselfliege (*Hypoderma* Latreille) (Diptera, hypodermatidae) und das biesen der rinder. Behavior. 1969; 35: 200-211.

Noon JB, Aroian RV. Recombinant subunit vaccines for soil-transmitted helminths. Parasitology. 2017; 144: 1845-1870.

Noya O, Patarroyo ME, Guzmán F, Alarcón de Noya B. Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. Curr. Protein Pept. Sci. 2003; 4: 299-308.

Nural B, Erdemir A, Mutlu A, Yakarsonmez, Danis O, Topuzogullari M, Tugut-Balik D. Biochemical and in silico Characterization of Recombinant L-Lactate Dehydrogenase of *Theileria annulata.* Mol. Biotechnol. 2016; 58: 256-267.

O'Brien DJ. Warble fly prevalence in europe 1997 after COST 811. In: Boulard C, Sol J, O'Brien D, Webster K, Sampimon OC. (Edts), COST 811 Improvements in the Control Methods for Warble Fly in Livestock. European Commission, Brussels, 1998: 20-27.

Otranto D, Colwell DD, Traversa D, Stevens JR. Species identification of *Hypoderma* affecting domestic and wild ruminants by morphological and molecular characterization. Med. Vet. Entomol. 2003a; 17: 316-325.

Otranto D, Johnson G, Syvrud K, Yoon S, Hunter III JS, Rehbein S. Treatment and control of bovine hypodermosis with ivermectin long-acting injection (IVOMEC® GOLD). Parasit. Vec. 2016; 9: 551.

Otranto D, Testini G, Sottili R, Capelli G, Pucini V. Screening of commercial milk sample using ELISA for immuno-epidemiological evidence of infestation by the cattle grub. Vet. Parasitol. 2001; 99: 241-248.

Otranto D, Traversa D, Colwell DD, Guan G, Giangaspero A, Boulard C, Yin H. A third species of *Hypoderma* (Diptera, Oestridae) affecting Cattle and Yaks in China: Molecular and morphological evidence. J. Parasitol. 2004; 90: 374-380.

Otranto D, Traversa D, Tarsitano E, Stevens JR. Molecular differentiation of *Hypoderma bovis* and *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae) by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Vet. Parasitol. 2003b; 112: 197-201.

Otranto D, Zalla P, Testini G, Zanaj S. Cattle grub infestation by *Hypoderma* species in Albania and risk for European countries. Vet. Parasitol. 2005; 128: 157-162.

Otranto D. The immunology of myiasis: parasite survival and host defense strategies. Trends Parasitol. 2001a; 17:176-182.

Ozdal N, Deger S. Van Belediye mezbahasında kesilen sığır, koyun ve keçilerde hypodermosis. Yüzüncü Yıl Üniv. Vet. Fak. Derg. 2005; 16: 23-25.

Ozensoy S, Ozbel Y, Turgay N, Alkan MZ, Gul K, Gilman-Sachs A, Chang KP, Reed SG, Ozcel MA. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1998; 59: 363-369.

Özer E, Şaki CE. Myiasis'de İmmunite. Ed: Özcel MA, İnci A, Turgay N, Köroğlu E. Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji. ISBN 978-975-94646-8-4. Türkiye Parazitoloji Derneği, İzmir, 2007: 695-701.

Özkutlu Z, Sevgili M. Şanlıurfa yöresindeki sığırlarda hypodermosis'in seroprevalansı. Türkiye Parazitol. Derg. 2005; 29: 275-279.

Pages N, Munoz-Munoz F, Talavera S, Sarto V, Lorca C, Nunez JI. Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on barcode regions. Vet. Parasitol. 2009; 165: 298-310.

Panadero R, Dacal V, López C, Vázquez L, Cienfuegos S, Díaz P, Morrondo P, Díez-Baños P. Immunomodulatory effect of Hypoderma lineatum antigens: in vitro effect on bovine lymphocyte proliferation and cytokine production. Parasite Immunol. 2009; 31: 72-77.

Panadero R, Fernández M, Vázquez L, López C, Dacal V, Cienfuegos S, Díaz P, Morrondo P, Díez-Baños P. Occurrence and larval growth of *Hypoderma lineatum* in the oesophagi of cattle from Northwest Spain: influence of geographical and climatic conditions. Med. Vet. Entomol. 2007a; 21: 225-230.

Panadero R, López C, Carballo C, Casais R, Paz A, Morrondo P, Díez-Baños P. Assessment of a recombinant antigen versus natural hypodermin C for the serodiagnosis of hypodermosis in cattle. Parasitol. Res. 2000b; 86: 67-68.

Panadero R, López C, Díez N, Paz A, Morrondo P. Influence of internal and environmental factors on the distribution and occurrence of *Hypoderma* (Diptera: oestridae) in cattle in Galicia (northwest of Spain). J. Med. Entomol. 2000a; 37: 27-28.

Panadero R, López C, Paz A, Díez P, Morrondo P. Estudio sobre el desarrollo de las larvas esofágicas de *Hypoderma lineatum* y su relación con el tratamiento precoz de la hipodermosis bovina en el norte de España. Vet. Mex. 1998; 29: 155-159.

Panadero R, López C, Vázquez L, Díaz, P, Pérez A, Cabanelas E, Morrondo P, Diez-Banos P. Effect of reinfestations on systemic immune responses in cattle naturally infested by *Hypoderma* sp. (Diptera: oestridae). Vet. Parasitol. 2013; 193: 238-244.

Panadero R, Varas G, Pajares G, Markina F, López C, Díaz P, Pérez-Creo A, Prieto A, Díez-Baños P, Morrondo P. *Hypoderma actaeon*: an emerging myiasis in roe deer (*Capreolus capreolus*). Med. Vet. Entomol. 2017; 31: 94-96.

Panadero R, Vázquez L, Colwell DD, López C, Dacal V, Morrondo P, Díez-Baños P. Evaluation of an antigen capture ELISA for the early diagnosis of *Hypoderma lineatum* in cattle under field conditions. Vet. Parasitol. 2007b; 147: 297-302.

Panadero, R, López C, Parra F, Morrondo P, Díez-Banos P, Colwell DD. Detection of circulating hypodermin C: an antigen capture ELISA for diagnosis of cattle grub (Diptera: oestridae) infestations. Vet. Parasitol. 2002; 108: 85-94.

Papadopoulos E, Himonas C, Boulard C. The prevalence of bovine hypodermosis in Greece. Parassitologia. 1997; 39: 431-433.

Patton WS. Notes on myiasis producing Diptera of man and animals. Bull. Entomol. Res. 1922; 12: 239-261.

Pérez de León AA, Mitchell RD 3rd, Watson DW. Ectoparasites of Cattle. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 2020; 36: 173-185.

Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. Mol. Biol. Evol. 2008; 25: 1253-1256.

Pruett JH, Barrett CC, Fisher WF. Kinetic development of serum antibody to purified *Hypoderma lineatum* proteins in vaccinated and non-vaccinated cattle. Southwest Entomol. 1987; 12: 79-88.

Pruett JH, Barrett CC. Kinetic development of humoral anti-*Hypoderma lineatum* antibody activity in the serum of vaccinated and infested cattle. Southwest Entomol. 1985; 10: 39-48.

Pruett JH, Fisher WF, Temeyer KB. Evaluation of purified proteins of *Hypoderma lineatum* and *Hypoderma bovis* for a vaccine against bovine hypodermosis. Southwest Entomol. 1989; 14: 363-373.

Pruett JH, Kunz SE. Warble stage development of third instars of *Hypoderma lineatum* (Diptera: oestridae). J. Med. Entomol. 1996; 33: 220-223.

Pruett JH, Stromberg P. Effect of adjuvants on bovine humoral and celliular responses to hypodermin A. Vet. Parasitol. 1995; 58: 143-153.

Pruett JH, Temeyer KB, Burkett BK. Antigenicity and immunogenicity of *Hypoderma lineatum* soluble proteins in the bovine host. Vet. Parasitol. 1988; 29: 53-63.

Rambozzi L, Rimella R, Curcio A, Sala L, Rossi L. Field efficacy of minidosed eprinomectin against *Hypoderma* spp. in dairy cattle. Vet. Parasitol. 2006; 135: 89-91.

Rasulov IH, Askarkhodjaeva K, Kuchbaev AE. Seasonal dynamics of the migration of *Hypoderma lineatum* and *Hypodema bovis* larvae in Uzbekistan. Chinese J. Vet. Parasitol. 2004; 12: 73-75.

Rehbein S, Holste JE, Smith LL, Lloyd LJ. The efficacy of eprinomectin extended-release injection against *Hypoderma* spp. (Diptera: oestridae) in cattle. Vet. Parasitol. 2013; 192: 353-358.

Reina D, Martínez-Moreno FJ, Martíez-Moreno A, Molina JM, Hernandez S. Present status of warble in Extremadura (South-West of Spain). In: Pfister K, Charbon JL, Tarry DW, Pithan K. (Eds.), Improvements in the Control Methods for Warble-fly in Cattle and Goats. Commission of the European Communities, Brussels, 1994: 59-64.

Ripley BW. Obstacles to the development of a safe and effective attenuated pre-erythrocytic stage malaria vaccine. Microbes Infect. 2007; 9: 761-766.

Rosano GL, Morales ES, Ceccarelli EA. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. Protein Sci. 2019; 28: 1412-1422.

Saha S, Raghava GP. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. Proteins. 2006; 65: 40-48.

Sahibi H, Berrang B, Rhalem A. Seroepidemiology of bovine hypodermosis and its control in the Gharb (Morocco). In: Boulard C, Sol J, Pitham K, O'Brien D, Webster K, Samplimon O. (Eds.), Improvements in the Control for Warble Fly in Livestock. COST Action 811, Kinsale, Ireland, 1995: 2-23.

Saidani K, Benakhla A, Díez-Baños P, Panadero R. Chronobiology of *Hypoderma* spp. in North-central Algeria as a basis to establish a control program. Parasitol. latinoam. 2011; 70: 157-162.

Saidani K, López CM, Díaz P, Cabanelas E, Pérez-Creo A, Kaddour A, Morrondo P, Díez-Baños P, Benakhla A, Panadero R. Bovine hypodermosis in the Maghreb: sero-epidemiological study in Algeria by indirect ELISA. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 2016; 22: 757-763.

Saidani K, Lopez-Sandez Ce, Diaz-Fernandez P, Morrondo P, Diez-Banos P, Benakhla A, Panadero R. Effect of climate on the epidemiology of bovine hypodermosis in Algeria. Kafkas Univ. Vet. Fak. 2016; 22: 147-154.

Sandeman RM, Bowles VM, Colwell DD. The immunobiology of myiasis infections-whatever happened to vaccination. Parasite Immunol. 2014; 36: 605-615.

Santagada G, Otranto D, Traversa D, Faliero S, Puccini V. Comparative study of anti-*Hypoderma* antibody kinetics in sera, single and bulk milk samples of naturally infested cattle. Parassitologia 2001; 43: 109-111.

Saraswat M, Musante L, Ravidá A, Shortt B, Byrne B, Holthofer H. Preparative purification of recombinant proteins: current status and future trends. Biomed. Res. Int. 2013; 2013: 312709.

Sayın F, Kalkan A, Karaer Z. Türkiye'de sığır hypodermosis'i üzerine epidemiyolojik araştırmalar. F.Ü. Sağ. Bil. Vet. Derg. 2000: 14; 115-127.

Sayin F, Meric I. Field trials with Ruelene 6-R and Tiguvonfor the control of *Hypoderma* larvae in cattle Ankara. Univ. Vet. Fak. Derg. 1976; 28: 302-307.

Sayin Ipek DN, Diker AI. Seroprevalence and economic significance of hypodermosis in cattle in Diyarbakır province. Eurasian J.Vet. Sci. 2016; 32: 236-241.

Scholl PJ. A review of parasites, pathogens and predators of cattle grubs. Southwest. Entomol. 1990; 15: 360-365.

Scholl PJ. Biology and control of cattle grubs. Annu. Rev. Entomol. 1993; 39: 53-70.

Scholl PJ. The current status of hypodermosis in North America. In: Boulard C, Sol J, Pithan K, O'Brien D, Webster K, Sampimon OC. (Eds.), Improvements in the Control Methods for Warble Fly in Livestock, Tours, France, 5-7 June 1997, Cost 811, C.E.C., Luxembourg, 1998: 38-41.

Seitzer U, Beyer D, Kullmann B, Bakheit MA, Ahmed JS. Evaluation of *Theileria annulata* recombinant immunodominant proteins for the development of ELISA. Transbound. Emerg. Dis. 2008; 55: 244-248.

Sen SK, Fletcher TB. Veterinary Entomology and Acarology in India. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, 1962: 1-668.

Shah SNH, Beg MK, Siddiqui ID, Ansari MY. Incidence of warble fly in livestock population of N.W.F.P. (Pakistan). J. Anim. Health Pro. 1981; 3: 43-48.

Sharma, HC. Global Warming and Climate Change: Impact on Arthropod Biodiversity, Pest Management, and Food Security. In: National Symposium on Perspectives and Challenges of Integrated Pest Management for Sustainable Agriculture, Solan. 19-21 Nov. 2010.

Shoop WL, Egerton JR, Eary CH, Haines HW, Michael BF, Mrozik H, Eskola, P, Fisher MH, Slayton L, Ostlind DA, Skelly BJ, Fulton RK, Barth D, Costa S, Gregory LM, Campbell WC, Seward RL, Turner MJ. Eprinomectin: a novel avermectin for use as a topical endectocide for cattle. Int. J. Parasitol. 1996; 26: 1237-1242.

Simsek S, Utuk AE, Koroglu E, Dumanli N. Seroprevalence of hypodermosis in cattle in some provinces of Turkey. Res. Vet. Sci. 2008; 84: 246-249.

Sinclair IJ, Tarry DW, Wassall DA. Persistence of antibody in calves after an infection with *Hypoderma bovis*. Res. Vet. Sci. 1984; 37: 383-384.

Sinclair IJ, Wassall DA. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Hypoderma bovis* in cattle. Res. Vet. Sci. 1983; 34: 251.

Singh JL, Banerjee PS, Gupta GC. Therapeutic management of hypodermal myiasis in a cow. A case report. Indian J. Vet. Med. 2001; 21: 108.

Soni BN, Khan MA. 1945. Ox warble fly in India. Vol. 5: 3.

Soulsby EJL. Helminths, Artropods and Protozoa of Domesticated Animals. Seventy edition, ELBS and Bailliere Tindal, London, 1982; 432.

T.C. Ticaret Bakanlığı. Deri ve deri mamulleri sanayi raporu. 2020; 1-11 https://ticaret.gov.tr/data/5b87000813b8761450e18d7b/Deri_ve_Deri_Mamulleri_Sektörü.pdf. (Erişim tarihi: 22.03.2020).

Tagari V, Manehasa M. Disa te dhena mbi kriveliozen (Hipodermatozen) e dhive, demet qe shkakton dhe luftimi: saj. Bul. shkencare Bujqesore. 1973; 12: 81-96.

Tarry DW. Warble Fly Infestation and Climate. Vet. Rec. 1980; 106: 559-560.

Tassi P, Puccini V. Bovine hypodermosis in the province of Foggia, South-eastern Italy. Atti Soc. Ital. Sci. Vet. 1985; 39: 765-768.

Taşcı S, Değer S, Akgül Y. Van Yöresinde Hypodermosis. YYU Vet. Fak. Derg. 1994; 5: 143-153.

Taşçı GT, B Sarı, NP Aydın, Z Vatansever, N Ölmez, Akca A., Arslan MÖ. Epidemiological survey and economic significance of bovine hypodermosis on the Kars Plateau in the Northeast Anatolia Region of Turkey. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2018; 42: 277-284.

Taylor MA, Coop RL, Wall RL. Veterinary Entomology. In: Veterinary Parasitology. Fourty edition, Wiley Blackwell, India, 2016: 209-210.

Temeyer KB, Pruett JH, Kuhn I, Files J. Recombinant vaccine development: a novel approach to ectoparasite control: a review of development of a recombinant vaccine for hypodermosis based on hypodermin A. SAAS Bull. Biochem. Biotechnol. 1993; 6: 31-35.

Tong NT, Imhoff JM, Lecroisey A, Keil B. Hypodermin A, a trypsin-like neutral proteinase from the insect *Hypoderma lineatum*. Biochim. Biophys. Acta. 1981; 658: 209-219.

Tüik. Türkiye İstatistik Kurumu. Haber Bülteni. Hayvancılık İstatistikleri. http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=33873. 2019. (Erişim tarihi: 20.03.2020).

UNEP/UNECE. GEO-6 Assessment for the pan-European region. United Nations Environment Programme, Nairobi, Kenya. 2016.

Uysal G. Türkiye Ekonomisinde Deri ve Deri Mamulleri Sanayinin Yeri ve Öneminin Araştırılması. Turk J. Vet. Anim. Sci. 2002; 26: 671-678.

Uysal G. Türkiye Ekonomisinde Deri ve Deri Mamulleri Sanayinin Yeri ve Önemi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1999.

Vadivalagan C, Pushparaj K, Murugan K, Panneerselvam C, Del Serrone P, Benelli G. Exploring genetic variation in haplotypes of the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) through DNA barcoding. Acta Trop. 2017; 169: 43-50.

Vaillant J, Argente G, Boulard C. Bovine Hypodermosis: a sequential procedure for observation of livestock for surveillance of recrudescence in eradicated zone. Vet. Res. 1997; 28: 461-471.

Vázquez L, Dacal V, López C, Díaz P, Morrondo P, Diez-Banos P, Panadero R. Antigen-specific antibody isotypes, lymphocyte subsets and cytokine profiles in cattle naturally infested by *Hypoderma* sp. (Diptera: oestridae). Vet. Parasitol. 2012; 184: 230-237.

Vercruysse J, Rew R. General efficacy of the macrocyclic lactones to control parasites of cattle. In: Vercruysse J, Rew R. (Edts), Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy. CABI Publishing, Oxon, UK, 2002: 185-232.

Virgilio M, Backeljau T, Nevado B, De Meyer M. Comparative performances of DNA barcoding across insect orders. B.M.C. Bioinformatics 2010; 11: 206.

Wadhwa DR, Prasad B, Katoch R. Occurrence of hypodermosis in Changar area of Himachal Pradesh. Intas Polivet. 2005; 6: 366-367.

Wall R, Shearer D. Veterinary Ectoparasites: Biology, Pathology and Control. Second edition. John Wiley & Sons, 2008: 126.

Wall R. Ectoparasites: future challenges in a changing world. Vet. Parasitol. 2007; 148: 62-74.

Weintraub J, Scholl PJ. The joint Canada-USA pilot project on warble grub control. In research highlights-1983. Lethbridge, Alta. Agric. Can. Res. Stn. 1984; 30-32.

Wellinghausen N, Abele-Horn M., Mantke OD, Enders M, Fingerle V, Gärtner B, Hagedorn J, Rabenau HF, Reiter-Owona I, Tintelnot K, Weig M, Zeichhardt H, Hunfeld KP. Immunological Methods for the Detection of Infectious Diseases, MiQ, 2018.

West HC, Bennett CL. Redefining the role of Langerhans cells as ımmune regulators within the skin. Front Immunol. 2018; 8: 1941.

Xia Y, Gu HF, Peng R, Chen Q, Zheng YC, Murphy RW, Zeng XM. COI is better than 16S rRNA for DNA barcoding *Asiatic salamanders* (Amphibia: Caudata: Hynobiidae). Mol. Ecol. Resour. 2012; 12: 48-56.

Yadav A, Katoch R, Khajuria JK, Godara R, Agrawal R. Prevalence of *Hypoderma lineatum* in cattle of Jammu region. J. Parasit. Dis. 2013; 37: 196-198.

Yadav A, Panadero R, Katoch R, Godara R, Cabanelas E. Myiasis of domestic and wild ruminants caused by Hypodermatinae in the Mediterranean and Indian subcontinent. Vet. Parasitol. 2017; 243: 208-218.

Yildirim A, Dik B, Duzlu O, Onder Z, Ciloglu A, Yetismis G, Inci A. Genetic diversity of *Culicoides* species within the Pulicaris complex (Diptera: Ceratopogonidae) in Turkey inferred from mitochondrial COI gene sequences. Acta Trop. 2019; 190: 380-388.

Yin H, Milling M, Yaun G, Haung S, Liu Z, Luo J, Guan G. Hypodermosis in China. J. Anım. Vet. Adv. 2003; 2: 179-183.

Zeybek H. Ankara yöresi sığır ve tiftik keçilerinde *Hypoderma* spp. (nokra)'nın yayılışı. Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg. 1988; 6: 45-56.

Zeyrek FY, Korkmaz M, Ozbel Y. Serodiagnosis of anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania tropica* in Sanliurfa Province, Turkey, where ACL Is highly endemic. Clin. Vaccine Immunol. 2007; 14: 1409-1415.

Zhang R, Zhao A, Wang X, Zhang Z. Diversity of tick species on domestic animals in Shandong Province, China, using DNA barcoding. Exp. Appl. Acarol. 2017; 73: 79-89.

Zhang RL, Zhang B. Prospects of using DNA barcoding for species identification and evaluation of the accuracy of sequence databases for ticks (Acari: Ixodida). Ticks Tick Borne Dis. 2014; 5: 352-358.

Ziomko I, Cencek T, 2001. Development of the ELISA kit for the detection of *Hypoderma bovis* antibodies in cattle. I. Development of components. Wiad. Parazyt. 2001; 47: 497-503.

Zumpt F. Myiasis in Man and Animals of the Old World. Butterworths, London, 1965: 205-214.

HYPODERMA BOVIS HYPODERMIN REKOMBİNANT ANTİJENLERİNİN KARAKTERİZASYONU, EKSPRESYON PROFİLLERİ VE SEROLOJİK TEŞHİSTEKİ ETKİNLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

%6	%5	%3	%
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	cms.galenos.com.tr İnternet Kaynağı	%2
2	ercivet.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
3	turkiyeparazitolojidernegi.org İnternet Kaynağı	<%1
4	YABANERİ, Feray, İNCİ, Abdullah, YILDIRIM, Alparslan, ÖNDER, Zuhal, ÇİLOĞLU, Arif and DÜZLÜ, Önder. "AVANOS YÖRESİ SOKAK KÖPEKLERİNDE DİROFİLARİA İMMİTİS'İN PREVALANSININ BELİRLENMESİ", Fırat Üniversitesi, 2017. Yayın	<%1
5	manualzz.com İnternet Kaynağı	<%1
6	Anish Yadav, Rosario Panadero, Rajesh	

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Mübeccel OKUR

Uyruğu: (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 26 Mayıs 1990, Antalya

Medeni Durumu: Bekar

Email: m.okurr@hotmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Melikgazi/ KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lise	Karatay Lisesi/ Antalya	2007
Lisans	Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi/ Biyoloji	2012
Tezli Yüksek Lisans	Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü/ Biyoloji	2015

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

Ulusal ve Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Okur M, Yildirim A, Inci A. "First molecular characterization of the facultative myiasis agent *Eristalis tenax* in Turkey using mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I DNA barcoding sequences". Turk J Vet Anim Sci. 2020; 44: 449-455.

2. Bilgin T, Usluğ S, Karademir GK, **Okur M**, Yetişmiş G, Yıldırım A. Sağlıklı Sığırlarda *Enterocytozoon bieneusi*'nin Moleküler Prevalansı ve Filogenetik Karakterizasyonu. Turkiye Parazitol Derg 2020; 44(1): 36-42.

3. Karademir GK, Usluğ S, **Okur M,** İnci A, Yıldırım A. Molecular Characterization and Phylogenetic Analyses of *Oestrus ovis* Larvae Causing Human Naso-pharyngeal Myiasis Based on CO1 Barcode Sequences. Turkiye Parazitol Derg 2020; 44(1): 43-47.

4. Demircan K, Onder Z, Duzlu O, Yildirim A, **Okur M,** Ciloglu A, Yetismis G, Inci A, "First Molecular Detection and Phylogenetic Analyses of Zoonotic *Giardia intestinalis* in Horses in Turkey" J Equine Vet Sci, 2019; (80): 56-60.

5. Onder Z, Ciloglu A, Duzlu O, Yildirim A, **Okur M,** Yetişmiş G, İnci A. "Molecular detection and identification of *Wolbachia* endosymbiont in fleas (Insecta: Siphoneptera)" Folia Microbiologica, 2019; 64(6): 789-796.

6. Onder Z, Duzlu O, Bilgin M, Çiloğlu A, Yetişmiş G, **Okur M,** Demirpolat G, Şahin ÖF, Yıldırım A, İnci A. "The Treatment Efficacy of Ricobendazole in Naturally Infected Sheep wıth Gastroıntestınal Nematodes (Trichostrongylidae)" Journal of Health Sciences, 2018; 27 (3): 211-216.

7. Onder Z, Duzlu O, Yildirim A, Ciloglu A, **Okur M,** Inci A. "Molecular characterization of horn fly *Haematobia irritans* irritans infesting horses in Central Anatolia Region in Turkey" J Equine Vet Sci, 2018; (64): 49-54.

8. İnci A, **Okur M,** Yıldırım A, Düzlü Ö. "Genel Bakış: eksozomlar ve bazı parazit protozoon enfeksiyonlardaki rolleri" Erciyes Üniv Vet Fak Derg, 2018; 15(2): 179-189.

Uluslararası veya Uluslararası katılımlı bilimsel toplantılarda sunulan bildiri ve poster

1. Okur M, Yildirim A, Inci A, "*Hypoderma bovis* hypodermin A, B ve C antijenlerini kodlayan genlerin klonlanması, gen ekspresyonu ve karakterizasyonu" Uluslararası Katılımlı 21. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Çeşme/İzmir, 28 Eylül-3 Ekim, pp. 346-347.

2. Okur M, Yildirim A, Karademir GK, Önder Z, Düzlü Ö, Şahin ÖF, Simsek E, Yetismis G, Çiloğlu A, Inci A. "Kayseri Yöresinde İzole Edilen Fakültatif Myiasis Etkeni *Eristalis tenax*'ın Mitokondrial Cytochrome C Oxidase Subunit I DNA

Barkodlaması ve Filogenetik Karakterizasyonu" Uluslararası Katılımlı 21. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Çeşme/İzmir, 28 Eylül-3 Ekim, pp. 385-386.

3. Okur M, Yildirim A, Düzlü Ö, Çiloğlu A, Önder Z, Ergen Gürsoy A, Dik B, Yetişmiş G, İnci A. "Molecular investigation of *Atoxoplasma* spp. in free-range chickens along with some findings on migrating avian species from Sultan Marshes in Turkey" International Poultry Science Congress of WPSA Turkish Branch 2018, Nevşehir, 9-12 May 2018, pp. 57-60.

4. Okur M, Karatepe M, Yildirim A. "Antalya'nın Korkuteli yöresi keçilerinde *Neospora caninum* antikorlarının prevalansı" Uluslararası Katılımlı 20. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Eskişehir, 25-29 Eylül 2017, pp. 539-539.

PROJELER

Türkiyede önemli *Hyalomma* türlerinde (*Hyalomma marginatum*, *H. anatolicum*, *H. excavatum*) kene aşısı adayı antijenlerden enolase'ın moleküler karakterizasyonu ve ekspresyonu, BAP (NAP Projesi), Öğrenci Araştırmacı, 2019-devam ediyor

Sultan Sazlığı Ekosisteminde Kanatlı Haemosporidialarının Moleküler Ekolojisi, TÜBITAK Projesi, 114O646, Bursiyer Öğrenci, 2014-2018