



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

# ORTA KARADENİZ BÖLGESİNDE SIĞIR HYPODERMOSİSİNİN SERO-EPİDEMİYOLOJİSİ

DOKTORA TEZİ

Selma KAYA

Samsun  
Mayıs – 2014



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

# ORTA KARADENİZ BÖLGESİNDE SIĞIR HYPODERMOSİSİNİN SERO-EPİDEMİYOLOJİSİ

**DOKTORA TEZİ**

**Selma KAYA**

**Danışman  
Doç. Dr. Mustafa AÇICI**

**Samsun  
Mayıs – 2014**

## TEŞEKKÜR

Araştırmanın planlanması ve yürütülmesi sırasında yardım ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Mustafa AÇICI'ya; doktora öğrenimim boyunca kendisinden aldığım derslerle bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, hocalarım Prof. Dr. Şinasi UMUR'a, Yrd. Doç. Dr. A. Tümay GÜRLER'e ve Yrd. Doç. Dr. Cenk S. BÖLÜKBAŞ'a; moleküler parazitoloji konusunda benden yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. G. Zafer PEKMEZCİ'ye ve Vet. Hek. Emre ÖZAN'a; istatistik değerlendirmelerime katkıda bulunan Zootekni Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Filiz AKDAĞ'a; numunelerin toplanmasında yardımcı olan il ve ilçelerde çalışan Veteriner Hekim meslektaşlarıma; beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum ve her an desteklerini yanımda hissettiğim arkadaşlarım Dr. Rahşan AKPINAR'a, Uzm. Vet. Hek. Mitat KURT'a ve Vet. Sağ. Tek. Gökhan GÜVEN'e; çalışmamın her aşamasında hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen Enstitü Müdürümüz İsmail AYDIN'a ve her alanda desteğini yanımda hissettiğim sevgili eşime, hayatıma anlam katan çocuklarım Esra ve Mahmut'a;

Vet.1904.11.003 no'lu proje ile doktora tez çalışmamı destekleyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığına ve TAGEM/ HS/11/01/02/185 no'lu doktora tez projemi destekleyen Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

**ÖZET**  
**ORTA KARADENİZ BÖLGESİNDE SIĞIR HYPODERMOSİSİNİN SERO-  
EPİDEMİYOLOJİSİ**

**Amaç:** Orta Karadeniz Bölgesi'nde mevcut türlerin oluşturdukları enfestasyonların epidemiyolojik karakteristiğinin moleküler ve serolojik yöntemlerle ortaya konması, *Hypoderma* türlerinin bölgedeki larval dönem zamanının belirlenmesi ve hastalıkla mücadele stratejilerine yardımcı olunması amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** Orta Karadeniz Bölgesi'nde (Samsun, Ordu, Sinop, Tokat ve Amasya) 1560 sığır serumu, 93 süt serumu ile mezbahalardan toplanan 77 larva incelendi. Larvaların DNA ekstraksiyonunu takiben PCR-RFLP ve sekans analizleri yapıldı. Örneklerde ELISA ile hypoderma antikorları arandı. Larvalardan hazırlanan antijenler ile tavşanlar immünize edildi. Antijenler SDS-PAGE'de yürütülerek membrana transfer edildi. Western blot ile sığırlarda ve immunize tavşanlarda antikorların varlığı test edildi.

**Bulgular:** Toplanan larvalar stereo-mikroskopta *H. bovis* olarak tespit edildi. Larval DNA PCR ile çoğaltıldı ve elektroforezde 680 bp düzeyinde bantlar görüntüledi. Sonra PCR-RFLP uygulandı ve *H. bovis*'e ait bant profilleri elde edildi. DNA dizi analizi sonucu da etken *H. bovis* olarak belirlendi. Toplam 1560 kan serumunda ELISA testi sonucunda %35,2 seropozitiflik tespit edildi. Seropozitiflik illere göre, Samsun %56,4; Sinop %50,6; Amasya %36,8; Ordu %23,1 ve Tokat %9,2 olarak kaydedildi. Lâdik'te 93 süt örneğinde ELISA sonucu %61,3 seropozitiflik saptandı. Ayrıca *H. bovis* L<sub>3</sub> antijenlerinin seropozitif sığırların tespitinde kullanılamayacağı anlaşıldı.

**Sonuç:** Bu çalışma, Orta Karadeniz Bölgesi'nde Hypodermosis ile ilgili yapılan ilk moleküler çalışma olmuştur. Toplanan *Hypoderma* larvalarından moleküler olarak tek tür *H. bovis* saptanmıştır. Araştırılan beş ilde, *H. bovis*'in L<sub>3</sub> döneminin toprağa düşme zamanı Mayıs-Haziran olarak belirlenmiştir. Hypodermosisin erken tanısı için L<sub>1</sub> döneminin ELISA ile belirlenmesi, yapılacak ilaçlama çalışmalarının daha etkili ve ekonomik olmasını sağlayacaktır. *Hypoderma* larvalarının doğru teşhisi için, mikroskobik teşhisin yanı sıra, moleküler teşhis teknikleri de kullanılmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Epidemiyoloji, Hypodermosis, ELISA, PCR-RFLP, Sığır, Türkiye

**Selma KAYA, Doktora Tezi**

**Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Mayıs-2014**

## ABSTRACT

### THE SERO-EPIDEMIOLOGIC ANALYSIS OF CATTLE HYPODERMOSIS IN THE CENTRAL BLACK SEA REGION

**Aim:** The present study aimed to determine epidemiologic characteristics of hypoderma infestations by molecular and serological methods in the Central Black Sea Region; define larval stages of *Hypoderma* species; and to help creating strategies against the spreading of the disease.

**Materials and Methods:** A total of 1,560 blood serum, 93 milk serum and 77 larvae from cattle were collected in this region. Following the DNA extraction of larvae, PCR-RFLP and sequence analysis was performed. Serum samples were tested for anti-hypoderma antibodies by ELISA. Rabbits were immunized with larval antigens. Following the SDS-PAGE, the protein bands were transferred onto membrane. The antibodies in cattle and rabbits were tested by Western blotting.

**Results:** The larvae collected from the five provinces were all identified as *H. bovis* under stereomicroscope. The larval DNAs were amplified by PCR and electrophoresed. Bands were seen at 680 bp level. The PCR-RFLP technique applied to the PCR product and band profiles specific to *H. bovis* were obtained. Moreover, PCR products of 77 larvae also identified as *H. bovis* by DNA sequence analysis. The analysis of 1560 serum samples by ELISA revealed 35.2% seropositivity in the region. The seroprevalence was recorded as 56.4% in Samsun, 50.6% in Sinop, 36.8% in Amasya, 23.1% in Ordu and 9.2% in Tokat. The ELISA analysis of 93 milk samples revealed 61.3% seropositivity. Furthermore, L<sub>3</sub> *H. bovis* antigens are not suitable for the determination of seropositive samples.

**Conclusion:** This is the first molecular study on hypodermosis in this region. Only one species of *H. bovis* was detected from the *Hypoderma* larvae by molecular methods. The larvae fall to the earth during the May-June period in these five cities. For the early intervention against hypodermosis, an insecticide application preceded by the detection of L<sub>1</sub> stage by ELISA would be more effective and economical. For the accurate diagnosis of the hypoderma larvae molecular techniques should be used, in addition to microscopic diagnosis.

**Keywords:** Epidemiology; Hypodermosis; ELISA; PCR-RFLP; Cattle; Turkey

Selma KAYA, PhD Thesis

Ondokuz Mayıs University - Samsun, May-2014

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>Ag</b>	Antigen
<b>AE</b>	Elution solüsyonu
<b>AL</b>	Lize edici solüsyon
<b>ATL</b>	Doku lize edici solüsyon
<b>AW1</b>	Yıkama solüsyonu 1
<b>AW2</b>	Yıkama solüsyonu 2
<b>bp</b>	Base pair
<b>BSA</b>	Bovin Serum Albumin
<b>BCIP</b>	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
<b>C<sub>3</sub></b>	Complement 3
<b>C3a</b>	Complement 3a
<b>CD<sub>2</sub></b>	Cluster of differentiation 2
<b>CD<sub>14</sub></b>	Cluster of differentiation 14
<b>CD<sub>18</sub></b>	Cluster of differentiation 18
<b>cm</b>	Santimetre
<b>COI</b>	Cytochrome C Oxidase 1
<b>COII</b>	Cytochrome C Oxidase 2
<b>CO<sub>2</sub></b>	Karbondioksit
<b>cox1</b>	Cytochrome C Oxidase 1
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Distile su
<b>dk</b>	Dakika
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	Deoksinükleotit
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>glob-1</b>	Gasterophilus intestinalis hemoglobin
<b>HA</b>	Hipodermin A
<b>HB</b>	Hipodermin B
<b>HC</b>	Hipodermin C
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase
<b>IgG</b>	İmmunglobulin G
<b>IgG1</b>	İmmunglobulin G1

<b>IgG2</b>	İmmunglobulin G2
<b>IgM</b>	İmmunglobulin M
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	İnterferon gama
<b>IL4</b>	İnterleukin 4
<b>IL10</b>	İnterleukin 10
<b>IL2</b>	İnterleukin 2
<b>IBM</b>	The International Business Machines Corporation
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>M</b>	Molar
<b>m</b>	Metre
<b>mg</b>	Miligram
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Mağnezyum klorür
<b>ml</b>	Mililitre
<b><math>\mu</math>l</b>	Mikrolitre
<b>mm</b>	Milimetre
<b>mM</b>	Milimol
<b>mtDNA</b>	Mitokondriyal DNA
<b>MW</b>	Molecular weight
<b>NaCl</b>	Sadyum klorür
<b>NBT</b>	Nitro blue tetrazolium
<b>NCP</b>	Nitro selüloz membran
<b>nm</b>	Nanometre
<b>PBS</b>	Phosphate buffer saline
<b>PCR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>pmol</b>	Pikomol
<b>RE</b>	Restriksiyon enzimi
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>Rpm</b>	Revolution per minute
<b>ROC</b>	Receiver Operating Characteristic
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamid Gel Electrophoresis
<b>Se</b>	Sensivite

<b>Sp</b>	Spesifite
<b>TAE</b>	Tris asetat EDTA
<b>TMB</b>	Tetra metil benzidin
<b>TBS</b>	Tris buffer saline
<b>Th<sub>1</sub></b>	Yardımcı T hücreleri 1
<b>Th<sub>2</sub></b>	Yardımcı T hücreleri 2
<b>tRNA-Leu</b>	Transfer RNA Leucine
<b>tRNA-Ile</b>	Taşıyıcı RNA Ile
<b>TÜİK</b>	Türkiye İstatistik Kurumu
<b>TTBS</b>	Tween tris buffer saline
<b>U</b>	Ünite
<b>UV</b>	Ultra viole
<b>WB</b>	Western blot
<b>°</b>	Derece
<b>°C</b>	Santigrat derece
<b>%</b>	Yüzde
<b>&gt;</b>	Büyük
<b>&lt;</b>	Küçük
<b>≤</b>	Küçük eşit
<b>≥</b>	Büyük eşit
<b>16S rRNA</b>	16 S Ribozomal RNA



## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Laboratuvar koşullarında ısı değışikliklerinin erginlerin yaşam sürelerine etkisi	7
<b>Tablo 2.</b> Bazı <i>Hypoderma</i> türlerinin optimum çevre ısısına göre pupa süreleri	11
<b>Tablo 3.</b> Bazı <i>Hypoderma</i> türlerinin konakları ve yayılış alanları	21
<b>Tablo 4.</b> <i>Hypoderma</i> larvalarına etkili makrosiklik laktonlar	36
<b>Tablo 5.</b> Çalışma yapılan illerdeki toplam sığır sayıları	41
<b>Tablo 6.</b> Araştırmada toplanan kan serumlarının il ve ilçelere göre dağılımı	43
<b>Tablo 7.</b> PCR için ana karışımın hazırlanması	52
<b>Tablo 8.</b> PCR Protokolü	52
<b>Tablo 9.</b> Mezbahalarda toplanan <i>Hypoderma</i> larvalarının illere göre dağılımı	56
<b>Tablo 10.</b> Sığır hypodermosisinde seropozitif hayvanların illere göre dağılımı	59
<b>Tablo 11.</b> Samsun ilçelerine göre hypodermosis seropozitifliğinin dağılımı	60
<b>Tablo 12.</b> Sinop ilçelerine göre hypodermosis seropozitifliğinin dağılımı	60
<b>Tablo 13.</b> Amasya ilçelerine göre hypodermosis seropozitifliğinin dağılımı	61
<b>Tablo 14.</b> Tokat ilçelerine göre hypodermosis seropozitifliğinin dağılımı	61
<b>Tablo 15.</b> Ordu ilçelerine göre hypodermosis seropozitifliğinin dağılımı	62

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil 1. Myiasis yapan insektaların filogenik diyagramı</u>	5
<u>Şekil 2. <i>Hypoderma lineatum</i> yumurtaları</u>	8
<u>Şekil 3. <i>Hypoderma</i> spp.'nin larval dönemleri ve pupaları</u>	10
<u>Şekil 4. <i>Hypoderma bovis</i>, dişi</u>	11
<u>Şekil 5. <i>Hypoderma bovis</i>, ergin</u>	13
<u>Şekil 6. <i>Hypoderma bovis</i>'in yaşam döngüsü</u>	15
<u>Şekil 7. Epidural yağ dokuda birinci dönem <i>H. bovis</i> larvası</u>	15
<u>Şekil 8. Oestridea'larde nukleotit sekanslarına göre filogenik yapı</u>	29
<u>Şekil 9. <i>Hypoderma</i> türlerinde BfaI restriksiyon enzimi ile E4'den karboksilik ucuna (COOH) kadar uzanan bölgeyi kodlayan çok değişkenli bölge mitokondrial COI geninin PCR-RFLP ile analizi</u>	30
<u>Şekil 10. <i>Hypoderma lineatum</i> (L<sub>1</sub>) enfestasyonundan 48 saat sonra derinin histopatolojisi</u>	33
<u>Şekil 11. Orta Karadeniz Bölgesi 2011-2012 yılları ortalama sıcaklık değerleri</u>	39
<u>Şekil 12. Orta Karadeniz Bölgesi 2011-2012 yılları ortalama yağış değerleri</u>	40
<u>Şekil 13. Orta Karadeniz Bölgesi 2011-2012 yılları ortalama nem değerleri</u>	40
<u>Şekil 14. Kan serumlarının alındığı il ve ilçeler</u>	42
<u>Şekil 15. COX I gen bölgesi</u>	51
<u>Şekil 16. <i>Hypoderma bovis</i> larvaları (L<sub>3</sub>)</u>	57
<u>Şekil 17. <i>Hypoderma bovis</i> (L<sub>3</sub>) peritremiti</u>	57
<u>Şekil 18. ELISA plağında negatif ve pozitif serumlar</u>	58
<u>Şekil 19. Orta Karadeniz Bölgesi'nde hypodermosis seropozitifliğinin illere göre dağılımı</u>	59
<u>Şekil 20. Yaş gruplarında hypodermosis seroprevalansı</u>	62
<u>Şekil 21. Süt serumları için ROC analizi</u>	63
<u>Şekil 22. SDS-PAGE ile <i>Hypoderma bovis</i> (L<sub>3</sub>) polipeptit protein bantları</u>	64
<u>Şekil 23. Sığırlarda ve <i>Hypoderma bovis</i> (L<sub>2</sub> ve L<sub>3</sub>) ile immunize edilen tavşanlarda Western blot bulguları</u>	65
<u>Şekil 24. <i>Hypoderma bovis</i>'in PCR görüntüsü</u>	66
<u>Şekil 25. <i>Hypoderma bovis</i> cox1 (mtDNA) geni PCR ürünlerinin RFLP Görüntüsü</u>	67



# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	ii
<b>ABSTRACT</b>	iii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	iv
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	vii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	viii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	x
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	2
2.1. Tarihçe	2
2.2. Myiasisde Sınıflandırma ve <i>Hypoderma</i> Soyunun Taksonomisi	3
2.3. <i>Hypoderma</i> Soyunun Morfolojik ve Biyolojik Özellikleri	6
2.3.1. Erginde Genel Morfolojik ve Biyolojik Özellikler	6
2.3.2. Yumurta ve Larvaların Morfolojik ve Biyolojik Özellikleri	8
2.3.3. Pupanın Morfolojik ve Biyolojik Özellikleri	10
2.4. <i>Hypoderma bovis</i> ve <i>H. lineatum</i> 'un Morfolojik Özellikleri ve Yaşam Döngüleri	12
2.4.1. Tür: <i>Hypoderma bovis</i>	12
2.4.2. Tür: <i>Hypoderma lineatum</i>	17
2.4.3. <i>Hypoderma bovis</i> ve <i>H. lineatum</i> Arasındaki Farklar	18
2.5. <i>Hypoderma bovis</i> ve <i>Hypoderma lineatum</i> 'un Konakları	19
2.6. Hypodermosisin Epidemiyolojisi	20
2.6.1. Hypodermosisin Dünyadaki Yayılışı	20
2.6.2. Hypodermosisin Türkiye'deki Yayılışı	21
2.7. Hypodermosisin Klinik Belirtileri	22
2.8. Hypodermosisin Patogenezi ve Ekonomik Önemi	23
2.9. Teşhis	24
2.9.1. Klinik Muayene	24
2.9.2. Postmortem Muayene	25
2.9.3. <i>Hypoderma bovis</i> ve <i>H. lineatum</i> 'un Morfolojik Teşhisi	25
2.9.4. <i>Hypoderma bovis</i> ve <i>H. lineatum</i> 'un Serolojik Teşhis	26
2.9.5. <i>Hypoderma bovis</i> ve <i>H. lineatum</i> 'un Moleküler Teşhisi	27

2.10. İmmunite	30
2.10.1. Humoral Bağışıklık	30
2.10.2. Hücresel Bağışıklık	32
2.11. Hypodermosis ile Mücadele ve Kontrol	34
2.11.1. Biyolojik Kontrol	34
2.11.2. Mekanik Kontrol	35
2.11.3. Kimyasal Mücadele ve Kontrol	35
2.11.4. Genetik Kontrol	37
2.11.5. İmmunolojik Kontrol ve Aşılama	37
<b>3. MATERYAL VE METOT</b>	<b>39</b>
3.1. Çalışma Alanı	39
3.2. Saha Çalışması	41
3.2.1. Hypodermosis Yönünden Muayene Edilen Sığırlardan Alınan Kan ve Süt Örneği Sayısı	41
3.2.2. Mezbahalarda Kesilen Sığırlardan Larvaların Toplanması	43
3.3. Laboratuvar Çalışmaları	44
3.3.1. Kan ve Süt Serumlarının Çıkarılması ve Muhafazası	44
3.3.2. Larvaların Stereo-mikroskopta Morfolojik İdentifikasyonu	44
3.3.3. Deneysel Hayvanı İmmunizasyonu ve Hiperimmün Tavşan Serumu Eldesi	45
3.3.4. Serolojik-Moleküler Çalışmalar ve Sekanslama	46
3.4. İstatistiksel Analizler	55
<b>4. BULGULAR</b>	<b>56</b>
4.1. Stereo-mikroskobik Bulgular	56
4.2. Serolojik Bulgular	58
4.2.1. ELISA Bulguları	58
4.2.2. SDS-PAGE Bulguları	63
4.2.3. Western Blot Bulguları	64
4.3. PCR ve Agaroz Jel Elektrophoretiz Bulguları	65
4.4. RFLP Bulguları	66
4.5. DNA Dizi Analizi Bulguları	67
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>69</b>
<b>6. SONUC VE ÖNERİLER</b>	<b>74</b>

<b>KAYNAKLAR</b>	75
<b>EKLER</b>	90
Ek 1. <i>H. bovis</i> Samsun izolatu (KF926088.1)	90
Ek 2. <i>H. bovis</i> Ordu izolatu (KF926089.1)	91
Ek 3. <i>H. bovis</i> Sinop izolatu (KF926090.1)	92
Ek 4. <i>H. bovis</i> Tokat izolatu (KF926091.1)	93
Ek 5. <i>H. bovis</i> Amasya izolatu (KF926092.1)	94
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	95



## 1. GİRİŞ

Sığır hypodermosisi, *Hypoderma bovis* ve *Hypoderma lineatum* türlerinin larvaları tarafından oluşturulan, mevsimsel olarak sonbahar, kış ve ilkbahar döneminde görülen ve enfeste hayvanların dorsal ve lumbal bölgelerinde derialtı şişlikleri görünümünde, deri myiasis'i ile karakterize, paraziter bir hastalıktır. Hastalık dünyada tropikal ve subtropikal ülkelerde çok yaygın olup, sığırlarda et ve süt verimi ile deride oluşturduğu hasarlar nedeniyle büyük ekonomik kayıplara yol açar.

Sığır hypodermosisi Türkiye'de hayvan sağlığı ve ekonomik yönden en önemli paraziter hastalıklardan biridir (Sayın ve ark., 1982). Hypodermosiste et ve süt verimi düşer, özellikle dericilik sanayinde büyük ekonomik kayıplar meydana gelir ve hatta sporadik vakalar şeklinde abortlar görülebilir. Bunun yanında *Hypoderma* larvaları insanlarda serebral myiasis gibi zoonotik rastlansal myiasise sebep olmaktadır (Kalelioğlu ve ark., 1989).

Hastalığın zararlarını azaltmak için hypodermosiste erken tanı ve uygun insektisit kullanılması ile hypodermosisin prevalansı %5'lere kadar inebilmektedir. Bu araştırmanın amacı hypodermosisin varlığı ve yayılışı ile ilgili bilgiler ışığında *Hypoderma* larvaları ile mücadele zamanları belirlenerek, veteriner hekimlere ve hayvan yetiştiricilerine, taktik ve stratejik ilaçlama zamanlaması ve hypodermosise karşı yapılacak ilaçlama öncesi serolojik survey uygulaması konularında yol gösterici olmak ve ülke ekonomisine olumlu katkı sağlamaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

Myiasis ile ilgili olarak İngiliz arkeologlar tarafından 1889 yılında keşfedilen papirüslerde Oestridae larvalarından haberdar olduğu anlaşılmış ve papirüs çevirilerinde bir danada muhtemelen *Hypoderma bovis*'in sebep olduğu cutaneous myiasisten bahsedilmiştir (Amici, 2006). Romalılar *Hypoderma* sineklerini tanılardan ve onlara "Asilus" demişlerdir. Publius Virgilius Maro (M.Ö.71–19), Sezar'la ilgili bir şiirinde muhtemelen *Hypoderma* spp. insektalarının sığır sürülerini korkutarak nasıl kaçırdıklarını yazmıştır. Bizanslılar döneminde 10. yy., Geoponika isimli ansiklopedide, muhtemelen *Hypoderma* spp.'nin sığırlarda korku ve paniğe sebep olduğu anlatılmıştır. 1113–1162 yılları arasında yaşamış olan Doktor Abu-Merwan ibn Zuhr *Hypoderma* türlerinin sebep olduğu bir insan myiasisini tanımlamıştır. Bilimsel çalışmaların başladığı 17. yy.da Antonio Vallisneri (1661-1730) *Hypoderma* larvalarının şeklini çizmiştir (Amici, 2006). Amici (2006), Papavero (1977)'ya atfen bildirdiğine göre, İsveçli Doktor Carl von Linné (Linnaeus, 1707–1787), *Oestrus* cinsini tanımlamış, öküzlerde ve ren geyiklerinde bulunan *H. bovis* ve *H. tarandi* türlerini buna dâhil etmiştir. Fransız zoolog Pierre André Latreille (1762–1833) 1825'de *Oestrus* cinsinden sonra *Hypoderma* cinsini eklemiştir. İngiliz entomolog Eleanor Ormerod (1828–1901) *Hypoderma* larvalarının sığırlarda derinin içerisine girdiğini belirtmiştir (Bishopp ve ark., 1926; Amici, 2006). Myiasis terimi ilk olarak 1840 yılında Hope tarafından özellikle bazı diptera larvalarının insanlarda yaptığı hastalığı tanımlamak için "İnsektalar ve insan vücudunda tesadüfen bulunan larvalar" adlı kitapta bahsedilmiştir. "Myia" yunanca sinek anlamında olup Myiasis için "sinek hastalığı" denilmektedir. Hope'den önce Kerby ve Spence (1818) genel olarak insekta sınıfının larvalarının enfestasyonu için "scholechiasis" terimini kullanmışlarsa da Hope bu terimi *Lepidopterus* larvaları ile sınırlamış, bu terime karşılık ve bazı Diptera larvaları ile bağlantılı olarak, sadece kendi yeni terimini kullanmayı tavsiye etmiştir. O tarihten sonra "myiasis" terimi birçok yazar tarafından kabul edilmiş fakat sınırlı olarak kullanılmıştır (Scholl, 1993; Amici, 2006).



*Hypoderma bovis* ve *H. lineatum*'un biyolojisi ile ilgili ilk çalışmalar İtalya'da Vallisnieri tarafından 1700'lü yıllarda yapılmıştır. Ondokuzuncu yüzyılın ortalarında ise Avusturya'da Brauer tarafından bu konu ile ilgili daha kapsamlı araştırmalar yapılmıştır (Scholl, 1993; Amici, 2006).

Seymour André Hadwen (1887–1947) 1917 yılında Kanada'da bir grup uzmanla, *H. bovis* ve *H. lineatum*'un yaşam döngüsünü yayımlamışlardır (Amici, 2006). Amici (2006)'ye göre De la Torre Bueno (1937) yazdığı entomoloji atlasında Diptera larvalarının sebep olduğu hastalık ve telefata işaret etmiş ve myiasisi geniş anlamda kullanılmıştır. Myiasis tanımında en önemli kriter, bazı Diptera larvalarının normal gelişimlerinin kısmen ya da tamamen omurgalı vücudunda geçmesi, ölü ya da canlı dokularla ve vücut sıvıları ile beslenmesi ve burada patolojik bir lezyona sebep olmasıdır (Zumt, 1965; Soulsby, 1986; Dinçer, 1997). Sığır hypodermosisi, *H. bovis* (Geer, 1776) ve *H. lineatum* (Villiers, 1789) türü sineklerin larvaları tarafından oluşturulan bir deri myiasisidir (Otranto ve ark., 2001).

## **2.2. Myiasisde Sınıflandırma ve *Hypoderma* Soyunun Taksonomisi**

Myiasis etkenleri başlıca zorunlu (obligat) ve istemli (fakültatif) olmak üzere iki ana grupta kategorize edilmiştir (Patton, 1922; Zumt, 1965; Eldrige ve Edman, 2004). Oestridae ailesinin tümü spesifik ve zorunlu parazitlerdir ve gelişmelerini canlı dokularda tamamlarlar (Colwell ve ark., 2006; Azizi ve ark., 2007). Zumt (1965)'a göre oestrid türler kanla beslenme yolunu izleyerek adapte olmuşlar ve özelleşmişlerdir. Herbivorların toplu halde bulunmalarından dolayı, oestrid türler ile herbivor konak arasındaki ilişki oldukça güçlüdür.

Hypodermatinae alt ailesine ait türlerin L<sub>1</sub> ve L<sub>3</sub> dönemlerinde mandibula birleşmiştir. Bu türlerde sefalofaringial skeleton mevcut olup, torasik segmentlerde Keilin's organ (üçlü setae) bulunmaz. Yumurtaların anterior ucunda larvanın çıkacağı bir yarık bulunur. Erginlerde kanat veni M, r-m veni ile çapraz pozisyonadadır (Pape, 2006; Wood, 2006).

*Hypoderma* soyunun taksonomideki yeri aşağıdaki gibidir (Li ve ark., 2004; Colwell ve ark., 2006; Scholl ve ark., 2009; Barnard, 2011).

Kök: Arthropoda

Kök Altı: Antennata

Sınıf: Insecta

Dizi: Diptera

Alt Dizi: Brachycera

Alt Dizi Altı (Infraorder): Muscomorpha

Üst Aile: Oestridea

Aile: Oestridae

Alt Aile: Hypodermatinae

Soy: *Hypoderma* Latrille, 1818

Türler:

*Hypoderma bovis* Linnaeus, 1758

*Hypoderma tarandi* Linnaeus, 1758

*Hypoderma lineatum* Villers, 1789

*Hypoderma diana* Brauer, 1858

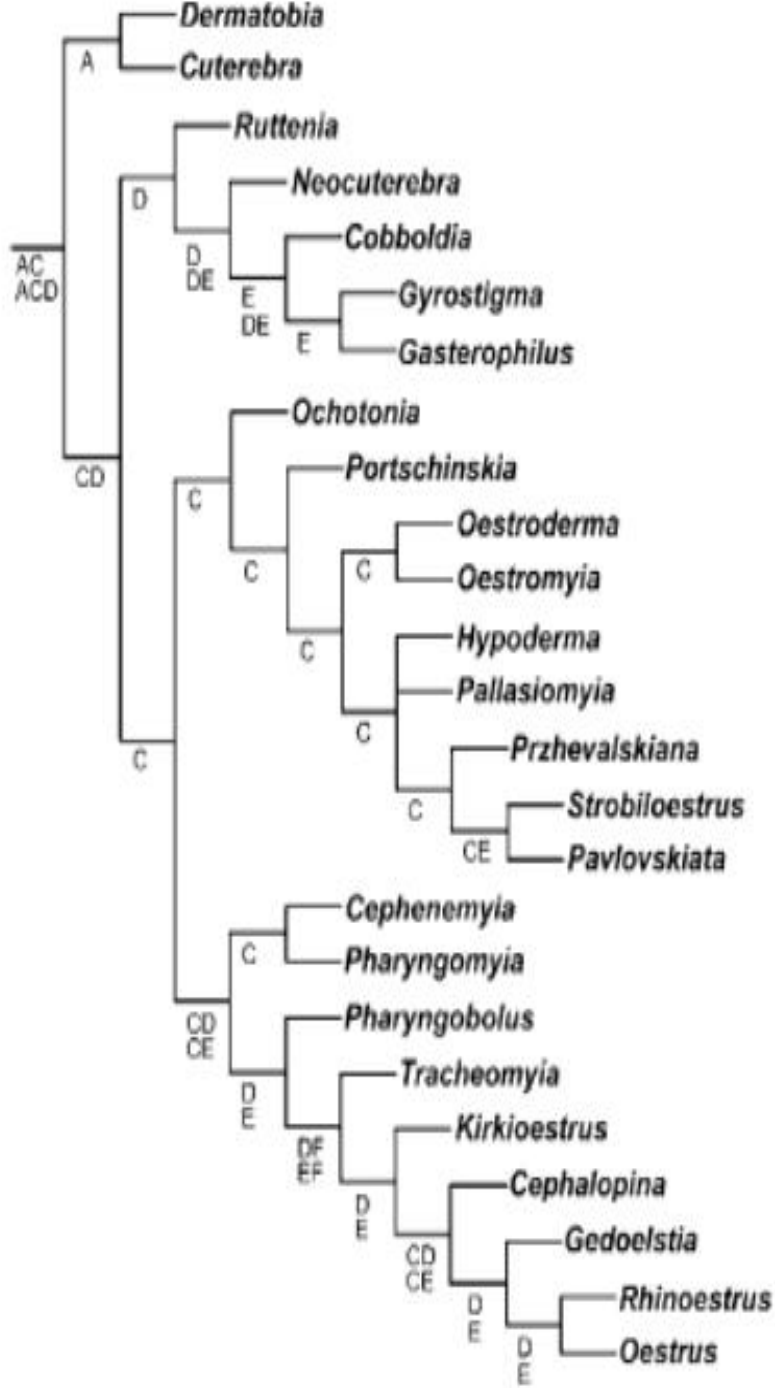
*Hypoderma actaeon* Brauer, 1858

*Hypoderma sinense* (sinensis) Pleske, 1926

Hypodermatinae alt ailesine ait soylardan *Hypoderma* sığır, geyik ve yıklarda; *Oestroderma* pika'larda; *Oestromyia* sıçan, rodent ve pika'larda; *Pallasiomyia* ve *Pavlovskiata* antiloplarda; *Portschinskia* fare ve pika'larda; *Przhevalskiana* keçi ve ceylanlarda; ve *Strobiloestrus* Afrika antiloplarında myiasise sebep olmaktadır (Colwell ve ark., 2006; Pape, 2006).

Morfolojik olarak Hypodermatinae+Oestrinae alt aileleri Gasterophilinae'nin grubu kabul edilirken, moleküler analizler Hypodermatinae+Gasterophilinae'yi Oestrinae'nin grubu olarak işaret etmektedir (Pape, 1992; Nirmala ve ark., 2001; Pape, 2001; Otranto ve ark., 2003b; Singh, 2012).

*Hypoderma* ile myiasise neden olan diğer soyların filogeni şeması ve buldukları coğrafi bölge isimleri Şekil 1’de verilmiştir (Pape, 2006).



Şekil 1. Myiasis yapan insektaların filogenik diyagramı (Pape, 2006).

(A: Neotropikal, C: Paleartik, D: Orta ve Batı Afrika, E: Güney ve Doğu Afrika, F: Avustralya)

### 2.3. Hypoderma Soyunun Morfolojik ve Biyolojik Özellikleri

*Hypoderma* soyunda 6 tür tanımlanmıştır ve hepsi holarktık coğrafik bölgedeki Bovidae (çift toynaklılar) ve Cervidae (geyikgiller) ailesine ait memelilerde enfestasyona neden olmaktadır (Pape, 2006; Otranto ve Stevens, 2006; Scholl ve ark., 2009).

#### 2.3.1. Erginde Genel Morfolojik ve Biyolojik Özellikler

*Hypoderma* soyunda bulunan sineklerin vücutları genel olarak ince ve sık tüylerle örtülüdür (Mimioğlu, 1973; Wood, 2006). Büyüklükleri 11-18 mm arasında değişmektedir (Wood, 2006). Başın alın bölgesi geniş, parlak yarım ay şeklindeki “lunula”nın üzerinde çok kısa tüyler bulunur (Şekil 4). Basit 3 oocel (basit göz) vardır. Antenleri çok kısa ve üç parçalıdır. Parlak ve yuvarlak olan ilk flagellomer pediselin kupa şeklindeki apeksine gizlenmiştir. Pedisel’in üzerinde arista (kıl veya kıl demeti) denilen bir oluşum vardır (Hunter ve Adserbella, 1996; Anderson, 2006; Wood, 2006). Rostellum atrofiye olmuş, palp bulunmaz, ayaklar ince ve uzundur. Göğüs tüylü ve mezotoraks iyi gelişmiştir, skutellum üzerinde mikrotriş setalar vardır. Kanatlarındaki ven sayısı azdır ve bütün Oestridlerde Sc, R<sub>1</sub>, R<sub>2+3</sub> ve R<sub>4+5</sub> kanadın ön kenarı arkasında yer alırlar (Wood, 2006). Son halkada birleşik halde duyu organı olan serkus bulunur. Erkekler pupadan çıkarken üreme organları tamamen gelişmiş durumdadır ve pupadan çıktıktan kısa bir süre sonra dişilerle çiftleşirler. *Hypoderma bovis*, *H. lineatum* ve *H. tarandi* yaklaşık olarak sırasıyla 551, 530 ve 377– 665 yumurta bırakmaktadır (Breyev, 1973; Scholl ve Weintraub, 1988). Ergin *H. bovis*, *H. lineatum* ve *H. tarandi*’nin laboratuvar koşullarındaki yaşam süreleri çevre ısısına göre değişmektedir (Tablo 1).

**Tablo 1.** Laboratuvar koşullarında ısı değişikliklerinin erginlerin yaşam sürelerine etkisi (Anderson, 2006)

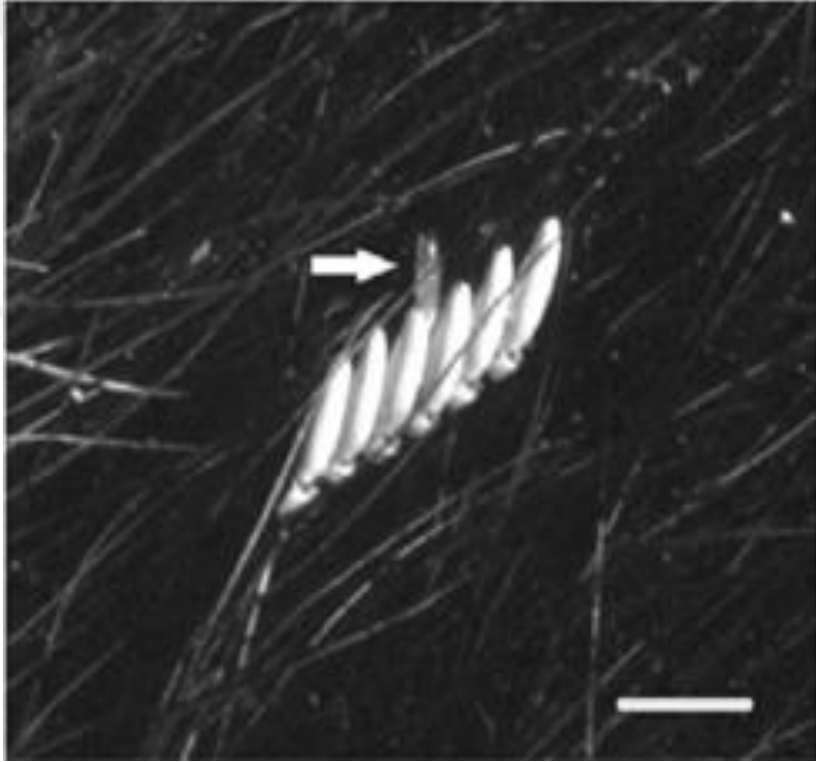
Tür	Isı (°C)	Yaşam süresi (gün)	Kaynak
<i>H. bovis</i>	20	6	Breyev (1973)
<i>H. bovis</i>	5	13	Breyev (1973)
<i>H. bovis</i> (♀)	10	5-17	Minar ve Breyev (1982)
<i>H. bovis</i> (♂)	10	8-22	Minar ve Breyev (1982)
<i>H. lineatum</i>	16	1-7	Bishopp ve ark. (1926)
<i>H. lineatum</i>	10	9-17	Bishopp ve ark. (1926)
<i>H. lineatum</i>	14	10	Breyev (1973)
<i>H. lineatum</i>	5	25	Breyev (1973)
<i>H. tarandi</i>	20	8	Breyev (1973)
<i>H. tarandi</i>	5	35	Breyev (1973)
<i>H. tarandi</i>	33	1,2-7	Nilssen (1997a)
<i>H. tarandi</i>	22	3-13	Nilssen (1997a)
<i>H. tarandi</i>	5	3-27	Nilssen (1997a)

*Hypoderma* türlerinin dişileri kuvvetli uçucu insektlerdir. Dişi *H. tarandi* 3,5 saat sürekli uçabilmekte, maksimum 600-900 km mesafe kat edebilmektedir (Anderson ve Nilssen, 1996; Anderson, 2006). *Hypoderma* türleri çiftleşmek için daha çok kayalık, nehir, dere, çay ve vadi kenarlarını tercih ederler (Anderson, 2006). Sıcak havalarda ve 9-14 saatleri arası daha aktiftirler. Konakların CO<sub>2</sub> ve octenol gibi kokularını koku reseptörleri ile algırlar. Konak silüetini görerek de yumurtlama pozisyonu alırlar. *Hypoderma bovis*, *H. lineatum* ve *H. tarandi* genellikle ayakta duran hayvanların bacak kıllarına yumurtalarını bırakırlar. *Hypoderma bovis* her kıla tek, *H. lineatum* her kıla 4-12 ve *H. tarandi* 4-10 yumurta bırakır. *Hypoderma bovis* ve *H. lineatum* yumurta bırakacağı zaman hayvanın 8-9 m etrafında uçuşur. *Hypoderma bovis* ve *H. lineatum*'un konağı bulmasında ve yumurtanın bırakılacağı yeri belirlemede tarsal sensilla rol oynar (Colwell ve Berry, 1993; Anderson, 2006). *Hypoderma* türlerinin spesifik konaklarının dışında diğer canlılara da yumurta bıraktıkları rapor edilmiştir. Bunlardan bazıları; *H. bovis* ve *H. lineatum* atlara, *H. lineatum* bizonlara, *H. lineatum* ve *H. bovis* koyun ve keçilere (Bishopp ve ark., 1926; Rastegaev, 1972; Anderson, 2006), *H. tarandi* sığır ve köpeklere (Anderson, 2006), *H. diana* koyun ve atlara (Ross, 1983; Minar, 1987; Hendrickx ve ark., 1989; Vyslouzil, 1989) ve bazı *Hypoderma* türlerinin de manda,

yak ve zebu sığırlarına (Scholl, 1993) yumurta bıraktıkları ve enfestasyona sebep oldukları gözlenmiştir.

### 2.3.2. Yumurta ve Larvaların Morfolojik ve Biyolojik Özellikleri

İnce bir zarla çevrili ve kapaksız olan yumurtalar soluk, sarı renkli ve sağlam yapılıdır (Cogley ve ark., 1981; Colwell, 2006b). Yumurtalar kuvvetli bir şekilde kıllara yapıştırılır. Spontan olarak larva ön uçta oluşan bir yarıkla, dışarı çıkar. Yumurtadan çıkan larva, konak beden ısısı uyarısı sayesinde deriye yönelir ve salgıladığı enzimlerin yardımıyla derinin içerisine girer (Şekil 2).



Şekil 2. *Hypoderma lineatum* yumurtaları (Colwell ve ark., 2006).

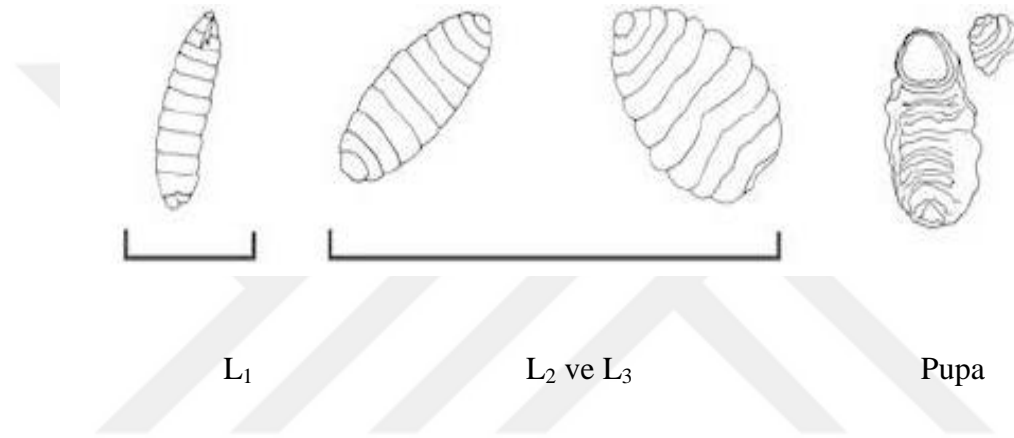
Larvaların ön uçları ince, başsız, ayaksız, arka tarafları daha geniş ve silindriktir. Segmentasyon belirgindir ve bir veya birden fazla diken sıraları ile kaplıdır. Larvaların büyüklüğü dönemlerine göre değişmektedir. Larvalarda vücut 12 parçadan oluşmaktadır. Baş bölgesinde bir çift ağız çengeli (cephaloskeleton) ve

kitinöz dudak vardır. Ağız çengeli L<sub>1</sub> de küçük ve belirgin değildir, fakat sonraki dönemlerde oldukça kuvvetlidir. Son halkada bir çift arka solunum deliği levhası ve bu solunum levhasında solunum delikleri (stigma) vardır. Solunum deliklerinin etrafını çevreleyen bu levha koyu renkli ve sert bir yapıdadır. Bu levhanın etrafı tamamen veya kısmen peritrem denilen kitinli bir halka ile örtülüdür (Colwell, 2006c).

Yumurtadan çıkan larva (L<sub>1</sub>) 1-2 mm, renkleri beyazdan krem renge kadar değişmektedir. Larvaların üzerlerinde dağınık halde fakat aynı büyüklükte küçük dikenler (spin) vardır. İkinci dönem larvalar beyaz renkte olup, L<sub>1</sub>'e benzerler ve uzunlukları 15-20 mm'dir (Şekil 3). Üçüncü dönem larva 20-30 mm uzunlukta olup, bu dönemde larvanın üzerinde birkaç büyük diken bulunur. Bu dönemde torasik segment üzerinde bulunan dikenler sığırlardaki üç farklı *Hypoderma* türünün ayrımı ile sığır ve geyiklerdeki diğer türlerin ayrımında işe yarar (Otranto ve ark., 2003a, 2004). Bu dikenlerin küt veya sivri oluşu segmentlere göre değişir. Başlangıçta L<sub>3</sub> krem renginde iken pupa dönemine geçerken rengi koyulaşır. Larvayı kuşatan kütikula larvayı çevresel, biyotik ve abiyotik şartlardan korur. Birinci dönem larvanın kütikülü sklerotize değildir ve çevre kuraklığına dayanıksızdır (Colwell, 1989; Colwell, 2006c). Larvanın üzerinde kütikulaya dağılmış halde, pek çok sensilla bulunur. *Hypoderma* spp. larvaları terminalde 15 çift nöron ihtiva eder ve L<sub>1</sub>'de peritrofik membran gelişmemiştir (Boulard, 1975; Colwell, 2011).

Larvaların (L<sub>1</sub>) bağırsak içeriğinde antikoagulan ve dermolitik bir etkiye sahip olan "hypodermatoksin" adlı toksin bulunur (Colwell, 2006a). Nelson ve Weintraub (1972)'a göre, *Hypoderma* spp. türlerinin L<sub>1</sub>'leri derialtı bağ dokuda ilerlerken, larval sekresyonlar bağdokunun erimesini sağlar, fakat ne ödem, ne de yangı şekillenir. *Hypoderma lineatum*'un kollajeni eriten enzimlerine hypodermin A, B, C ve D adı verilir. Bu enzimler, serin proteazdır ve hypodermin-C'nin molekül ağırlığı 25,2 kDa.'dur. Hypodermin-B, tripsin benzeri bir proteazdır ve moleküler ağırlığı 23,0 kDa.'dur (Boulard ve Garrone, 1978; Lecroisey ve ark., 1979; Boulard, 2006; Colwell, 2006a). Primer enfestasyonlarda larvanın çevresinde ne fibrin ne de nötrofil bulunur (Boulard, 1975). Aynı hayvan tekrar enfeste olursa ancak o zaman bağ dokuda yangı ve ödem şekillenir ve infiltrasyonda bol miktarda lenfosit ve

eozinofil bulunur ve fibroblastlar larvayı kapsül içine alır (Boulard, 2006; Colwell, 2006a). Larvalar ( $L_1$ ) salgıladıkları sindirim enzimleri sayesinde bağdokudaki bütünlüğü bozulmuş dokularla ve hücrelerle beslenirler. Ancak,  $L_2$  ve  $L_3$ 'ün bağırsaklarında hypodermatoxin bulunmaz. Bağ dokuda  $L_2$  ve  $L_3$ 'ler hareket etmezler ve bağ doku ile çevrili bir granülom içerisine alınırlar. Larvanın peritrem tarafına gelen kısmından konak derisine bir delik açılır ve granülom fibroz bir doku ile çevrelenir (Colwell, 2006a).

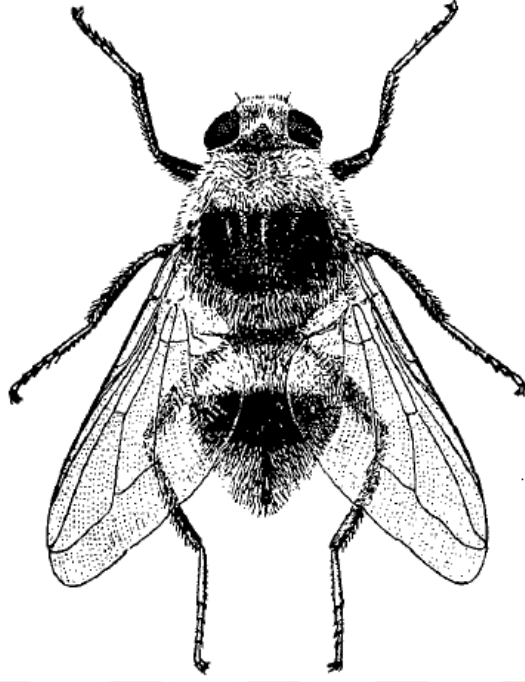


Şekil 3. *Hypoderma* spp.'nin larval dönemleri ve pupası (Colwell, 2006c)

### 2.3.3. Pupanın Morfolojik ve Biyolojik Özellikleri

Pupa safhasına geçerken  $L_3$  anatomik ve biyolojik değişikliğe uğrar, beslenme durur, toprağı kazar ve birkaç milimetre toprağın altına girer. Dış örtüsü sertleşir, gittikçe artan hareketsizlik ve nihayet puparyum denilen pupa kabuğunu oluşturur (puparasyon). Fıçı şeklinde olan pupalar hareketsizdir. Bu pupalar başlangıçta açık renkli iken, zamanla sarıdan koyu siyah kahverengine dönerler. Puparasyon sırasında daha sonra larval-pupal apoliz meydana gelir. Yani yeni pupal kütikula oluşmaya başlar ve larval kütikula atılır. Toprağı düşen  $L_3$  prepupa, kriptosefalik pupa, fanerosefalik pupa ve farat pupa gelişmelerini tamamladıktan sonra ergin hale gelir. Gelişimi tamamlayan ergin sineğin pupası kapağı açılarak dışarı çıkar. Pupal safha süreleri Tablo 2'de verilmiştir (Nilssen, 2006).





Şekil 4. *H. bovis* (♀) (Zumpt, 1965)

Tablo 2. Bazı *Hypoderma* türlerinin çevre ısısına göre optimum pupa süreleri (Nilssen, 2006)

Tür	Zaman (Saat)	Sıcaklık (°C)	Kaynak
<i>Hypoderma bovis</i>	24-48	15-20	Minar ve Breev (1982)
<i>Hypoderma bovis</i>	72	-	Gregson (1958)
<i>Hypoderma lineatum</i>	24-168	-	Chamberlain ve Scholl (1991)
<i>Hypoderma lineatum</i>	6-168	-	Pfadt (1947)
<i>Hypoderma tarandi</i>	24-168	-	Breyev ve Karazeeva (1957)
<i>Hypoderma tarandi</i>	24	-	Natvig (1916)
<i>Hypoderma tarandi</i>	264-432	8	Nilssen (1997b)
<i>Hypoderma tarandi</i>	72-144	12	Nilssen (1997b)
<i>Hypoderma tarandi</i>	< 24	20	Nilssen (1997b)

## 2.4. *Hypoderma bovis* ve *H. lineatum*'un Morfolojik Özellikleri ve Yaşam Döngüleri

Sığırlarda enfestasyona sebep olan bu iki tür, karmaşık bir biyolojik sıklusa sahiptir. Aynı zamanda endoparazitik ( $L_1$ ), ektoparazitik ( $L_2$  ve  $L_3$ ) ve serbest yaşayan (pupa ve ergin) dönemleri mevcuttur (Cencek ve Ziomko, 2002). Yumurtadan yeni çıkmış larva şekli  $L_1$  olarak isimlendirilir. Büyüklüğü 1-2 mm kadar olup yarı saydam, mat-beyaz renkli, dikenli ve silindriktir. Larva 2, birinci dönem larvaya göre daha büyük ve 15-20 mm, beyaz renkli ve daha az dikenli olup birinci dönem larvaya benzer. Hava delikleri etrafında peritrem adı verilen disk şeklinde bir oluşum vardır ve bu haliyle  $L_1$  den ayrılır (Yukarı ve Eren, 2004; Colwell, 2006c). Sırt derisi altında bulunan üçüncü dönem larvalar 20-30 mm büyüklüğünde vücutları fiçi şeklinde ve ön uçları daha geniş bir yapıdadır. Bu larvalar belirgin şekilde segmentlere ayrılmıştır. Ortadaki segmentler en büyükleridir. Bu etsi çıkıntılar *Hypoderma* spp. larvalarına özeldir. Vücudun dorsal yüzünde 2-9. halkalarda ve ventral yüzde 1-8. halkalarda iki sıra diken bulunur. Ağız çengelleri çok zayıftır. Posterior segmentleri yarım daire şeklinde olup peritrem kanalı dardır. İç kısmında düğme (buton) yer almaktadır. Peritrem yüzeyinde çok sayıda küçük solunum deliği bulunur. Önce krem rengi olan larvalar olgunlaştıkça koyulaşır ve siyah renk alır (Bishopp ve ark., 1926; Dinçer, 1997; Colwell, 2006c).

### 2.4.1. Tür: *Hypoderma bovis*

**Morfolojisi:** *Hypoderma bovis*'in ergini oldukça büyük olup, bombus arılarına benzerlerse de, arıda iki çift, *H. bovis*'te ise bir çift kanat vardır ve vücutta daha az kıl bulunur (Zumt, 1965; Anderson, 2006). *Hypoderma bovis* 11-15 cm uzunluğunda siyah- sarı renktedir (Mimioğlu, 1973; Dinçer, 1997). Baş kısa ve geniş yapıda olup yan taraflarda bir çift kısa anten ve fazla büyük olmayan bir çift petek göz bulunmaktadır. Gözler arasındaki mesafe dişide geniş, erkekte ise dardır. Göğüs kısmında bir çift kanat ve üç çift bacak bulunmaktadır. Sırtın ön tarafında bulunan kıllar beyaz-sarı renkte iken, arka tarafında bulunan kıllar ise siyah renktedir (Soulsby, 1986; Özkutlu ve Sevgili, 2005). Abdomen önünde beyaz-sarı, ortasında siyah ve arka kısmında portakal sarısı renginde tüyler bulunmaktadır (Şekil. 5)

(Soulsby, 1986). Kanatların üzerindeki damarlar kızılımsı kahverengi renktedir (Mimioğlu, 1973; Wood, 2006).

Dişilerinin arka kısmında konak kılları üzerine yumurta yapıştırmak için özelleşmiş bir organ olan, ovipozitor bulunmaktadır (Mimioğlu, 1973; Scholl, 1993).

*Hypoderma bovis*'in yumurtaları oval yapıda olup, dişiler yumurtalarını genellikle bacak kıllarına, her kıla tek tek yapıştırmak sureti ile bırakırlar. Yumurta ile kıl arasında 45 derecelik bir açı bulunmaktadır. Yumurtanın uzunluğu, ortalama 0.8 mm, genişliği ise 0.3 mm olup, tabanında özelleşmiş bir yapışma organeli bulunmaktadır (Collins, 1970; Mimioğlu, 1973; Scholl, 1993).

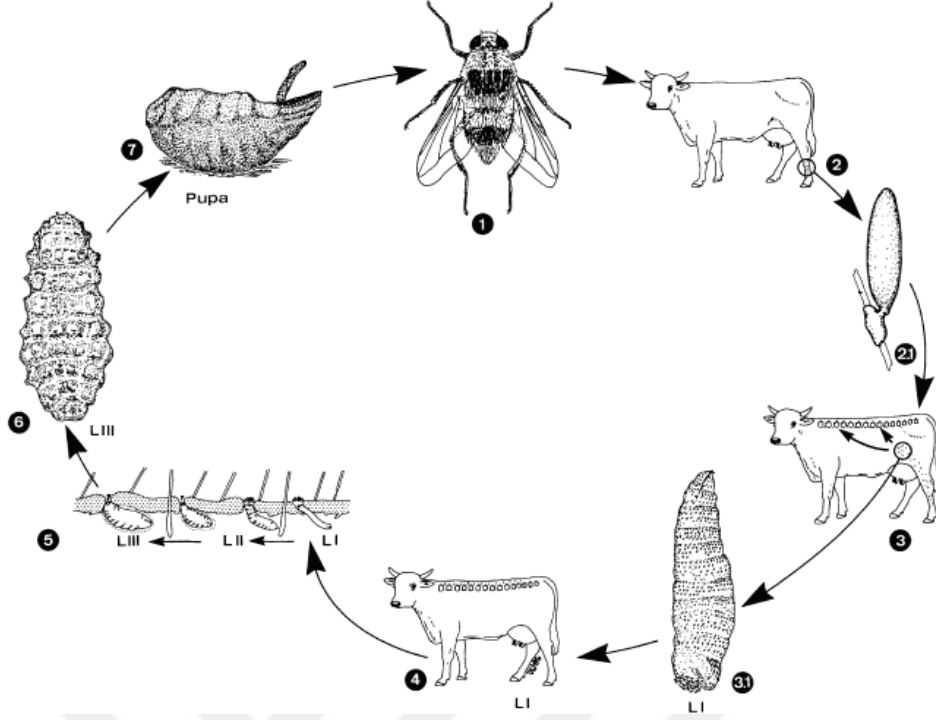


Şekil 5. *Hypoderma bovis* , ergin (McGraw ve Turiansky, 2008)

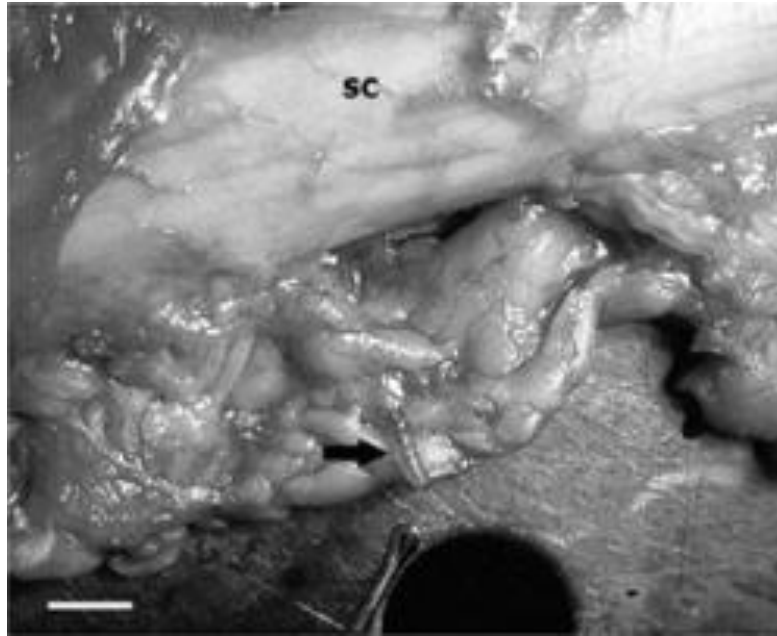
**Yaşam döngüsü:** *Hypoderma bovis*'in yaşam döngüsünün tamamı Bishopp ve ark. (1926) tarafından incelenmiştir. Yumurtalar dişiler tarafından günün sıcak ve güneşli saatlerinde, hareket halindeki sığırların arka bacak ve karın kılları üzerine uzaktan, her kıla tek, tek ve her kılın dip tarafına yumurta yapıştırılarak bırakılmakta ve sığırların huzursuzlanarak kaçışmasına neden olmaktadır. Türkiye’de *Hypoderma bovis*'in erginlerinin uçtukları dönem Mayıs-Eylül arasındadır (Mimioğlu, 1973; Dinçer, 1997; Scholl ve ark., 2009).

Yumurtalardan 4-6 günde 1 mm uzunluğunda larvalar çıkar ve kılların köküne doğru ilerler. Konak derisini, ağız çengelleri ve kör bağırsaktan salgıladıkları proteolitik enzimler vasıtasıyla delerek, deri altına girerler. Larvaların deri altına girişi yaklaşık 6 saatte tamamlanmaktadır (Lopez ve ark., 2005; Mehlorn, 2008). Daha önce enfeste olmuş yaşlı hayvanlarda penetrasyon yerinde belirgin ödem ve yangı şekillenmektedir. Açtıkları deliklerden bakteriler de girerek sekonder enfeksiyonlara neden olabilirler (Mimioğlu, 1973; Soulsby, 1986; Scholl, 1993). Yumurtadan yeni çıkmış larvaların kütikulası mumsu bir bileşikle kaplıdır. Bu yapı deri içine girene kadar geçen sürede, larvanın kurumasını önlemeye yardımcı olmaktadır. Mum yapısındaki bu hidrofobik dış tabaka, yağ sekresyonu ile kaplı olan kıl ve deriye karşı bir affiniteye sahiptir. Bunun yanında konak doku yağlarının da larvaların kurumasını önlemede, deri altına girişi kolaylaştırmada ve ileriye doğru hareketinde etkin bir rolü vardır (Colwell, 2006a).

Yumurtadan çıkan larva deriyi deldikten sonra, deri altındaki bağ dokuyu geçen larvalar salgıladıkları proteolitik enzimlerin de yardımıyla kaslar arasında fasial düzlemde, bağ doku, ya da sinir uzantıları boyunca 4-6 ay süresince göç eder (Şekil 6). Larva 1 döneminde larvaların etrafında ödem oluşur, fakat fibrin ve fibroblast oluşmaz, ancak ölen larva bir granülomatöz doku içine alınır. Bu larvaların sindirim şekli transkütikulardır ve enzimler besinlerin hemolenf içine girişine yardımcı olmaktadır (Scholl, 1993). *Hypoderma bovis* larvaları spinal kanalın torasik ve lumbal vertebra bölgesinde duramater ve periosteum arasında epidural yağ dokusuna doğru hareket ederler ve burada birikirler (Şekil 7) (Boulard, 2006). Ancak bu bölgelerin dışında az da olsa çeşitli iç organların yüzeyinde ve intramusküler bağ dokular dâhil olmak üzere vücudun farklı bölgelerinde de rastlanabilir. Vücut içinde göçe devam eden birinci dönem larvaların bazıları vertebral kanala girerler ve bir süre burada kalırlar. Bu dönem Kasım-Mart arasına rastladığından paraziter ilaçlama yapılmaz. Eğer ilaçlama yapılacak olursa bu larvalar, vertebral kanal içinde ölebilir ve rezorbe olmadıklarında hayvanın felç olmasına yol açabilirler. Birinci dönem larvalar epidural yağ dokusu bölgesinde sonbahar ve kış mevsimi süresince kaldıktan sonra sırt derisi altına gelerek yaklaşık 10-19 mm uzunluğa sahip ikinci dönem larva halini alırlar (Dinçer, 1997; Boulard, 2006; Colwell, 2006a).



Şekil 6. *H. bovis*'in yaşam döngüsü (Mehlorn, 2008)



Şekil 7. Epidural yağ dokuda birinci dönem *H. bovis* larvası, sc: medulla spinalis (Colwell ve ark., 2006)

Vertebral kanaldan çıkan larvalar ile epidural yağ dokusu bölgesinden sırt derisi altına gelen larvalar ikinci dönem larva (L<sub>2</sub>) olarak isimlendirilir. Sırt derisine gelen ve ikinci döneme giren larva, hypodermin salgılamayı durdurduğunda konak tarafından bir kapsül içerisine alınır. Sırt derisi altında bulunan ikinci dönem larvalar ödem ve yangıya neden olur. İkinci dönem larvalar besinlerini neden oldukları bu yangılardan sağlar. Bu larvalar konağın sırt derisi altında yaklaşık 3 cm çapında olan şişlikler meydana getirir. Daha sonra sırt derisi altında bulunan bu ikinci dönem larvalar, çengelleri ve proteolitik enzimleri sayesinde deriyi deler ve solunum yapmak için stigmalarını buraya dayayarak havadaki oksijenden yararlanır. İkinci dönem larvalar deri altında 15-55 gün kadar kalmaktadır. Deriye delik açıldıktan bir hafta sonra ikinci dönem larvalar, üçüncü dönem larva (L<sub>3</sub>) dönemine geçer (Mimioğlu, 1973; Dinçer, 1997; Dik, 2013).

Üçüncü dönem larvalar bağ dokuda yeşilimsi-sarı jelatinöz fibröz bir doku (butcher's jelly) tarafından oluşturulan hemorajik kese içerisinde bulunur (Shugart, 1975). İklima göre değişmekle beraber üçüncü dönem larvalar ortalama 35-45 gün kadar bu şişlikler içerisinde kalır (Bishopp ve ark., 1926) . Bu larvalar da ikinci dönem larvalarda olduğu gibi besinlerini meydana getirdikleri bu yangı ürünlerinden sağlar ve ürettikleri bakteriyostatik substanslarla sekonder enfeksiyonları baskılar. Başlangıçta beyaz renkte olan larvalar zamanla esmerleşir. Bu larvalar deride açtıkları hava deliklerinden çıktıkları sırada kahverengine dönüşür (Mimioğlu, 1973; Soulsby 1986; Scholl, 1993).

İlkbaharda genellikle sabahtan öğle saatlerine kadar üçüncü dönem larvalar toprağa düşer (Bishopp ve ark., 1926). Yere düşen larvalar ışıktan kaçarak kuytu bir yer arar. Larvalar yumuşak toprakta 3-4 cm toprağın içine girer ve sertleşerek 12 saat içerisinde pupa safhasına geçer (Collins, 1970; Scholl, 1993). Bu safhada önce renk koyulaşır, daha sonra ise bu aşamayı sertleşme takip eder. Pupariumun şekillenmesine larval kutikula kontraksiyonları, pupariumun suyunu kaybetmesi ve kutikula moleküllerinin sıkışması neden olmaktadır. Pupa olumsuz çevre koşullarına karşı son derece dayanıklı olup kış ve ilkbaharın başlangıcında don olaylarında canlı kalabilmektedir (Mimioğlu, 1973). Pupa yaşamının ilk döneminde -15°C, son döneminde ise -28 °C kadar soğuk havalarda bile canlılığını devam

ettirebilmektedir. Toprağın nemi %5'ten az olduğunda pupalardan erginlerin çıkışı %100 olmakta, toprağın nemi %20'nin üstüne çıktığında pupadan ergin çıkışı mümkün olmamaktadır (Shugart, 1975; Colwell ve ark., 2006). Çok sıcak olan ekvator bölgesinde ise pupa safhası gelişemediğinden hypodermosis görülmemektedir. Pupa safhasının uzunluğu dış çevre ısısına bağlı olarak 2-10 hafta arasında değişmektedir. Çevrenin rutubeti %56 ve çevre ısısı 22 °C olduğunda en kısa pupal dönem 22 gün 12 saat, çevre ısısı 18 °C olduğunda 33 gün 20 saat sürmektedir (Shugart, 1975). Pupa içinde gelişmesini tamamlayan *H. bovis* bu süre sonunda pupanın kapağını iterek dışarı çıkar ve uçmaya başlar. (Collins, 1970; Mimioğlu, 1973; Soulsby 1986; Scholl, 1993; Dinçer, 1997).

Pupadan çıkan ergin *H. bovis* birkaç dakika sonra çiftleşmeye başlar. Erginler yaşam süreleri boyunca besin almazlar ve pupa safhasındayken biriktirdikleri rezervlerden sağladıkları enerjiyi çiftleşme ve üreme faaliyetlerinde kullanır. Erginin yaşam süresi 3-4 gündür, ancak laboratuvar koşullarında 10-15 gün kadar canlı kalabilir. Bu sinekler çiftleşmek için dere yatakları veya kurumuş bataklıklarda toplanırlar ve erkekler kopulasyon için dişileri bekler. Çiftleşen dişi sinekler yumurta bırakır. Yumurtaları olgunlaşan dişi sinekler buldukları sığırların tüyleri üzerine yumurtalarını bırakırlar. Ergin sinekler yaşam sürelerinin kısa oluşu nedeni ile iki önemli adaptasyona sahiptir. Bunların ilki, şişlikler içersinde bulunan üçüncü dönem larvalarda oogenesisin başlamasıdır. İkincisi ise bir ovaryumda aynı anda iki oositin gelişebilmesidir. Böylece üreme kapasitesi iki katına çıkmaktadır (Scholl, 1993; Colwell ve ark., 2006). *Hypoderma bovis*'in yumurta safhasından ergin hale gelmesine kadar geçen süre yaklaşık 10-12 ay kadardır. Bu sürenin 10-11 ayı sığırlarda parazitlik yaparak geçmektedir (Mimioğlu, 1973; Scholl, 1993; Dinçer, 1997).

#### **2.4.2. Tür: *Hypoderma lineatum***

**Morfolojisi:** Sığırlarda parazitlenen ikinci önemli tür *H. lineatum*'dur. Erginleri 12-13 mm büyüklüğünde olup, esmer-sarımsı renktedir. Bu türün kısa bir başı, küçük petek gözleri vardır. Toraksın dorsalinde gri-sarı ve siyah tüyler ve uzunlamasına siyah bantlar vardır. Abdomenin ön kısmında beyaz, arka kısmında ise

sarı tüyler bulunmaktadır. Ayakların üst bölümü siyah, alt bölümü sarı renktedir. Kanatlar duman renginde ve 8-9 mm uzunluktadır (Mimioğlu, 1973; Scholl, 1993).

Dişiler 7-15 adet yumurtayı dizi şeklinde, sığırların karın ve bacak tüyleri üzerine yumurtlar. *Hypoderma lineatum*'un yumurtası oval yapıda, beyaz-sarımsak renk ve 1 mm uzunluğunda, en geniş kısmı ise 0,2 mm çapındadır (Dinçer, 1997).

Yumurtadan çıkan birinci dönem larvaların ağız çengellerinin ön kısımları sivri bir yapı gösterir. Genel olarak *H. bovis*'e benzer. Ergin sinekler biraz daha esmer ve büyüktür. *Hypoderma lineatum*'un dişileri konağı rahatsız etmezler ve sığırların dinlenmeleri esnasında yumurtalarını kıllar üzerine yaklaşık 8-15 olacak şekilde diziler halinde bırakır. İlk larvanın açtığı delikten diğer larvalar içeri girer. Larvalar kirli sarı renktedir. Biyolojisinde birinci dönem larvalar, özefagusun alt 1/3 kısmında serozanın altında birikirler ve diafram üzerinden geçerek sırt derisi altına gelirler. *Hypoderma lineatum* larvaları spinal kanala uğramaz. İkinci dönem larvalar, hayvan sırtında ilk defa sıcak bölgelerde Eylül–Ekim aylarında, serin iklimlerde ise Şubat ve Mart aylarında dikkati çeker (Scholl, 1993; Dinçer, 1997). Pupadan erginlerin çıkışı ortalama 35-40 gündür. Erkeklerin pupadan çıkışı dişilere göre daha erken olmaktadır (Shugart, 1975).

*Hypoderma lineatum* Mayıs ayı sonlarında ya da Temmuz ayı başlarında yumurtlar (Mimioğlu, 1973). *Hypoderma lineatum* yumurtlamak için günün güneşli saatlerini tercih eder. Bununla birlikte 4 °C gibi düşük sıcaklıklarda bile yumurtlayabildikleri gözlemlenmiştir (Soulsby, 1986).

#### **2.4.3. *Hypoderma bovis* ve *H. lineatum* Arasındaki Farklar**

*Hypoderma bovis* yumurtalarını aktif olarak koşan sığırların vücudunun alt bölgesindeki kıllar üzerine teker teker bırakırken, *H. lineatum* yumurtalarını dinlenme esnasındaki sığırların vücut bölgesinde tek bir kıla, sıralar halinde topluca bırakır (Scholl ve ark., 2009). *Hypoderma bovis*'in yumurtadan çıkan larvaları lumbal bölgede epidural yağlarda ve bir kısmı omurga kanalından geçerek göç ederken, *H. lineatum*'un larvaları özefagus serozası altına göç eder. *Hypoderma*



*bovis*'in erişkinleri biraz daha büyük olup, 13-15 mm kadardır. *Hypoderma lineatum*'un erişkinleri ise 11-12 mm byklgndedir. *Hypoderma bovis*'in biyolojisi yaklaşık olarak 10-30 gün daha uzun sürer (Graham, 2009). *Hypoderma bovis*'in üçüncü dönem larvaları Mayıs ayında, *Hypoderma lineatum*'un ise Mart sonunda toprağa düşmeye başlar. *Hypoderma bovis*'in üçüncü dönem larvasının stigma kanalı dar ve uzun olduğu halde *H. lineatum*'da geniş ve kısadır (Zumpt, 1965; Yukarı ve Eren, 2004).

*Hypoderma lineatum*'un üçüncü dönem larvalarının posterior stigmadaki peritrem kanalı, *H. bovis*'in peritrem kanalından daha açıktır. *Hypoderma lineatum* larvaları üzerinde bulunan dikenler *H. bovis*'e göre homojen dağılım göstermez. Bu farklılıklar dışında *H. lineatum*'un larvalarının morfolojik zellikleri *H. bovis*'in larvalarına benzemektedir (zkutlu ve Sevgili, 2005; Colwell, 2006c). *Hypoderma lineatum*, *H. bovis*'e nazaran daha erken uşmaya başlar. Her iki türün birlikte bulunduğu bölgelerde *H. lineatum*, *H. bovis*'ten birkaç hafta önce uşmaya başlar. *Hypoderma lineatum* Mayıs sonlarında ya da Temmuz başlarında yumurtladığı halde, *H. bovis* Temmuz ayının sonlarına doğru yumurtlar (Mimioğlu, 1973).

## **2.5. *Hypoderma bovis* ve *H. lineatum*'un Konakları**

*Hypoderma bovis* ve *H. lineatum*'un ilk konakları Avrupa ve Asya'nın sıcak bölgelerinde bulunan nesli tükenmiş sığırlardır. Kuzey Amerika'ya ise bu türler Avrupa'dan getirilen eti ve stc sığırlarla bulaştırılmıştır. *Hypoderma bovis* ve *H. lineatumun*'un enfeste ettiği bilinen diğer konaklar ise yak, at, koyun, keçi ve insanlardır. Ancak bunlar rastlantısal konaklardır ve bu konaklarda *Hypoderma* larvaları gelişimini tamamlayamaz (Li ve ark., 2004; Colwell ve Otranto, 2006). Deneysel olarak laboratuvar fareleri ve tavşanlar bu türler ile enfeste edilmiş, ancak enfestasyonun sadece bağışıklığın baskılandığı ilk dönemlerde larvaların yaşayabildiği görülmüştür (Scholl, 1993).

## 2.6. Hypodermosisin Epidemiyolojisi

### 2.6.1. Hypodermosisin Dünyadaki Yayılışı

Hypodermosisin yayılışı üzerindeki en önemli etkenlerden birini iklim koşulları oluşturmaktadır. Kuzey Avrupa’da mevsim sıcaklığının düştüğü ve nem oranının yüksek olduğu yıllarda hastalığın insidensi azalmaktadır. Çünkü soğuk ve yağmurlu havalarda pupa öncesi ve pupa safhası süreleri çok uzamakla birlikte ovulasyon da güçleşmektedir. Hypodermosisin yayılışı ve bu hastalığa neden olan türlerin enfestasyon oranı, iklim ve coğrafi konumu birbirinden farklı ülke ve bölgelerde farklılık gösterir. Son yıllarda hypodermosisin kontrolü için gösterilen çabalara rağmen (ilaçlama, steril sinek üretimi ve aşılama denemeleri) hastalık hâlâ Amerika, Kanada, Afrika, Avrupa ve Asya’da yaygın olarak görülmektedir (Behakhla ve ark., 1998, 1999; Giangaspero ve ark., 2003; Otranto ve ark., 2005a). *Hypoderma bovis* ve *H. lineatum* Kuzey yarımkürede, 25-60° enlemler arasında, Asya, Afrika, Avrupa ve Kuzey Amerika’daki bütün ülkelerde bulunmaktadır. Güney sınırları ise Hindistan, Türkiye, Libya, Kuzey Meksika ve Havaii’ye kadar uzanmaktadır. (Scholl, 1993; Özkutlu ve Sevgili, 2005).

Avrupa’da hypodermosisin yaygınlığı bazı bölgelerde %80’e kadar çıkmaktadır (Colwell, 2000; Colebrook ve Hall, 2004). İspanya’da kızıl geyiklerde yapılan çalışmada %92 oranında hypodermosis tespit edilmiştir (Perez ve ark., 1995). Çin’de ise yak sığırlarında bu oranın %80-90 arasında değiştiği bildirilmiştir (Yin ve ark., 2003). Ülkelerde hypodermosisin yayılışı ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Çin’de yapılan bir çalışmada, Çin’in farklı bölgelerinde sırası ile *Hypoderma* spp. Xinjiang’da %51, İç Moğolistan’da %27, Heilongjian’da %13, Jiling’de %6 ve Gansu’da %44 olarak belirlenmiştir (Guan ve ark., 2005). Yine İtalya’da yapılan bir başka çalışmada %43,3 oranında seropozitiflik belirlenmiştir (Regalbono ve ark., 2003).

**Tablo 3.** Bazı *Hypoderma* türlerinin konakları ve yayılış alanları (Colwell ve ark., 2006).

<b>Tür</b>	<b>Konak</b>	<b>Coğrafi bölge</b>
<i>H. actaeon</i>	Kızıl geyik	Paleartik
<i>H. bovis</i>	Sığır	Holartik
<i>H. diana</i>	Kızıl geyik, Karaca, Koyun	Paleartik
<i>H. lineatum</i>	Sığır	Holartik
<i>H. sinense (sinensis)</i>	Tibet sığırı	Paleartik
<i>H. tarandi</i>	Ren geyiği	Holartik

### 2.6.2. Hypodermosisin Türkiye'deki Yayılışı

Türkiye'de bugüne kadar yapılan çalışmalarda hypodermosisin sığırlarda yaygın olduğu ve yaygınlık oranının Kasım-Şubat aylarında %5-68 arasında değiştiği belirtilmiştir (Mimioğlu, 1966; Zeybek, 1988; Sayın ve ark., 2000; Kara ve ark., 2005; Şimşek ve ark., 2005). Sayın ve ark. (2000), Türkiye'nin bütün coğrafi bölgelerinde mezbahalardan toplanan larvaların %86'sı *H. bovis*, %14'nü *H. lineatum*'un oluşturduğunu, bu iki türün yayılışını, sırasıyla Karadeniz bölgesinde %91, %9; Marmara'da %81, %19; Ege'de %68, %32; Akdeniz'de %83, %17; İç Anadolu'da %93, %7; Doğu Anadolu'da %97, %3 ve Güneydoğu Anadolu'da %80, %20 olarak bildirmişlerdir. Aynı çalışmada merada canlı sığırlar üzerinde yapılan çalışmada Hypoderma enfestasyonunun Karadeniz Bölgesi'nde %28,3; Marmara Bölgesi'nde %28,0; Ege Bölgesi'nde %41,6; Akdeniz Bölgesi'nde %33,0; İç Anadolu Bölgesi'nde %38,9; Doğu Anadolu Bölgesi'nde %41,9 ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde %47,8 olduğu görülmüştür. Celep ve Gürsoy (1987) 'un yapmış olduğu çalışmada sığırların Samsun yöresinde %55, Amasya yöresinde %57,8 oranında *Hypoderma* larvaları ile klinik olarak enfeste olduklarını belirtmişlerdir. Diğer bir çalışmada Samsun yöresinde sığır hypodermosisi %20.0 oranında kaydedilmiştir (Celep ve ark., 1994). Diğer çalışmalarda sığır hypodermosisi Niğde'de %5,1 (Karatepe ve Karatepe, 2008), Kars'ta %31,9 (Kara ve ark., 2005), Van'da %35,8-65 (Taşçı ve ark., 1994; Özdal ve Değer, 2005) oranlarında bulunmuştur. Serolojik olarak sığır hypodermosisini Özkutlu ve Sevgili

(2005) Şanlıurfa yöresinde %38,6; Şimşek ve ark. (2008), Elazığ'da %26,3; Malatya'da %22,3; Diyarbakır'da %22,1 oranlarında tespit etmişlerdir.

## 2.7. Hypodermosisin Klinik Belirtileri

Hypodermosis, mevsimsel olarak sonbahar, kış ve ilkbaharda enfeste hayvanların sırt ve lumbal bölgelerinde görülen deri altı şişlikleri ile karakterize olan paraziter bir hastalıktır (Soulsby, 1986). *Hypoderma* spp. sinekleri yumurtalarını konaklarının sırtına bırakmak için yaklaştıklarında hayvanları rahatsız ederler ve bu yüzden hayvanlar kaçırlar ve bu kaçışma esnasında yaralanmalara, düşmelere, hatta spontan abortlara bile rastlanabilir (Colwell ve ark., 2006). Ülkemizde hastalık halk arasında “nokra”, “okra”, “büvelek” ve “imiç” adları ile anılmaktadır (Mimioğlu, 1973; Taşçı ve ark., 1994; Karatepe ve ark., 2005; Özkutlu ve Sevgili, 2005).

Hypoderma enfestasyonunda, enfeste hayvanda *Hypoderma* larvalarının sırt derisi altına gelene kadar geçen sürede açık bir belirti görülmemektedir. Bununla birlikte sığırlarda hypodermosiste larvalar göç ederken mekanik, toksik ve yangısal etkilere sebep olurlar (Dinçer, 1997; Sayın ve ark., 2000; Kara ve ark., 2005).

**a) Mekanik etkileri:** Larvalar göç ederken deri altı dokusunda muhtelif yerlerde kanallar açarlar. Özellikle omirilikte buldukları zamanlar omurilik üzerinde bir takım lezyonlar yapabilirler. Bu lezyonlardan dolayı irritasyon neticesi hayvanlar huzursuz olur ve verimleri azalır. Larva 3'lerin sırt derisinde açtıkları delikler rejenerasyonla kapanmadığından derinin sanayide değerinin düşmesine ve neticede büyük çapta ekonomik kayba neden olmaktadır (Mimioğlu, 1973; Soulsby, 1986; Dincer, 1997).

**b) Toksik etkileri:** Larvalar dokularda ölmeleri halinde çıkardıkları hypermatotoksinlerle hayvanlarda zehirli etki yapmaktadır. Bu toksikasyon sonucu çeşitli organlarda fizyolojik fonksiyonlar aksar, toksik şok oluşur ve hayvanların normal metabolizmaları bozulur, toksinlere bağlı olarak abort meydana gelebilir (Brown, 1977; Boulard ve Tohrnberry, 1984; Yukarı ve Eren, 2004) .

c) **Yangısal etkileri:** Larvaların açtıkları deliklerden giren mikroorganizmaların etkisi ile zamanla irinli apseler oluşabilir. Sırt derisi altında ödemli şişlikler ve deri altında gaz meydana gelir. Bu ödemli şişlikler açılır ve tüyler birbirine yapışır (Yukarı ve Eren, 2004; Colwell ve ark., 2006). Hayvanlar zayıflar, et ve süt verimleri düşer. Hypodermosis, sığırlarda süt ve et verimi düşüklüğü yanında deride oluşturduğu hasarlardan dolayı önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Ancak et ve süt verim kaybı klinik olarak gözlemlenemez. Ayrıca *Hypoderma* spp. larvaları, vücuttaki göçleri esnasında zaman zaman spinal kanalda ölebilmekte, bunun sonucunda salgıladıkları toksinlerle anafaktik ve toksik şoktan ölümlere neden olabilmektedir (Webster ve ark., 1997; San Miguel ve ark., 2001; Colwell ve ark., 2006; Rambozzi ve ark., 2006). *Hypoderma lineatum*'un birinci dönem larvaları özefagusta yangıya neden olur ve yutma zorluğu ve timpani gibi belirtilerin görülmesine yol açabilir. *Hypoderma bovis*'in birinci dönem larvaları ise, omurga kanalında bağ doku nekrozu, osteomyelitis ve periostitis gibi lezyonlara yol açabilir (Colwell ve ark., 2006; Dik, 2013).

## 2.8. Hypodermosisin Patogenezi ve Ekonomik Önemi

*Hypoderma* spp. türleri Türkiye'de paraziter hastalıklar içinde ekonomik kayıplara neden olan en önemli enfeksiyonlardan birini oluşturmaktadır (Kalkan, 1963; Kara ve ark., 2005). Dişilerin ağız yapıları rudimenter olduğu için emmeye ve sokmaya elverişli olmadığı halde, vızılıtları ile sığırları rahatsız etmekte ve onların rahat otlamalarına izin vermemektedir. Sığırlar rahat otlayamadıklarından ve stresten dolayı kilo kaybederler (Özkutlu ve Sevgili, 2005; Boulard ve ark., 2008; Şimşek ve ark., 2008).

Birinci dönem larvaların deriyi deldikleri yerlerden vücuda giren mikroorganizmalar yangı ve kaşıntıya sebep olur. *Hypoderma lineatum* larvaları ise özefagusa giderek seroza ve kas tabakası altına yerleşir ve bu bölgelerde ödem, yangı, kanama ve sulu kıvamda akıntıya sebep olur (Lopez ve ark., 2005; Dik, 2013).

Histopatolojik doku örneklerinde, lezyonların yoğun olduğu bölgelerde *Hypoderma* spp. larvalarının varlığı ile eozinofiller, makrofajlar, lenfositler,

hemoraji, ödem, özefagus yangısı ve spinal kanal nekrozu görülmektedir (Colwell ve ark., 2006).

*Hypoderma bovis* larvaları vertebral kanal içerisinde öldükleri takdirde felç görülebilmekte, larvaların salgıladıkları toksinler nedeniyle anaflaktik şok meydana gelebilmektedir (Sayın ve ark., 2000; Tyzard, 2009). Larvaların tükrük bezlerinden ya da orta bağırsak bezlerinden salgıladıkları toksinler arka bacaklarda felce sebep olabilir. Ayrıca larvaların beyin ve spinal kanala girmeleri sonucu sığırlarda yürüyüş bozuklukları ve yüz felci gibi sinirsel belirtiler görülebilir (Beesley, 1971; Boulard, 2006). Hypodermosis et ve süt verimini azaltarak hayvanların gelişmesini de yavaşlatmaktadır. Süt verimindeki kayıplar oldukça yüksek olmakla birlikte bu durum ülkeden ülkeye değişmektedir. Et verimindeki azalma ise hayvanlarda bulunan larva sayısı ile doğru orantılı olarak değişmektedir. *Hypoderma* spp. enfestasyonunun meydana getirdiği zararlardan bir diğeri ise karkas kalitesini düşürmesidir. Larvaların enfeste hayvanların organizmasında izledikleri yol boyunca etin rengi değişmekte ve et jelatinöz bir yapı almaktadır. (Mimioğlu, 1973; Colebrook ve Hall, 2004; Şimşek ve ark., 2008; Dik, 2013). Bunun yanında derinin en değerli kısmı olan sırt bölgesinin geriye dönüşümsüz tahribatı neticesinde önemli ekonomik kayıplar şekillenmektedir (Dinçer, 1997; Yukarı ve Eren, 2004; Şimşek ve ark. 2008). Amerika Birleşik Devletleri'nde Tarım Bakanlığı'nın verilerine göre, 1965 yılında sığır hypodermosisinde 192 milyon dolar kayıp yaşandığı bildirilmiştir (Collins, 1970). Yine İngiltere'de 1978 yılında hypodermosisine bağlı 13 milyon paund kayıp olduğu belirtilmiştir (Soulsby, 1986). Pakistan'da yapılan bir çalışmada ise yıllık 22,8 milyon dolar ekonomik kayıp kaydedilmiştir (Khan ve ark., 2006). Çiçek ve ark. (2011), Afyonkarahisar'da yaptıkları çalışmada ekonomik olarak yıllık deri kaybının 18.288 TL olduğunu belirtmişlerdir.

## **2.9. Teşhis**

### **2.9.1. Klinik Muayene**

*Hypoderma* spp. larvalarının varlığı, ilkbahar ve yaz aylarında enfeste hayvanların sırtında ikinci ve üçüncü dönem larvaların palpasyonu ya da karkasın

iç kısmında ve derialtı dokularının muayenesiyle tespit edilebilir (Zumpt, 1965; Baron ve Colwell, 1991; Haine ve ark., 2004). Klinik olarak hayvan muayene edildiğinde, hayvanın sırt derisi altında bulunan ikinci ve üçüncü dönem larvalar, tüm sırt derisi boyunca 2-3 adetten, 100-300 adete kadar 2-3 cm çapında yarım küre halinde ve orta kısımlarında bir delik bulunan şişkinlikler halinde görülmektedir. Bu şişlikler bölgelere göre değişmekle birlikte Şubat ile Haziran arasında görülmektedir (Scholl, 1993).

### **2.9.2. Postmortem Muayene**

*Hypoderma* spp. larvalarını tespit etmek için spinal kanal ve özefagusun tamamının iyice muayene edilmesi gereklidir. Hemoraji ve yangıyla birlikte submukozal özefagusun ödemli görüntüsü larvaların etrafında oluşmaktadır. Spinal kanalda ve epidural yağ dokuda lezyonlar ise hematoma, hemoraji, ödem ve larvaların burada yaptığı basınç sonucu oluşan nekroze alanlar olarak göze çarpmaktadır. Bu dokularda bulunan 1-3 mm uzunluktaki gri ve şeffaf olan L<sub>1</sub>'ler özefagus duvarı, periözefagal doku, ya da spinal kanal bölgelerinin muayenesi sonucu görülebilirler (Colwell ve ark., 2006).

### **2.9.3. *Hypoderma bovis* ve *H. lineatum* Larvalarının Morfolojik Teşhisi**

Canlı ve kesilen hayvanlarda deri altında bulunan üçüncü dönem larvaların stereomikroskop altında morfolojik identifikasyonu, diğer larval dönemlere göre daha kolay yapılabilmektedir. Üçüncü dönem larvaların morfolojik olarak ayrımı zor olmamakla birlikte türler arasındaki ekolojik, biyolojik ve morfolojik benzerlikten dolayı bazen identifikasyonda zorlukla karşılaşılabilir. Sığırlarda bulunan iki türün arasındaki ayırıcı özellikler elektronmikroskop ile gözlemlenebilir. Üçüncü dönem larvaların identifikasyonu solunum deliği levhalarının morfolojisi, 10. abdominal segment üzerindeki diken modelleri, sefalik ve torasik segmentler üzerindeki dikenlerin morfolojisi ve şetotaksisine (seta dizilimi) göre yapılmaktadır (Zumpt, 1965; Collwel ve ark., 2006).

*Hypoderma bovis*'in baş segmenti üzerinde ağız açıklığı ve operküler çizgi arasında bir diken bantı bulunmaktadır. Bu diken bantı *H. lineatum* larvalarının bazılarında var iken, bazılarında bulunmamaktadır. Posterior solunum deliği peritremler türler arasında farklılık göstermektedir. Yarım daire şeklindeki bu çıkıntı şeklindeki yapı genel olarak *H. lineatum* larvalarında düz bir yapıda, *H. bovis* larvalarında bu yapılar ise daha derin bir görünüm sergilemektedir. *Hypoderma bovis* peritreminde kitinli bir halka butonun etrafını tamamiyle çevrelerken, *H. lineatum* larvalarını kısmen sarmaktadır. Bunun yanı sıra *H. lineatum* larvalarındaki peritrem kanalı *H. bovis* larvalarındaki peritrem kanalından daha açıktır (Otranto ve ark., 2003a). Larvalarda 10. abdominal segmentin dorsal yüzeyindeki diken sıraları türler arasında farklılık göstermektedir. *Hypoderma bovis* larvalarında bu bölge dikenlerden yoksunken, *H. lineatum* larvalarında bir sıra diken bulunmaktadır (Otranto ve ark. 2003a; Colwell, 2006c).

#### **2.9.4. *Hypoderma bovis* ve *H. lineatum*'un Serolojik Teşhis**

Myiasiste serolojik yöntemler klinik ve postmortem parazitolojik muayeneye alternatif olarak geliştirilen yöntemlerdir (Otranto ve ark., 2001).

*Hypoderma* spp. larvalarının varlığı, ilkbahar ve yaz aylarında enfeste hayvanların sırtında ikinci ve üçüncü dönem larvaların palpasyonu, ya da karkasın iç organları ve derialtı dokularının muayenesiyle tespit edilmektedir. Bu yüzden bu dönemlerde enfestasyon oranının doğru olarak belirlenebilmesi için birçok defa inspeksiyonla klinik parazitolojik muayenenin yapılması gereklidir. Bu muayene yalnız bir kez değil, bir kaç kez tekrarlanmalıdır. Aynı zamanda klinik muayenenin larvaların ancak son safhaya geldiğinde yapılabilmesi durumu, bu hastalığın tedavisine fırsat vermemektedir (Rambozzi ve ark., 2006).

Serolojik tanı amacıyla yaygın olarak birçok ülkede Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) tekniği kullanılırken son yıllarda Western blot testi de kullanım alanı bulmuştur. Anti-hypoderma antikorları, enfeste sığırlarda üçüncü dönem larvaların toprağa düşmesinden sonra bile yaklaşık 3-4 ay kadar kanda bulunmakta ve antikor seviyesi Kasım-Mart döneminde en üst seviyeye çıkmaktadır.



Bu nedenle serolojik çalışmalar için en uygun zamanın, bu dönemler olduğu bildirilmiştir (Boulard, 2002). ELISA testi büyük çaptaki immuno-epidemiyojik incelemeler için toplu süt veya serum örnekleri üzerinde uygulanmaktadır (Boulard, 1985; Boulard ve Villejoubert, 1991). ELISA testi basit olması, hızlı bir şekilde uygulanabilmesi ve fiyatının da uygun olması gibi birçok avantaja sahiptir. Ayrıca ELISA tekniği hypodermosisin teşhisinde hassas bir gösterge olduğundan, her bölgede hastalığın durumunun değerlendirilmesinde, enfestasyonların kontrol edilmesine ve ithal edilen sığırlar için hypodermosisten ari bölgelerin muhafaza edilmesine olanak vermektedir (Webster ve ark., 1997; Otranto ve ark. 2001; Panedero-Fontan ve ark., 2002; Regalbono ve ark., 2003; Asbakk ve ark., 2005).

Ayrıca hypodermosisin teşhisinde, protein yapısındaki antijenlerin analizi için elektroforetik yöntemlerin değişik modifikasyonları uygulanmaktadır. Bunların içerisinde Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi proteinlerin tanımlanmasında, karşılaştırılmasında ve sayısal olarak elde edilmesinde kullanılan, pahalı olmayan, hızlı ve tekrarlanabilir bir yöntem olması nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. SDS-PAGE, zellikli tanı yöntemlerinin başında gelen Western blot'un ilk aşaması olması bakımından da önem arz etmektedir (Altıntaş ve Yolasığmaz, 1997; Webster ve ark., 1997; Casais ve ark., 1998; Boldbaatar ve ark., 2001; şimşek ve ark., 2008).

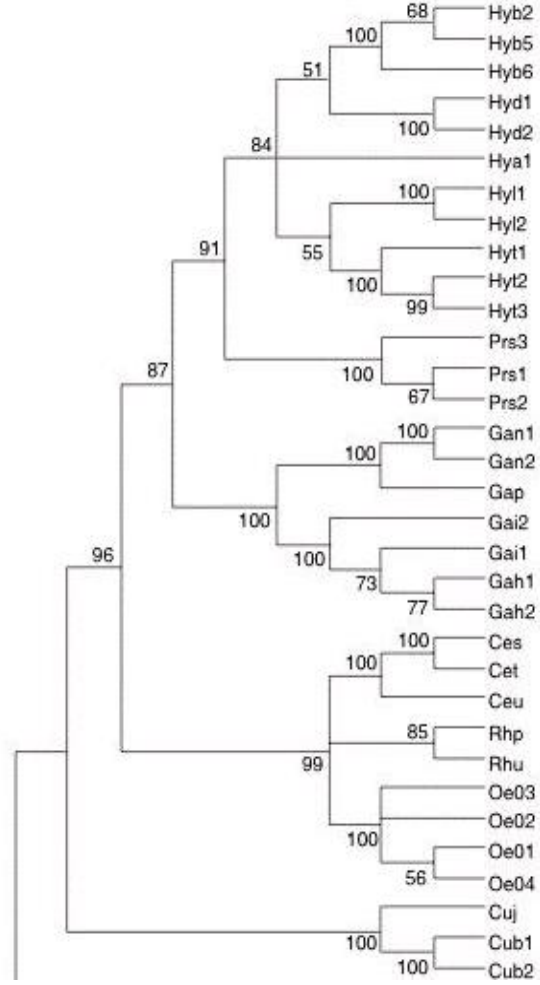
#### **2.9.5. *Hypoderma bovis* ve *H. lineatum*'un Larvalarının Moleküler Teşhisi**

Son yıllarda veteriner entomolojide moleküler filogenetik çalışmalar artmış ve bu durum taksonomiye yeni bir bakış açısı getirmiştir. Bugüne kadar *Oestridae* ailesine ait COI, COII, tRNA-Leu, tRNA-Ile, 12S (mtDNA), 16S rRNA, 28S rRNA ve 18S rRNA (rDNA), glob-1 (*Gasterophilus intestinalis* haemoglobin), hypodermin A, B ve C (*Hypoderma* spp. serin proteazları) olmak üzere 12 gen üzerinde çalışılmıştır (Otranto ve ark., 2003c; Otranto ve Stevens, 2006).

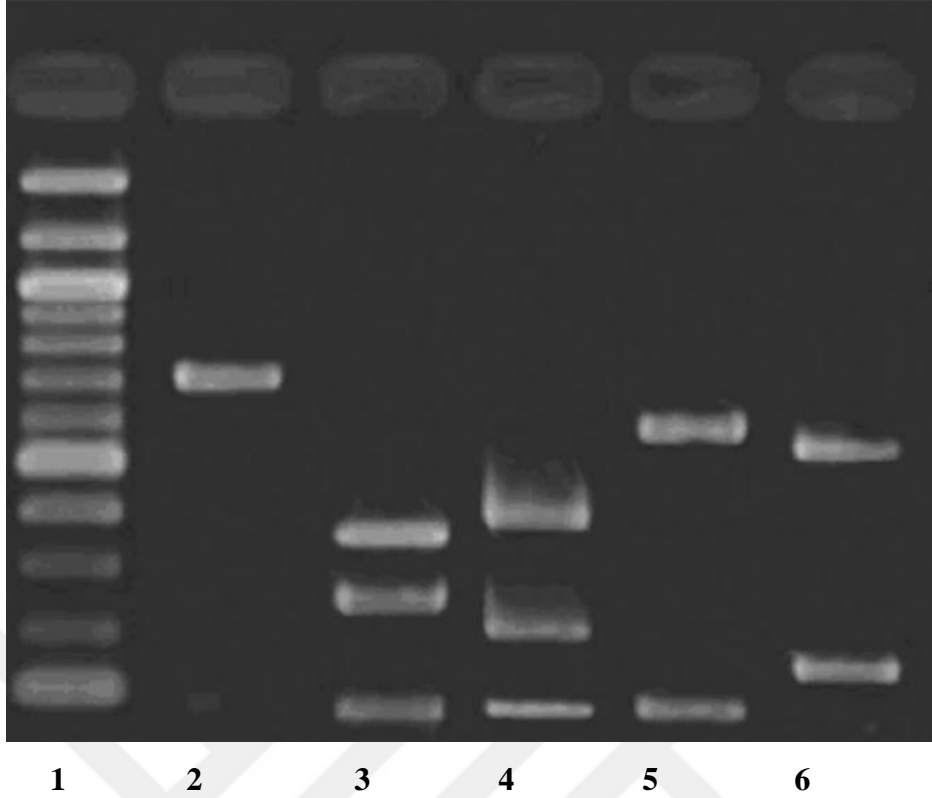
Türlerin bugüne kadar kayıtlı olan erişim numaraları; *Hypoderma bovis*, AF497761; *Hypoderma lineatum*, AF497762; *Hypoderma diana*, AF497763;

*Hypoderma tarandi* AF497764 ve *Hypoderma actaeon*, AF497765 olarak Genbankta verilmiştir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Moleküler identifikasyon için hedef gen olarak mitokondrial DNA'nın sitokrom oksidaz I (COI) geni kullanılmaktadır. *Hypoderma bovis* ve *H. lineatum* larvalarının Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ile incelenen sitokrom oksidaz I geninde iki tür arasındaki varyasyon oranı %8,5 olarak görülmektedir. *Hypoderma bovis*'in larvaları arasında 6 nükleotidin yer değiştirmesi ile %0,87, *H. lineatum* larvalarında 2 nükleotidin yer değiştirmesi ile %0,29 oranında bir varyasyon olduğu ortaya çıkarılmıştır (Otranto ve ark., 2003a). Nükleotit sekanslarına göre Oestridae ailesinin soy ağacı aşağıda Şekil. 8'de verilmiştir



**Şekil 8.** Oestridea'larda nukleotit sekanslarına göre filogenik yapı *H. bovis* (Hyb), *H. lineatum* (Hyl), *H. diana* (Hyd), *H. tarandi* (Hyt), *H. actaeon* (Hya), *P. silenus* (Prs), *O. ovis* (Oeo), *Cephenemyia stimulator* (Ces), *C. trompe* (Cet), *C. ulrichii* (Ceu), *Rhinoestrus phacochoeri* (Rhp), *R. uzbekistanicus* (Rhu), *Gasterophilus pecorum* (Gap), *G.s haemorrhoidalis* (Gah), *G.s intestinalis* (Gai), *G. nasalis* (Gan), *Cuterebra baeri* (Cub), *C. jellisoni* (Cuj), *Musca domestica* (outgroup) (Mud). (Otranto ve Stevens., 2006)



**Şekil 9.** *Hypoderma* spp. türlerinde BfaI restriksiyon enzimi ile E4'den karboksilik ucuna (COOH) kadar uzanan bölgeyi kodlayan çok değişkenli bölge mitokondrial COI geninin PCR-RFLP ile analizi 2- *H. bovis*, 3-*H. lineatum*, 4-*H. actaeon*, 5-*H. diana*, 6-*H. tarandi* (Otranto ve Stevens, 2006)

## 2.10. İmmünite

*Hypoderma* türlerinin vücuttaki göçü esnasında konak, yangısal reaksiyon dâhil, hem humoral hem de selüler bağışıklık mekanizmalarından etkilenmektedir (Boulard, 2006).

### 2.10.1. Humoral Bağışıklık

Doğal *Hypoderma* enfestasyonlarına karşı humoral yanıtta ilk çalışmalar, L<sub>2</sub> ve L<sub>3</sub> den elde edilen antijenlerle flokülasyon ve agar jel immüno presipitasyon gibi testlerle antikor tespiti esasına göre yapılmıştır (Nelson ve Knapp, 1961; Boulard, 2006). *Hypoderma tarandi*'nin farklı dönemdeki larval antijenik ekstratların kobaylarda kullanılmasıyla, farklı dönemlerden elde edilen antijenlerin benzerlik göstermediği anlaşılmıştır (Colwell ve ark., 2006). Doğal ve deneysel

enfestasyonlarda sığırlarda ve insanlarda L<sub>1</sub>'in kollagenaz (Hypodermin-C) enzimine karşı humoral immün yanıt şekillendiği gözlenmiştir (Boulard ve Weintraub, 1973; Boulard, 2006). Sığır hypodermosisinde 4-5. aya kadar başlangıçta yüksek oranda antikor cevabı görülmediği, humoral yanıtın enfestasyondan sonraki 7-10. aylar arasında arttığı ve en yüksek seviyeye çıktığı, 20 larva ile enfeste edilen bir hayvanda anti-hypoderma antikorları en erken 1,5 ay sonra tespit edilebildiği, L<sub>3</sub> sırt derisinden düştükten 3-4 ay sonra da antikorlar tespit edilemeyecek seviyeye indiği ve bu hayvanlar tarama testlerinde seronegatif çıktığı bildirilmektedir. Ayrıca anti-hypoderma maternal antikorlarının süresi danalarda 6 ay kadar olduğu saptanmıştır (Pruett ve ark., 1989; Martinez-Gomez ve ark., 1991; Moire, 1998). Bir saha çalışmasında (Panadero ve ark., 2013), humoral immün yanıtta ilk kez larvalarla karşılaşan hayvanlarla, reenfeste sığırlarda benzer bir IgG artışı söz konusu olmaktadır. Her iki grupta da larvaların sırt derisi altına geldikleri dönemde IgG seviyelerinde önemli artış söz konusudur. Immunoglobulin G1 (IgG1) izotipi her iki grupta benzerlik gösterirken, IgG2 düzensiz seyretmektedir ve bir yıl gözlenen hayvanlarda IgG1 seviyesi Kasım-Ocak arası yükselmeye başladığı, 12 ay sonra birden düştüğü, IgM seviyesi ise düşük, fakat düzeyi süreklilik arzettiği bildirilmiştir.

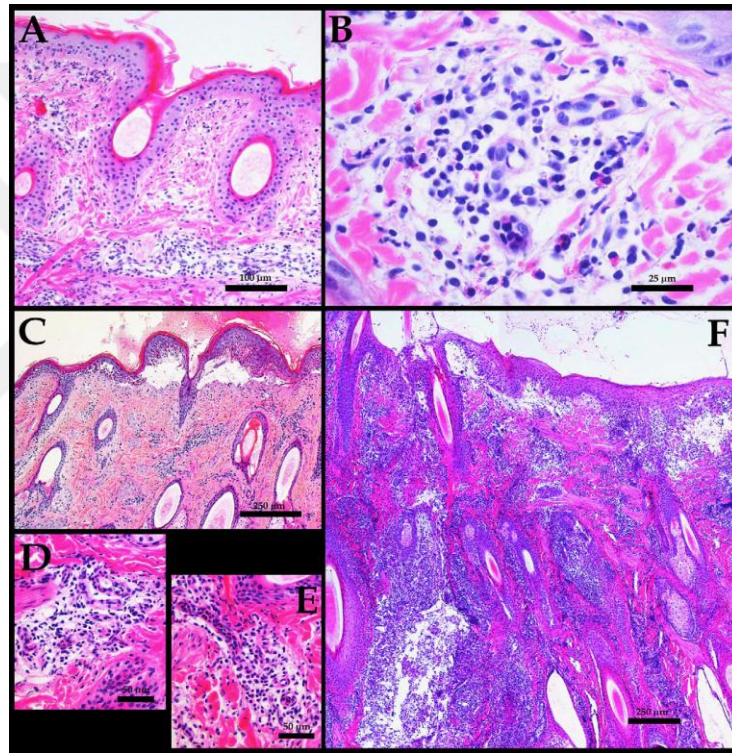
Humoral immün yanıtta anahtar rolü bilinen interleukin 4'ün (IL4), enfestasyondan 6 saat sonra istatistiksel olarak arttığı gözlenmiştir (Dacal ve ark., 2009). Aynı şekilde makrofaj yanıtın baskılanmasında rol oynayan IL10'un enfestasyondan sonra 6-12 saat içerisinde arttığı ve granümatöz reaksiyonları durdurduğu, L<sub>1</sub>'in sağ kalmasını ve dokular arasında göçünü tamamlamasına yardım ettiği gözlenmiştir (Gingrich 1982; Baron ve Weintraub, 1986; Mossman, 1994; Pruet ve Kunz, 1996). *Hypoderma lineatum*, *H. bovis*, *H. tarandi*, *H. diana* ve *Prezewalskiana silenus* ile çapraz reaksiyonlar oluşturmaktadır (Monfray ve Boulard, 1990; Boulard ve ark., 1996). *Hypoderma* spp. enfestasyonlarında Hypodermin A'nın güçlü etkisiyle klasik ve alternatif yoldan kompleman sisteminin (C3a) yıkımlandığı ve sitolitik aktivitesinin düştüğü, buna karşılık Hypodermin B klasik yolla kompleman sistemi ile etkileşim gösterdiği, Hypodermin C'nin ise direk etkisinin bulunmadığı gözlenmiştir (Boulard ve Bencharif, 1984). Hypodermosisin başlangıç safhasında yangının başlamasında ve spesifik immün cevabın oluşmasında kompleman 3 (C3)'ün merkezi bir görevi olduğu düşünülmektedir.

Hipoderminlerden HA ve HB'nin sığır C3'ü üzerine yıkılmayıcı etkisi vardır (Boulard, 2006). Konakta C3'ün degrede olması immun stimülasyonu ve yangısal cevabı azaltır. *Hypoderma lineatum* enfestasyonunda L<sub>1</sub>, C3'ün fizyolojik ve kemotaktik faktörleri C3a ve C5a'nın salgılanmasını etkileyerek savunma sistemini başlangıçta aktif olarak engelleyebileceği bildirilmektedir. Sığırlarda nötrofillerin aktivasyonunda etkili olan kompleman proteinlerinin kemotaktik aktivitesinin, HA'nın düşük konsantrasyonlarında bile tamamen durduğu, eş zamanlı olarak da nötrofil adhesion reseptörü CD<sub>18</sub>'in ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir (Barquet ve ark., 1993; Moire ve ark., 1997; Boulard, 2006).

### 2.10.2. Hücresel Bağışıklık

Pek çok çalışmada *Hypoderma* spp. larvalarının, larval göç sonunda öldüğü, ölümlerin antikorlara bağlı immün yanıt sonucu şekillenmediği, fakat hücresel immün yanıtta kaynaklandığı anlaşılmıştır (Pruett ve ark., 1989, Pruet, 1999). *Hypoderma* spp. larvaları ile ilk kez karşılaşan hayvanlarda, özellikle ilk 7 aylık dönemde spesifik antijenlere ve mitojenlere karşı periferik lenfositlerin uyarılmadığı ve çoğalmadığı, buna karşılık enfestasyonun tekrarı durumunda 2 ay sonra güçlü bir periferik lenfosit proliferasyonu ve antijene ve mitojene karşı spesifik reaksiyon meydana geldiği, fakat L<sub>1</sub> ekstraktı ile immünize edilmiş hayvanlarda da bu proliferasyonun bir ay içerisinde şekillendiği gözlenmiştir (Baron ve Weintraub, 1986; Baron ve Colwell, 1991; Fisher ve ark., 1991; Chabaudie ve Boulard, 1992; Moire, 1998). *Hypoderma lineatum*'un birinci dönem larvalarının serin proteaz sekresyonu Hipodermin A'dır (Khaznadji ve ark., 2003). Hipodermin A'nın immün yanıtın değişimini etkileyen mekanizması in vivo ve in vitro olarak gösterilmiştir. HA'nın lenfositlere etkisiyle IL-2 üretiminin ve salgılanmasının azaldığı, fakat delta interferon üretimine etkisi olmadığı görülmüştür (Chabaudie ve ark., 1991; Nicolas-Gaulard ve ark., 1995). Aynı zamanda HA farklı lenfosit reseptörlerden CD<sub>2</sub> (Cluster of differentiation 2), CD<sub>14</sub> ve CD<sub>18</sub>'in ekspresyonunu da azaltmaktadır (Moire ve ark., 1997). *Hypoderma* spp. larvaları ile ilk defa enfeste edilen sığırlarda, 6. saatte başlayıp, 48 saat içinde devam eden orta derecede yangısal deri reaksiyonları ve seyrek olarak da polimorf nükleer nötrofilleri içine alan daha fazla mononükleer hücre infiltrasyonu ile karakterize reaksiyonlar görüldüğü bildirilmiştir. Reenfeste

hayvanlarda deri reaksiyonlarının niteliği allerjik ve tip III hipersensitivite reaksiyonları şeklinde olup, ilk kez enfeste olan hayvanlara göre, enfestasyondan 6 saat sonra daha yoğun mononükleer hücrelerin ve 12-48. saatlerde yüksek miktarda eozinofillerin bulunduğu, yoğun olarak polimorfonükleer nötrofil, eozinofil ve lenfositlerle karakterize yüzlek bir deri reaksiyonu görülmektedir (Şekil 10). Reenfeste olanlarda deride daha fazla olmak üzere CD<sub>3</sub>+T hücreleri infiltrasyonu gözlenirken, dikkati çekecek derecede B-hücre ve plazma hücre infiltrasyonu gözlenmektedir (Lopez ve ark., 2005).



**Şekil 10.** *Hypoderma lineatum* (L<sub>1</sub>) enfestasyonundan 48 saat sonra derinin histopatolojisi. A,B; Primer enfekte hayvanda orta derecede yangısal ve mononükleer hücre infiltrasyonu, C,D; Reenfekte hayvanda 6 saat sonra orta derecede perivasküler infiltrasyon, E; Reenfekte hayvanda 12 saat sonra mononükleer hücre infiltrasyonu, F; Reenfekte hayvanda 96 saat sonra dermis ve hipodermiste yoğun yangısal infiltrasyon (Lopez ve ark., 2005).

*Hypoderma* spp. larvaları ile ilk defa enfeste ve reenfeste hayvanlarda deriden özefagusa kadar olan göç esnasında IL4+'ün, enfestasyondan 6 saat sonra yükseldiği ve 48 saat sonra düştüğü ve her iki grupta da IL10+ ve IFN $\gamma$ +'nın arttığı

gözenmiştir. Özefagusa kadar ki göç esnasında başlangıçta hem Th1 (IFN- $\gamma$ ) hem de Th2 (IL-4 ve IL-10) sitokinlerinde artış söz konusudur (Otranto, 2001; Dacal ve ark, 2009; Morrondo ve Diez-Banos, 2013)

## **2.11. Hypodermosis ile Mücadele ve Kontrol**

### **2.11.1. Biyolojik Kontrol**

Biyolojik kontrolde predatörler dâhil, virus, parazit, mantar ve mikrobiyal patojenlerle doğal düşmanların kullanılması esası söz konusudur (Kilgore ve Douth, 1967; Harwood ve James, 1979; Scholl, 2006).

#### **Bakteriler**

*Bacillus thuringiensis*'in, *Hypoderma* larvalarına karşı kullanılabileceği bildirilmiştir. Ayrıca birçok farklı bakterinin, *Hypoderma* L<sub>2</sub> ve L<sub>3</sub> larvalarının sindirim sisteminde subkutan dokuların tahribatına neden olduğu bildirilmiştir (Scholl, 2006).

#### **Mantarlar**

Mantarların *H. bovis* pupalarını yıkımladığı bildirilmiş ve entomopatojen olan *Beauveria tenella*, *Hypoderma* spp.'de mortalite oluşturduğu saptanmıştır (Minar ve Samsinakova, 1977; Scholl, 2006). Bir entomopatojen olan *Tolytocladium niveum*, *H. tarandi*'nin pupalarında tespit edilmiştir (Scholl, 2006).

#### **Parazitoidler**

*Hypoderma* soyunda nematod parazitoit bildirilmemekle beraber, insekt parazitoit olan *Trichopria* spp., *H. bovis*'in pupalarında tespit edilmiştir (Blagoveshchensky, 1970; Scholl, 2006).



## **Predatörler**

Yere yeni düşmüş *Hypoderma* spp. larva ve pupalarının köstebek ve rodentlerce yendiği, erginlerin de kanatlılar tarafından avlanabileceği bildirilmektedir (Stegman, 1920; Bishop ve ark., 1926; Colwell, 1992).

## **Bitkiler**

Piretrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) ve tütün yapraklarının ekstraktlarının *Hypoderma* larvalarını öldürdükleri, dolayısıyla bunların ve diğer bazı bitkilerin spesifik ekstraktları doğal kontrol amacıyla kullanılabilirliği belirtilmektedir (Bishopp ve ark., 1926; Scholl, 2006).

### **2.11.2. Mekanik Kontrol**

Larvaların elle çıkarılması, pupaların tuzaklı yerlere düşmesinin sağlanması gibi ilkel mekanik kontrol yöntemleri oestrin insektalara uygulanmıştır (Bishopp ve ark., 1926; Hearle, 1938; Anderson ve Nilssen, 1996). Diğer taraftan her yıl meraların dönüşümlü otlatılması suretiyle *Hypoderma* spp.'nin kontrol altına alınabileceği bildirilmektedir (Hearle, 1938; Alicata, 1964; Scholl, 2006).

### **2.11.3. Kimyasal Mücadele ve Kontrol**

Myiasis etkenlerinin eradikasyonunda iki önemli prensip vardır. Bunlardan ilki ergin sineklerle mücadeledir. Ancak doğada serbest olarak uçan, genellikle meskenlere girmeyen sineklerle mücadele oldukça zordur. Ergin sineklerle mücadele pratik ve ekonomik olmadığı için hastalıkla mücadele göç dönemindeki larvalara karşı yapılmaktadır.

*Hypoderma* spp. türlerini elimine etmek için uzun yıllar çeşitli metotlar kullanılmıştır. Ancak burada önemli olan larvaların, sırt derisini delmeden önce vücut içinde göç halindeyken öldürülmesidir. Deriyi deldikten sonra yapılacak sağaltım deride meydana gelen kayıpları önlemez. Tedavide önemli bir nokta ise

larvaların vertebral kanal içinde bulunduğu zamanda ilaçlamanın yapılmamasıdır (Scholl, 2006). Hypodermosise karşı dünyada ve Türkiye’de fenthion, ruelen, neguvon, tiguvan gibi insektisitler oral, sprey, banyo, pour-on, spot-on gibi metotlarla uygulanmıştır (Meriç ve Korkut, 1960; Sayın ve Meriç, 1976; Boulard ve ark., 1996). Son yıllarda yaygın olarak kullanılan ivermektin türevleri parazitin bütün larva dönemlerine karşı etkili bulunmuştur (Dinçer, 1997; Colwell ve Jacobsen, 2002; Scholl, 2006).

Hypodermosis mücadelesinde sonbahar döneminde ilaçlama ile deri, et ve süt veriminde meydana gelebilecek zararlar büyük oranda azaltılmış veya ortadan kaldırılmış olur. İlaçlamaya rağmen sırt derisine ulaşabilen larvalarla mücadele ile ergin sineklerin ortadan kaldırılmaları ve daha sonraki yıllarda larva sayısının azaltılabilmesi mümkündür. Sonbahar ilaçlamasına rağmen sırt derisi altına ulaşan larvalara karşı ilkbaharda ikinci bir mücadele yapılmalıdır (Meriç ve Korkut, 1960; Özkutlu ve Sevgili, 2005). Hypodermosiste L<sub>1</sub>’e karşı doramektin, moksidektin ve ivermektin’in sığır dozu derialtı ve kas içi 0,2 mg/kg, pour-on 0,5 mg/kg dır. İvermektinde olduğu gibi eprinomektinin 0,5mg/kg pour-on uygulamaları L<sub>1</sub>’lere %90’ın üzerinde etki etmektedir (Drummond, 1985; Scholl ve ark., 1992; Lonneux ve Losson , 1994; Panadero ve ark., 1997; Boulard ve ark., 1998; Holste ve ark.,1998; Vercruyssen ve Rew, 2002). İvermektin ve moksidektin’in parenteral kullanımı dışında oral olarak da 0,2 mg/kg dozda uygulanabilmektedir (Tablo 4) (Vercruyssen ve Rew, 2002; Otranto ve ark., 2005b).

**Tablo 4.** *Hypoderma* spp. larvalarına etkili makrosiklik laktonlar (Colwell ve ark., 2006)

Tür	Makrosiklik laktonlar	Çalışmalar
<i>H. bovis</i> / <i>H. lineatum</i>	İvermektin	Benz (1985), Drummond (1985), Leaning (1984)
	Eprinomektin	Holste ve ark. (1998)
	Doramektin	Hendrickx ve ark. (1993)
	Moksidektin	Scholl ve ark. (1992), Boulard ve ark. (1998)
<i>H. tarandi</i>	İvermektin	Oksanen ve ark. (1992)
	Doramektin	Oksanen ve ark. (1995)
	Moksidektin	Oksanen ve Nieminen (1998)

#### 2.11.4. Genetik Kontrol

Hypodermosisin kontrol ve eradikasyonu için *Hypoderma* erkeklerinin gamma ışınları ile steril edilmeleri ile steril insekt tekniği düşünülmüştür. Ancak larvaların in vitro olarak yetiştirilememesi ve canlı hayvanlarda yapılması pahalı ve zor olduğu için bu yöntem yaygın uygulama alanı bulamamıştır (Colwell ve ark., 2006; Scholl, 2006). Bununla birlikte *H. bovis* ve *H. lineatum*'un erkeklerinin steril edilmesiyle Amerika'nın Kanada sınırına yakın 625 km<sup>2</sup> lik bir bölgede her iki türün elimine edilmesi sağlanmıştır (Kunz ve ark., 1990).

#### 2.11.5. İmmünolojik Kontrol ve Aşılama

Genel olarak yaşlı sığırların, bir yaşına kadar olan sığırlardan daha az *Hypoderma* spp. larvası taşıdığı ve bunun da bağışıklığa bağlı olduğu kabul edilmektedir. Bu gözlem, birçok araştırmacı için hypodermosis'e karşı sığırlara bağışıklık kazandırılabilceği fikrini cazip hale getirmiştir. Bu nedenle bu konuda çeşitli aşı çalışmaları yapılmıştır (Baron ve Weintraub, 1986).

Bu denemelerden birinde, birinci dönem larvaların kaba ekstraktları veya yarı saf antijenik yapılarıyla hazırlanan aşılar hypodermosis'e karşı hayvanların korunmasında kısmen etkili bulunmuştur. *Hypoderma lineatum*'un larval ekstraktlarından hazırlanan antijenle de *H. lineatum* ve *H. bovis*'e karşı buzağuların bağışık kılınabilirliği incelenmiştir. Bu çalışmada larvalardan çıkarılan ekstraktlarla hazırlanan aşıda yeterli bir korunma sağlanamamasına rağmen, *Hypoderma* spp. popülasyonunda önemli bir azalma olduğu görülmüştür (Baron ve Weintraub, 1986).

Son zamanlarda yapılan aşı çalışmaları yalnızca HA veya HC ve HB ile farklı kombinasyonlar kullanılarak yapılmaktadır. *Hypoderma lineatum* ve *H. bovis*'te bulunan HA'nın epitoplari ortaktır. Danaların HA ile aşılmasında, kontrol grubunda larvaların mortalitesi %88,5 iken, aşılana gruptaki bu oranın %98,5 olması HA'nın yüksek bir koruma derecesi sağladığını göstermektedir. Ancak diğeri aşılama denemelerinde hypodermosis'e karşı aşılari tam bir koruma sağladığı kanıtlanamamıştır (Chabaudie ve Boulard, 1992). Hipoderminlerden HB, HA ve HC

ile yalnız oluşturulan veya güçlü bir immunomodülatör olan monofosforil lipid ile kombine edilerek bağışık kılınan buzağılarda, üçüncü dönem larva sayısında bir azalma gözlenmesine rağmen güçlü bir hücrel ve humoral yanıt ve enfestasyona karşı tam bir koruma sağlanamamıştır. Freund adjuvantı ile birlikte veya yalnız olarak enjekte edilen HA ile yapılan bir denemede ise aşılanan sığırlarla kontrol grubu arasında *Hypoderma* larvalarının canlı kalması arasında bir fark gözlenmemiştir (Chabaudie ve Boulard, 1992; Scholl, 2006). Son yıllarda üçüncü dönem larvaların yağ dokusu, hemosit ve hemolenften hazırlanan ekstraktlarla yapılan bağışıklık denemelerinde enfeste hayvanlarda larvaların üçüncü döneme ulaşamadıkları, özellikle yağ dokusu ekstraktı ile aşılanelarda %100 ölüm şekillendiği gözlenmiştir (Colwell, 2011). Avrupa'da hypodermosise karşı ilk patentli aşı 1980'li yılların sonlarına doğru geliştirilmiştir (Pruett ve ark., 1987, 1989).

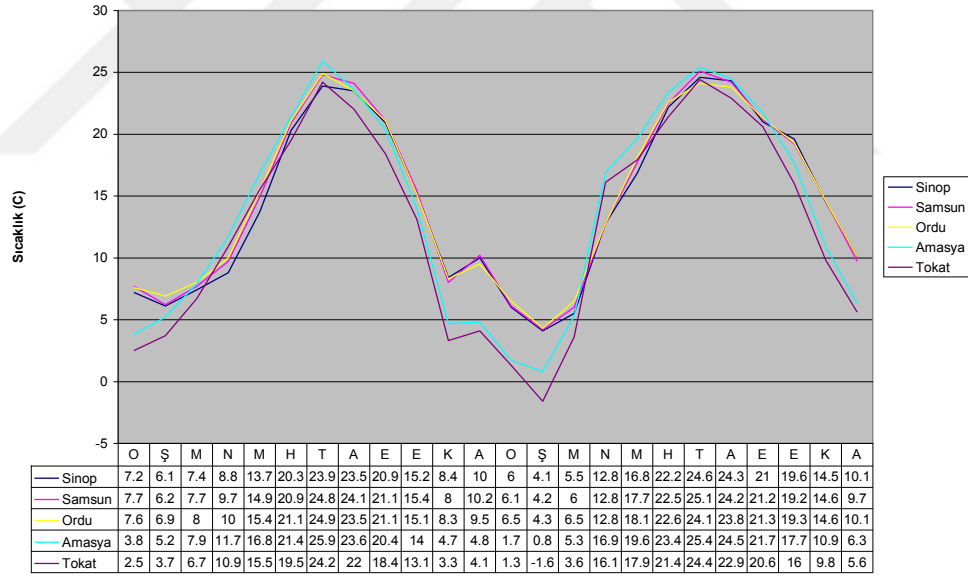
*Hypoderma bovis* ve *H. lineatum* larvalarının sebep olduğu sığır hypodermosisi kuzey yarımküre üzerinde geniş ölçüde yayılım göstermektedir. Bu enfeksiyona karşı etkili insektisitler bulunmakla birlikte bu ilaçların kullanımı bireysel düzeyde olup sığır sürülerini kapsamamaktadır. Tedavi edilmeyen hayvanlar hastalığın rezervuarı olarak kalmakta ve her yıl sığır popülasyonu tekrar enfeste olmaktadır. Bu hastalığın hayvansal üretim ve genel sığır sağlığı üzerindeki ekonomik etkileri birçok Avrupa ülkesinde organize kontrol programlarının başlamasına neden olmuştur.

*Hypoderma lineatum* ve *H. bovis* sığırların spesifik parazitidir. Eradikasyon çalışmalarının etkili olması, parazitin biyolojisi ve epidemiyolojisinin iyi bir şekilde bilinmesine, sığır popülasyonunun tamamında sağaltımın aynı zamanda yapılıp tamamlanmasına, epidemiyolojik çalışmaların daha yaygınlaştırılmasına bağlıdır. Hypodermosisin kontrolü bölgesel ya da ulusal düzeyde koordine edilebilmektedir. Bu sayede büyük çaptaki sığır popülasyonlarının aynı anda tedavi edilmesi ile bölgesel bir kontrol sağlanabilir. Bu nedenle bu çalışmada bilimsel verilere dayalı olarak Orta Karadeniz Bölgesi'nde sığır hypodermosisin yaygınlığı ve enfestasyona sebep olan türlerin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

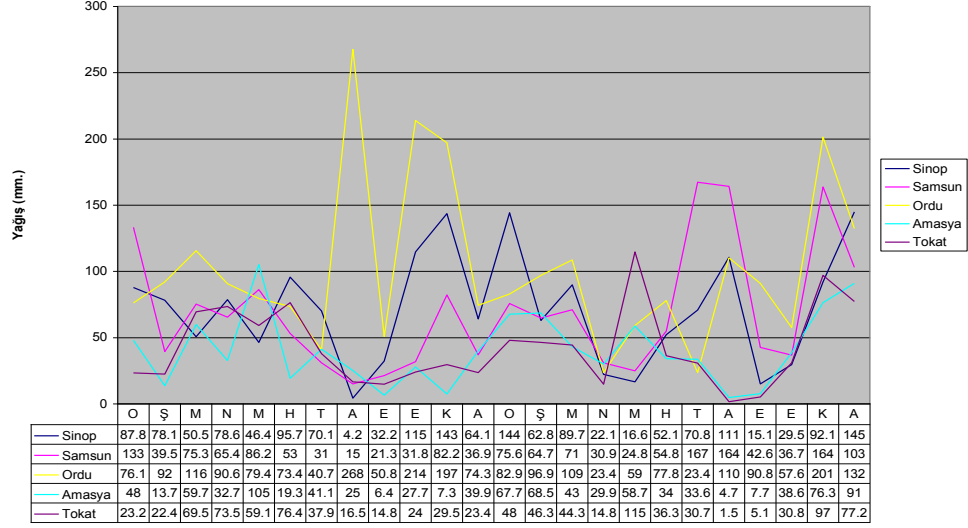
### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Çalışma Alanı

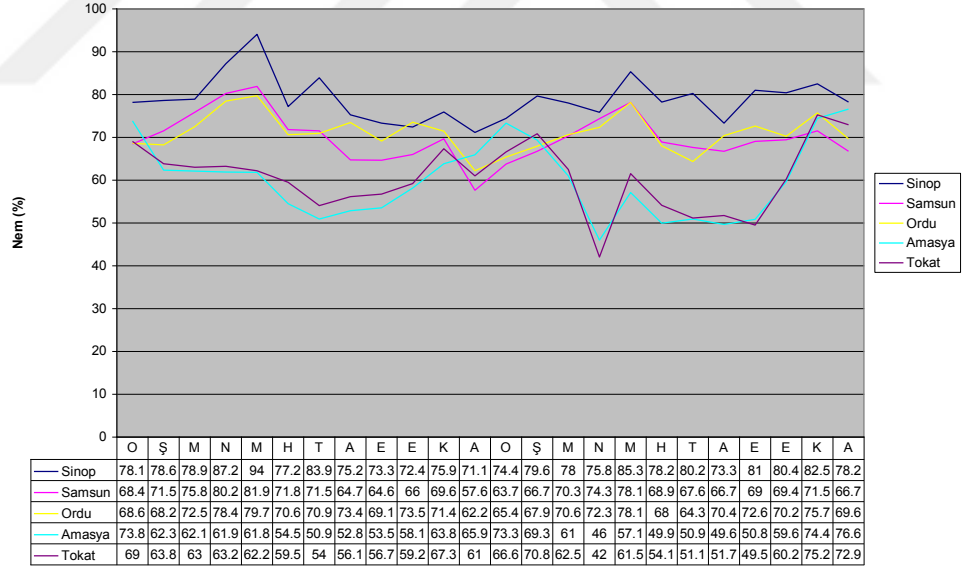
Orta Karadeniz Bölgesi 40-42° Kuzey ve 35-38° Güney enlemleri arasında, denizden 1268 m yüksekliğe kadar ulaşmaktadır. Doğu Karadeniz Bölgesi'ne nazaran az yağış almakla birlikte, her mevsim yağışlı ve ılık olarak geçmektedir. 2011 ve 2012 yılları meteorolojik değerleri (ısı, nem, yağış miktarı) Şekil 11,12 ve 13'de verilmiştir (Meteoroloji Bölge Müdürlüğü). Doğuda Ordu ilinin kıyı şeridi 1500 m yüksekliğe kadar meyve ağaçları, ormanlar ve fundalıklarla kaplıdır. Batıda Sinop ilinin topraklarının %62'si orman ve fundalıklarla kaplıdır. Amasya ilinde ise ormanlık alan az olmakla birlikte, Samsun ve Tokat'ın yaklaşık %16-50 si orman ve fundalık, geri kalan kısımların çoğunu ekili ve dikili alanlarla, çayır ve meralar kaplar.



Şekil 11. Orta Karadeniz Bölgesi 2011-2012 yılları ortalama sıcaklık değerleri (Meteoroloji Bölge Müdürlüğü)



Şekil 12. Orta Karadeniz Bölgesi 2011-2012 yılları ortalama yağış değerleri(Meteoroloji Bölge Müdürlüğü)



Şekil 13. Orta Karadeniz Bölgesi 2011-2012 yılları ortalama nem (%) değerleri (Meteoroloji Bölge Müdürlüğü)

Bölge hayvancılığa müsait olup, sığır, manda, koyun ve keçi beslenmektedir. Hayvancılık aile işletmeciliği karakterinde ve küçük üniteler şeklindedir. Bununla birlikte az olarak da yarı entansif besicilik yapılmaktadır. Orta Karadeniz Bölgesi'nde illere göre toplam sığır sayıları aşağıdaki gibidir (Tablo 5).

**Tablo 5.** Çalışma yapılan illerdeki toplam sığır sayıları (TÜİK, 2014)

İller	Sığır Sayısı
Samsun	324.559
Tokat	241.049
Amasya	155.795
Ordu	151.883
Sinop	104.564

### **3.2. Saha Çalışmaları**

Saha çalışmaları 2011-2012 yılları arasında Orta Karadeniz Bölgesi'nde bulunan Samsun, Sinop Amasya, Tokat, Ordu illerine bağlı 27 ilçedeki toplam 81 köyde aile işletmelerinde, çiftliklerde ve merada beslenen sığırlar ile mezbahalarda yürütüldü.

#### **3.2.1. Hypodermosis Yönünden Muayene Edilen Sığırlardan Alınan Kan ve Süt Örneği Sayısı**

Karadeniz bölgesinde daha önce sığır hypodermosisi için Sayın ve ark., (2000) tarafından saptanan %28,1'lik prevalans oranı tahmini prevalans olarak dikkate alınarak, %5 hata payı ve %95 güven aralığında tesadüfi örnekleme ile Samsun, Sinop, Amasya, Tokat ve Ordu illerine bağlı ilçe ve köylerden 309 sığırdan az olmamak üzere toplam 1560 hayvan üzerinde yürütüldü (Şekil 14; Thrusfield, 1995).



**Şekil 14.** Kan serumlarının alındığı il ve ilçeler

Tesadüfî örnekleme ile seçilen köylere gidilerek, montafon, holştayn, simental, jersey ırkı ve melezleri sığırların yaşı ve cinsiyeti kayıt edildikten sonra antikorların bulunduğu kış ve erken ilkbahar aylarında, *vena jugularis*'ten steril vakumlu tüplere 10 ml kan alındı. Alınan kan örnekleri soğuk zincirde laboratuara getirildi. Materyal alınan hayvan sayıları il ve ilçe bazında Tablo 6' da gösterilmiştir. Ayrıca Lâdik ilçesinde *Hypoderma* larvası (L<sub>2</sub>/L<sub>3</sub>) tespit edilen ve edilmeyen sığırlardan 100 adet süt numunesi toplandı ve soğuk zincir altında laboratuara getirildi.



**Tablo 6.** Araştırmada toplanan kan serumlarının il ve ilçelere göre dağılımı

<b>İl</b>	<b>İlçe</b>	<b>Hayvan Sayısı</b>	<b>Toplam</b>
<b>Samsun</b>	Merkez	13	
	Vezirköprü	28	312
	Lâdik	193	
	Kavak	78	
<b>Amasya</b>	Gümüşhacıköy	46	
	Merzifon	22	
	Suluova	26	310
	Göynücek	26	
	Taşova	32	
<b>Tokat</b>	Merkez	158	
	Zile	55	
	Almus	34	
	Turhal	66	314
	Erbaa	39	
<b>Sinop</b>	Merkez	120	
	Boyabat	63	
	Gerze	16	
	Erfelek	18	312
	Saraydüzü	20	
<b>Ordu</b>	Merkez	195	
	Aybastı	27	
	Perşembe	26	
	Ünye	89	312
	Akkuş	13	
	Merkez	157	
<b>Toplam</b>	<b>27</b>	<b>1560</b>	<b>1560</b>

### 3.2.2. Mezbahalarda Kesilen Sığırlardan Larvaların Toplanması

Çalışmaların yürütüldüğü illerde, parazitin yaşam siklusu dikkate alınarak 2011 ve 2012 yılları arasında sonbahar-ilkbahar ve ilkbahar-yaz dönemlerinde mezbahalara gidildi. Mezbahada kesilen sığırların yüzülen derisinin iç yüzü, deri altı dokusu, özefagus submukozası ve diyaframı, karkasın sırt ve bel bölgesi ve spinal kanal civarı larva yönünden incelenerek, sırt ve lumbal bölgede bulunan larvalar

önce %0,9 luk fizyolojik tuzlu su ile yıkandı ve PBS (pH: 7,2) içine alınıp termos içerisinde soğuk zincirde laboratuara getirildi.

### **3.3. Laboratuvar Çalışmaları**

Laboratuvar çalışmaları Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarı ile Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Parazitoloji laboratuvarlarında yürütüldü.

#### **3.3.1. Kan ve Süt Serumlarının Çıkarılması ve Muhafazası**

Soğuk zincir altında laboratuara getirilen kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edilen kan örnekleri steril şartlarda 1 ml'lik eppendorf tüplere alınarak ELISA testinde kullanılmaya kadar – 20 °C'de muhafaza edildi.

Süt örnekleri, steril, ağzı vidalı cam tüpler içersine 10 ml süt örneği alınarak soğuk zincir altında laboratuara getirildi. Laboratuara getirilen süt örneklerinin üzerine 0,2 ml rennin enzimi ilave edildi. Enzim ilavesinden sonra 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılan süt örnekleri bu sürenin sonunda 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edilen süt örneklerinin üzerinde oluşan krema tabakası bir spatül yardımı ile uzaklaştırıldı. Daha sonra süt serumları steril şartlar altında 1 ml'lik eppendorf tüplerine porsiyonlanarak 56 °C'de 30 dakika su banyosunda bekletildikten sonra -20 °C'de derin dondurucuda muhafaza edildi (Yavru ve ark., 2013).

#### **3.3.2. Larvaların Stereo-mikroskop ile Morfolojik İdentifikasyonu**

Mezbahadan toplanan L<sub>2</sub> ve L<sub>3</sub>'lerin tür ayrımları, ilgili literatürler (Zumpt, 1965; Colwell ve ark., 2006) ışığında renk, büyüklük, peritremin ve stigmaların morfolojik yapısına bakılarak, stereomikroskop ile yapıldı. Larvalar tür teşhisi yapıldıktan sonra homojenize edilerek, immünizasyon ve PCR çalışmaları için kullanılmaya kadar –20 °C'de muhafaza edildi.

### 3.3.3. Deney Hayvanı İmmünizasyonu ve Hiperimmün Tavşan Serumunun Eldesi

Canlı hayvanlardan toplanan ve immünizasyonda kullanılan larvaların tamamı 4 kez 0,01 M buffer saline (pH: 7,2) içinde yıkandı, 0,1 M karbonat buffer (pH: 9,6) içerisinde (larva/3 ml) homojenize edilerek 4 °C'de bir gece bırakıldı ve yüksek devirli santrifüjde (20.000xg) yarım saat santrifüj edilerek, supernatantlar toplandı. Santrifüjleme işlemi sonrası alınan üst sıvı UV spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boyunda okundu ve BSA standart olarak kullanılarak UV spektrofotometrede protein tayini yapıldı. BSA'nın bilinen konsantrasyonları karşılaştırmalı olarak mg/ml düzeyinde belirlendi, protein konsantrasyon tayini (mg/ml)  $1,55x(A280)-0,76x(A260)$  formülüne göre hesaplandı ve buffer içindeki 4,9 mg/ml supernatant porsiyonlanarak -20 °C'de muhafaza edildi.

Hiperimmün serum elde etmek için 4 adet 6 aylık Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Tavşanlar deney hayvanları ünitesine getirildikten sonra genel muayeneleri yapıldı. Sağlıklı olduğu tespit edilen tavşanların her biri ayrı kafeslere konuldu ve inokülasyon öncesi kanları alındı. Alınan kanlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, serumları çıkarılarak kullanılmaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

İlk enjeksiyon için 100 µl *Hypoderma* L<sub>3</sub> antijeni 900 µl PBS ile karıştırıldı. Hazırlanan bu karışımdan 850 µl alınarak üzerine 850 µl oranında Freund's complete adjuvantı eklendi. Bu karışım homojenize edildikten sonra tavşana deri altı yolla 4 farklı noktadan enjekte edildi. Daha sonra 25 gün ara ile 4 kez daha Freund's incomplete adjuvantla aynı oranında antijen verildi. Her enjeksiyondan önce tavşanlardan kan alındı ve serumları çıkartılarak -20 °C'de kullanılmaya kadar muhafaza edildi. Son enjeksiyondan sonra ise azami derecede kan serumları toplandı ve Western blot çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C'ye kaldırıldı (Webster ve ark., 1997).

### 3.3.4. Serolojik -Moleküler Çalışmalar ve Sekanslama

Sığırlardan ve tavşanlardan toplanan kan serumları ve *Hypoderma* spp. larva ekstraksiyonları ile aşağıdaki serolojik ve moleküler testler yapılmıştır.

#### ELISA (Enzime Linked Immunosorbent Assay)

##### Kan Serumunda ELISA Testi

Kan serumlarında antikor tespiti ticari ELISA testi (IDEXX Hypodermosis Serum, P06110 seri nolu kit) ile yapıldı. Test prosedürü aşağıdaki gibidir.

##### Kit içeriği:

1. 96'lık immum plak (Pürifiye *H. lineatum* L<sub>1</sub> antijeni ile kaplı)
2. Dilusyon buffer 1
3. Dilusyon buffer 2
4. Pozitif kontrol
5. Negatif kontrol
6. Konjugat (Anti ruminant IgG-HRP)
7. TMB (Tetra methyl benzidine) substrat
8. Stop solüsyonu

##### Test prosedürü:

1. Ölçüm öncesi tüm serum örnekleri ve kit bileşenleri oda sıcaklığında en az 30 dakika bekletildi.
2. Tüm test kit bileşenleri ve serum örnekleri düşük devirde vorteksle karıştırıldı.
3. Plakların her kuyucuğuna 190 µl dilusyon buffer 2 solüsyonundan konuldu. Bu işlemi takiben bir kuyucuğa 10 µl negatif kontrol, iki kuyucuğuna 10 µl pozitif kontrol ve diğer gözlere de 10 µl serum örnekleri kondu. Her plak yavaşça karıştırıldı ve üzeri kapatılarak 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.
4. İnkübasyondan sonra kuyucuklar boşaltıldı ve tüm kuyucuklar 300 µl 1:100 oranında sulandırılmış yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.
5. Konjugat 1:100 oranında dilusyon buffer 1 solüsyonu ile sulandırıldı.

6. Kullanıma hazır hale gelen konjugattan her bir kuyucuğa 100 µl eklenerek, plağın üzeri kapatıldı ve 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi.

7. İnkübasyon sonunda 300 µl 1:100 oranında sulandırılmış yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama işlemi yapıldı.

8. Plakların her kuyucuğuna 100 µl TMB (Tetra methyl benzidine) substrat eklendi. Daha sonra plak oda ısısında (24 °C) 20 dakika karanlıkta inkübe edildi.

9. 100 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve plak 450 nm dalga boyunda ELISA reader (BioTek ELX800) kullanılarak okundu.

Test sonucunda optik dansitesi okunan örneklerin % inhibisyon değerleri test prosedüründe belirtildiği şekilde aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\frac{\text{Örneklerin ortalama OD değeri} - \text{Ortalama Negatif kontrol OD değeri}}{\text{Ortalama Pozitif kontrol OD değeri} - \text{Ortalama Negatif kontrol OD değeri}} \times 100$$

Bu formüle göre % inhibisyon değeri  $\leq$  %45 ise sonuç negatif,  $\geq$  %55 sonuç pozitif ve %45-%55 arası ise şüpheli olarak kabul edildi.

### **Süt Serumunda ELISA Testi**

Toplanan süt serumlarından antikor tespiti için; Otranto ve ark. (2001) ile Regalbono ve ark. (2003)’nin çalışmaları örnek alınarak, kan serum örnekleri için hazırlanan ELISA kiti (IDEXX Hypodermosis Serum, P06110–13) ile test metodu modifiye edilerek kullanıldı.

1. Süt serum örnekleri ve tüm kit bileşenleri oda sıcaklığında en az 30 dakika bekletildi.

2. Tüm test kit bileşenleri ve serum örnekleri düşük devirde karıştırıldı.

3. İlk üç kuyucuğa 190 µl, diğer kuyucuklara 100 µl dilüsyon buffer 2 solüsyonundan konuldu. Bu işlemi takiben plağın bir kuyucuğuna 10 µl negatif kontrol, iki kuyucuğuna 10 µl pozitif kontrol ve diğer kuyucuklara da 100 µl olmak

üzere süt serum örnekleri kondu. Plak yavaşça sallandı ve üzeri kapatılarak 37 °C’de 1 saat inkübe edildi.

4. İnkübasyondan sonra kuyucuklar iyice boşaltıldı ve tüm kuyucuklar 300 µl 1:100 oranında sulandırılmış yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.

5. Konjugat 1:100 oranında dilüsyon buffer 1 solüsyonu ile sulandırıldı.

6. Kullanıma hazır hale gelen konjugattan her bir kuyucuğa 100 µl eklenerek, plağın üzeri kapatıldı ve 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi.

7. İnkübasyon sonunda tekrar 3 kez yıkama işlemi yapıldı.

8. Plakların her kuyucuğuna 100 µl TMB substrat eklendi. Daha sonra plak oda ısısında (24 °C) 20 dakika karanlıkta inkübe edildi.

9. 100 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucu (BioTek ELX800) kullanılarak okundu.

Test sonucunda optik dansitesi belirlenen örneklerin % inhibisyon değerleri test prosedüründe bildirilen formülle hesaplandı.

$$\frac{\text{Örneklerin ortalama OD değeri} - \text{Negatiflerin ortalama OD değeri}}{\text{Pozitiflerin ortalama OD değeri} - \text{Negatiflerin ortalama OD değeri}} \times 100$$

Yukarıdaki formüle göre yapılan hesaplama sonucunda test örneği % inhibisyon değeri  $\leq$  %45 ise sonuç negatif,  $\geq$  %55 ise sonuç pozitif, pozitif ve %45-%55 arası ise şüpheli olarak kabul edildi. Elde edilen OD değerleri ROC analizi ile değerlendirildi.

### **SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamid Gel Elektrophoresis)**

SDS-PAGE Laemli (1970) metoduna göre yapıldı. *Hypoderma bovis* L<sub>2</sub> ve L<sub>3</sub> antijenleri (260 µl) %12’lik SDS-PAGE’de yürütüldü ve coomassie blue ile boyanarak polipeptit bantlar gösterildi. Proteinler semi dry metot kullanılarak 25 mM Tris ve 192 mM glisin buffer ile nitroselüloz membrana NCP (NCP: 0,2 µm pore size; Sigma) 60 dakika 100V, 4 °C’de transfer edildi. Nitroselülöz membrana

proteinler yüklendikten sonra stripler kesildi ve Western blot testinde kullanılmak üzere kurutulularak saklandı (Webster ve ark., 1997; Panadero ve ark., 2009).

### **Western Blot**

Protein transfer edilmiş membranlar ince şeritler (0,5-0,6 cm) halinde kesildikten sonra vida kapaklı tüplere kondu. Bloklama işlemi için (%1 süt tozu + %0,5 Tween 20) ile dairesel çalkalayıcıda, gece boyu bloklama işlemi yapıldı.

Bloklama işleminden sonra membranlar %0,1 Tween 20 içeren Phosphate Buffered Saline (PBS), pH: 7,4 ile 3 kez, 10'ar dk. yıkandı.

Test edilecek serumların sulandırılmaları aynı bloklama reaktifleri içerisinde yapıldı. Serumlar, içerisinde membranların bulunduğu ve serum numaralarına göre etiketlenmiş tüplere kondu ve 1 saat süresince dairesel çalkalayıcıda inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda serumlar dökülerek her tüp TTBS ile, 3 kez 10'ar dk. yıkandı. Sığır serumları için anti-bovine IgG alkalın fosfataz 1:15000 (%1 süt tozu + %0,5 Tween 20), tavşan serumları anti-rabbit IgG alkalın fosfataz ile 1:30000 oranlarında sulandırıldı ve her tüpe 2 ml kondu ve 1 saat dairesel çalkalayıcıda inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda konjugat dökülerek her tüp önce 1 kez TTBS ile sonra 2 kez TBS (pH: 9,5) ile 10'ar dk yıkandı. Tüplere BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyolphosphate)/NBT (nitro-blue tetrazolium) substrat buffer konuldu, tüpler yavaş hızda çalkalanmaya devam ederken reaksiyonun oluşumu gözlemlendikten sonra striplerin reaksiyonu çeşme suyunda durduruldu.

### **PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)**

Ekstraksiyonu yapılan *Hypoderma* spp. L<sub>2</sub> ve L<sub>3</sub> için PCR, sekans ve filogenetik analizler yapıldı.

## **DNA Ekstraksiyonu**

DNA ekstraksiyonu için larvaların iç dokularından yararlanıldı. Ekstraksiyon için genomik DNA purifikasyon kitinden (Qiagen) yararlanıldı.

Toplam 77 larvaya ait materyallerden DNA ekstraksiyonu yapıldı. Ekstraksiyon işlemi için -20 °C'de saklanan örnekler çıkarılarak larvaların oda ısısına gelmeleri beklenildi. Oda ısısına gelen larvaların, stereomikroskop altında mikrocerrahi aletleri ile iç dokuları çıkarıldı. Üzerine PBS eklenerek bir homojenizatör yardımı ile homojenize edildi.

1. Homojenize edilen doku örneklerinden steril 1,5 ml'lik eppendorfların içine 50 µl örnek alındı.

2. Her bir eppendorfa lizis solüsyonundan (ATL) 180µl konuldu.

3. Karışımın üzerine 20 µl (20 mg/ml) proteinaz K eklendi ve numuneler vortekslenerek 56 °C'de 5 saat su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sırasında örnekler her yarım saatte bir vortekslendi.

4. İnkübasyondan sonra örnekler 15 saniye vortekslendi.

5. Vortekslenen numunelerin üzerine 200 µl lizis solüsyonundan (AL) eklendi. Numune tekrar 15 saniye vortekslendi.

6. Vortekslenen numunelere 200 µl etanol (%96-99) eklendi ve tekrar numuneler vortekslendi.

7. Numuneler 2 ml'lik kolum tüplerine aktarıldı.

8. Numuneler 8000 rpm'de 1 dakika santrifüje edildi.

9. Alt kısım toplama kabı atıldı ve bir yenisi sonraki aşamada kullanıldı.

10. 500 µl AW1 yıkama solüsyonu (95 ml konsantre yıkama solüsyonu+125 ml etanol) eklendi.

11. Numuneler 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

12. Alt kısım toplama kabı atıldı ve yenisi bir sonraki aşamada kullanıldı.

13. 500 µl AW2 yıkama solüsyonu (66 ml konsantre yıkama solüsyonu + 160 ml etanol) eklendi.

14. 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.

15. Alt kısım toplama kabı atıldı.

16. Yeni bir eppendorf içine spin kolum konuldu.



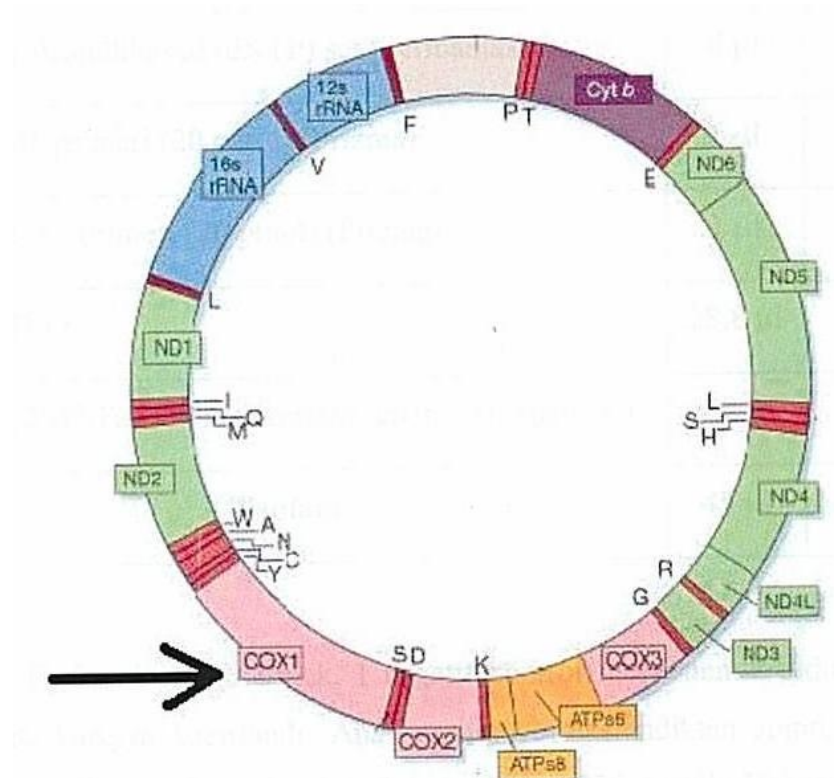
17. 200 µl elution solüsyonundan (AE) eklendi.
18. Numuneler 1 dakika 8000 rpm’de santrifüj edildi.
19. Eppendorfun içindeki spin kolum atıldı.
20. Elde edilen son ürün hedef DNA olarak kullanıldı.

### Primer Seçimi

PCR için *cox1* (Cytochrome c Oxidase 1) gen bölgesi seçildi. *cox1* gen bölgesinin çoğaltılması amacıyla kullanılan ileri ve geri primerler ile baz dizimleri sırasıyla aşağıda gösterilmiştir (Şekil 15).

UEA7 (5'-TACAGTTGGAATAGACGTTGATAC-3') ve

UEA10 (5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3') (Otranto, 2003a)



Şekil 15. *cox1* gen bölgesi (Anon. 2013)

## DNA Amplifikasyonu

Öncelikle her bir örnek için toplam 45 µl hacminde ana karışım hazırlandı (Tablo 7).

**Tablo 7.** PCR için ana karışımın hazırlanması

No	Malzeme	Miktar	Toplam Miktar (78 numune)
1	10X PCR buffer (Thermo)	5 µl	390 µl
2	25 mM MgCl <sub>2</sub> (Thermo)	5 µl	390 µl
3	dNTP (Thermo)	1 µl	78 µl
4	UEA7 primeri (10 pmol, Biomers)	5 µl	390 µl
5	UEA10 primeri (10 pmol, Biomers)	5 µl	390 µl
6	dH <sub>2</sub> O	23,75 µl	1852,50 µl
7	1.25 U Taq DNA polimeraz enzimi (Thermo)	0,25 µl	19,50 µl
<b>Toplam</b>		<b>45 µl</b>	<b>1638 µl</b>

Toplamda 78 örneklik (77 örnek, 1 negatif kontrol) karışım hazırlandı. Daha sonra 0,5 ml'lik PCR tüplerinin içerisine 45'şer µl karışım ve 5 µl hedef DNA konularak toplam 50 µl hacminde PCR karışımı hazırlandı. Bütün numuneler termal siklus cihazına (Thermo Px2) yerleştirilerek, Tablo 8'deki protokole göre reaksiyon gerçekleştirildi.

**Tablo 8.** PCR Protokolü

Sikluslar	Denatürasyon	Bağlama	Uzama
Ön denatürasyon	12 dakika	-	-
40 siklus	95 °C'de 1 dakika	60 °C'de 1 dakika	72 °C'de 1 dakika
Son uzama	-	-	72 °C'de 7 dakika
Son		4 °C	

## **Agaroz Jel Elektroforezi**

PCR ürünlerini belirlemek amacıyla %1'lik agaroz jel hazırlandı. Bu amaçla;

1. 3,5 mg agaroz tartılarak, 1X hazırlanan TAE solüsyonu ile karıştırıldı (Yürütme cihazı tank hacmi= 35 ml).

2. Bu karışım mikrodalga fırına konularak ve agarın tamamen erimesi sağlandı.

3. Mikrodalga fırından çıkarılan agar güvenlik kabininin içinde soğumaya bırakıldı. Yaklaşık 50–60 °C'ye kadar soğuttuktan sonra 3,5 µl etidyum bromid eklenerek homojen dağılım sağlandı.

4. Jel hazırlama tepsisi hazırlandı ve taraklar yerleştirilerek %1'lik agaroz yavaşça tepsinin içine döküldü. Bu esnada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi.

5. Tepsi buzdolabına kaldırılarak tamamen polimerize olması için 20–25 dk kadar beklendi.

6. Daha sonra dikkatlice çıkarılarak jel tepsisi elektroforez tankına yerleştirildi. Üzerine jelin yüzeyini geçecek kadar 1X TAE solüsyonu döküldü (Cleaver, Scientific).

7. 5 µl PCR ürünü 1'er µl yükleme boyası ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi.

8. Elektroforez tankının kapağı kapatılarak, elektrotlar güç kaynağına bağlandı ve örnekler yürütüldü (90 volt, 45 dk).

9. Yürütme işlemi bittikten sonra jel çıkarılarak görüntüleme cihazına konuldu ve fotoğrafları çekildi (Spectroline UV Transiluminator).

## **RFLP (Restriksiyon Parçacık Uzunluk Polimorfizmi)**

Yetmiş yedi adet polimeraz zincir reaksiyon ürünü BfaI, HinfI ve TaqI endonükleaz enzimleri kullanılarak kesme işlemi uygulandı.

**BfaI için:** 10 µl PCR ürünü, 2 µl 10X Buffer 2 Tamponu, 1 µl BfaI restriksiyon enzim (Thermo Scientific) ile toplam hacim 20 µl olacak şekilde distile su ile tamamlanarak 37 °C'de bir gece bekletildi. Daha sonra enzimle muamele

edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 100 voltluk akımda 1 saat yürütüldü. Daha sonra Spectroline UV Transiluminator'de görüntüledi.

**Hinfi için:** 10 µl PCR ürünü, 2 µl 10X Buffer R Tamponu, 1 µl Hinfi restriksiyon enzimi (Thermo Scientific) ile toplam hacim 21 µl'ye tamamlanarak 37 °C'de bir gece bekletildi. Daha sonra enzimle muamele edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 100 voltluk akımda 1 saat yürütüldü. Daha sonra Spectroline UV Transiluminator'de görüntüledi.

**TaqI için:** 10 µl PCR ürünü, 2 µl 10X Buffer TaqI Tamponu, 1µl TaqI restriksiyon enzimi (Thermo Scientific) ile toplam hacim 20 µl'ye tamamlanarak 65 °C'de bir gece bekletildi. Daha sonra enzimle muamele edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 100 voltluk akımda 1 saat yürütüldü. Daha sonra Spectroline UV Transiluminator'de görüntüledi.

*Hypoderma* larvalarına ait olan bant profilleri Otranto ve ark., (2003a) tarafından belirtilen *Hypoderma* türlerine ait olan bant profilleri ile karşılaştırıldı.

### **DNA Dizi Analizi**

Yetmiş yedi adet mitokondrial *cox1* gen bölgesine ait PCR ürünü Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne gönderilerek çift yönlü DNA dizi analizi yaptırıldı. Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne PCR ürünlerinden 30 µl ve her bir örnek için UEA7 ve UEA10 primerlerinden 5 pmol/µl konsantrasyonda 10'ar µl yollandı. Dizi analizi Big Dye Terminator V3 1 metodu ile ABI 3130XL cihazı (Applied Biosystems) ile yapıldı.

### **Filogenetik Analizler**

Her bir örneğe ait olan iki yönlü dizi sonuçları Vector NTI (Invitrogen) programı ile eşleştirildi. Elde edilen ortak dizi sonuçlarının Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) analizleri yapılarak daha önce GenBank'a kayıtlı edilen *Hypoderma* türleri ile karşılaştırılarak benzerlik yüzdeleri belirlendi.

### **3.4. İstatistiksel Analizler**

İstatistiksel analizler için Package for Social Sciences (SPSS 20.0, IBM) software program kullanılarak  $X^2$  ve ROC analizleri yapılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Stereo-mikroskopik Bulgular

Mezbaha çalışmalarının yapıldığı Samsun, Sinop, Amasya, Tokat ve Ordu illerinde *H. bovis* üçüncü dönem larva safhasının Mayıs ve Haziran'da tamamlandığı saptandı. Bu illere ait 13 mezbahadaki sığırlardan toplam 77 adet *Hypoderma* larvası toplandı (Tablo 9).

**Tablo 9.** Mezbahalardan toplanan *H. bovis* larvalarının illere göre dağılımı

İl	Larva Sayısı
Samsun	19
Amasya	17
Tokat	16
Sinop	14
Ordu	11
Toplam	77

Stereomikroskopik tür teşhisinde toplanan larvaların tamamı *H. bovis* olarak tespit edildi (Şekil 16-17).



Şekil 16. *H. bovis* larvaları (L<sub>3</sub>) (orjinal)

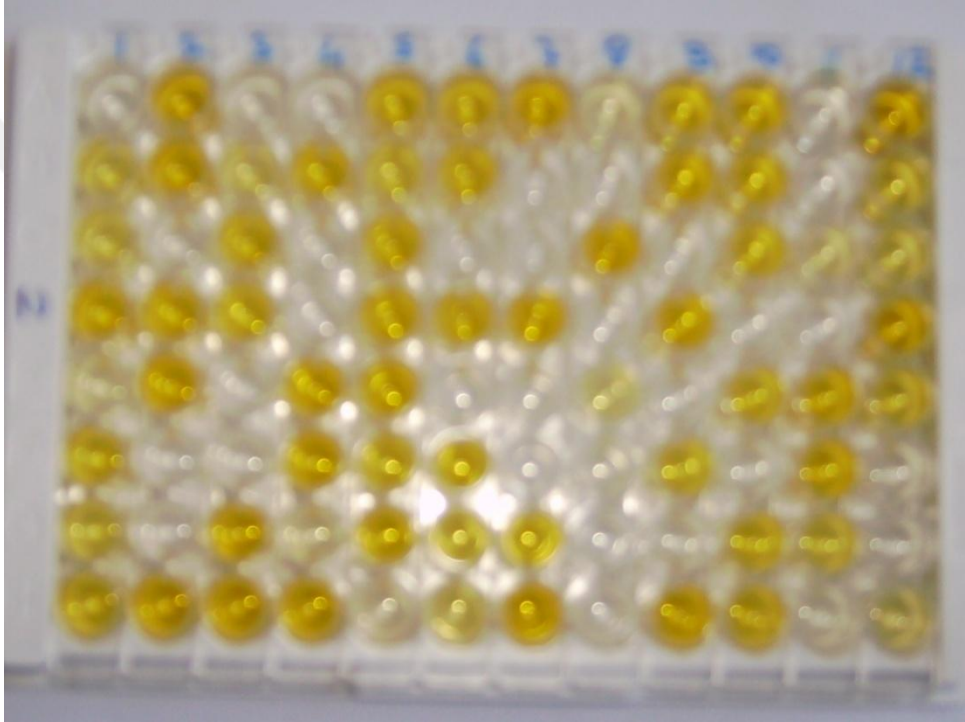


Şekil 17. *Hypoderma bovis* (L<sub>3</sub>) peritremi (orjinal)

## 4.2. Serolojik Bulgular

### 4.2.1. ELISA Bulguları

Orta Karadeniz Bölgesi'nde Samsun, Sinop ve Ordu illerinin her birinden 312, Tokat ilinden 314 ve Amasya ilinden ise 310 olmak üzere toplam 1560 sığır serumunun ELISA ile hypodermosis yönünden incelenmesi sonucu; toplamda 549 (%35,2) sığır seropozitif bulunmuştur (Şekil 18).



Şekil 18. ELISA plağında negatif ve pozitif serumlar (orijinal)

İllere göre seropozitif hayvanların prevalans oranları Tablo 10'da verilmiştir.

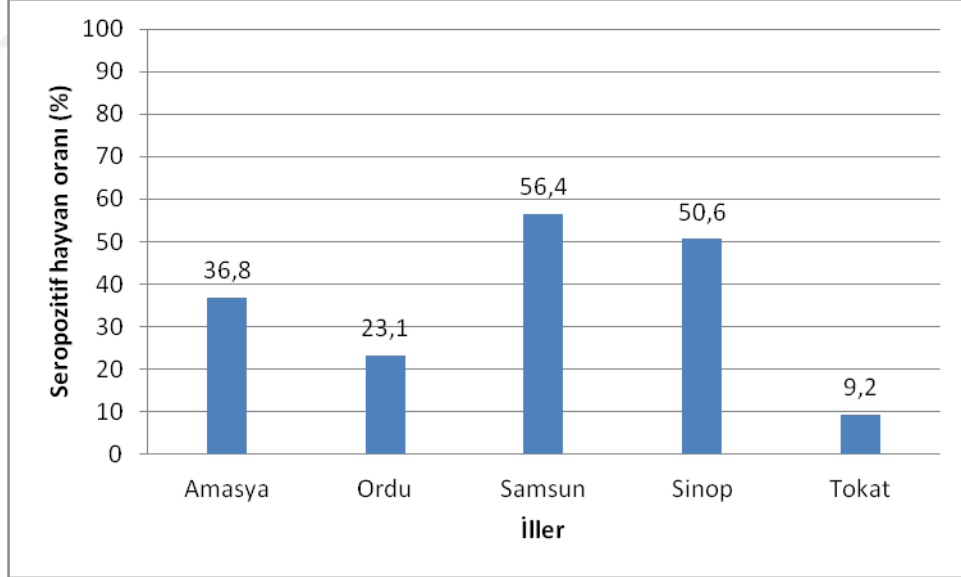


**Tablo 10.** Sığır hypodermosisinde seropozitif hayvanların illere göre dağılımı

İl	Sığır Sayısı	Enfekte Sığır	
		n	%
Amasya	310	114	36,8
Ordu	312	72	23,1
Samsun	312	176	56,4
Sinop	312	158	50,6
Tokat	314	29	9,2
<b>Toplam</b>	<b>1560</b>	<b>549</b>	<b>35,2</b>

$\chi^2$ : 207,4; P<0,01

Şekil 19’da görüldüğü gibi Orta Karadeniz Bölgesi genelinde en yüksek Samsun (%56,4), en düşük Tokat’da (%9,2) seropozitiflik tespit edilmiştir. Samsun ve Sinop arasında hypodermosis seropozitifliği benzer bulunurken, Amasya, Ordu ve Tokat illeri arasındaki hypodermosisin yayılış oranları istatistiksel olarak farklı kaydedilmiştir (P<0,01).



**Şekil 19.** Orta Karadeniz Bölgesi’nde hypodermosis seropozitifliğinin illere göre dağılımı

Her il kendi içinde prevalans yönünden değerlendirildiğinde Samsun’da hypodermosisin yaygın olduğu görülmektedir (Tablo 11).

İller bazında Samsun'da hypodermosis seropozitifliği Ladik'de yüksek oranda saptanırken sırasıyla Kavak ve Vezirköprü'de hypodermosis seropozitifliği benzer oranlarda, Samsun merkezde ise seropozitiflik düşük bulunmuştur (P<0,01) (Tablo 11).

**Tablo 11.** Samsun ilçelerine göre hypodermosis seropozitifliğinin dağılımı

İlçe	Sığır Sayısı	Enfekte Sığır	
		n	%
<b>Kavak</b>	78	37	47,4
<b>Lâdik</b>	193	125	65,1
<b>Merkez</b>	13	1	7,1
<b>Vezirköprü</b>	28	13	46,4
<b>Toplam</b>	312	176	56,4

$\chi^2$ : 23,4; P<0,01

Sinop Erfelek'te hypodermosis seropozitifliği yüksek bulunmuştur ve ilçeler arasında istatistiksel olarak fark önemli bulunmuştur (P<0,01; Tablo 12).

**Tablo 12.** Sinop ilçelerine göre hypodermosis seropozitifliğinin dağılımı

İlçe	Sığır Sayısı	Enfekte Sığır	
		n	%
<b>Boyabat</b>	63	40	63,5
<b>Erfelek</b>	18	16	88,9
<b>Gerze</b>	16	10	62,5
<b>Saraydüzü</b>	20	14	70,0
<b>Merkez</b>	195	78	40,0
<b>Toplam</b>	312	158	50,6

$\chi^2$ : 27,4; P<0,01

Amasya’da hypodermosisin en yaygın olduğu ilçe Merkez ve Taşova olarak bulunurken, diğer ilçelerde daha düşük oranlarda kaydedilmiştir (P<0,01; Tablo 13).

**Tablo 13.** Amasya ilçelerine göre hypodermosis seropozitifliğinin dağılımı

İlçe	Sığır Sayısı	Enfekte Sığır	
		n	%
Merkez	158	72	45,6
Göynücek	26	6	23,1
Gümüşhacıköy	46	11	23,9
Merzifon	22	3	13,6
Suluova	26	8	30,8
Taşova	32	14	43,8
<b>Toplam</b>	<b>310</b>	<b>114</b>	<b>36,8</b>

$X^2$ : 16,76; P<0,01

Tokat ve ilçelerinde diğer illere göre hypodermosis düşük oranlarda saptanmıştır (Tablo 14). Hypodermosisin yayılışı yönünden ilçeler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0,01).

**Tablo 14.** Tokat ilçelerine göre hypodermosis seropozitifliğinin dağılımı

İlçe	Sığır Sayısı	Enfekte Sığır	
		n	%
Almus	34	10	29,4
Erbaa	39	1	2,6
Merkez	120	12	10,0
Turhal	66	1	1,5
Zile	55	5	9,1
<b>Toplam</b>	<b>314</b>	<b>29</b>	<b>9,2</b>

$X^2$ : 23,3; P<0,01

Ordu ve ilçelerinde hypodermosis en yüksek Aybastı (%51,9) ve Ordu Merkezde (%33,1) saptanmıştır. Diğer ilçelerde yayılış oranları düşük bulunmuştur

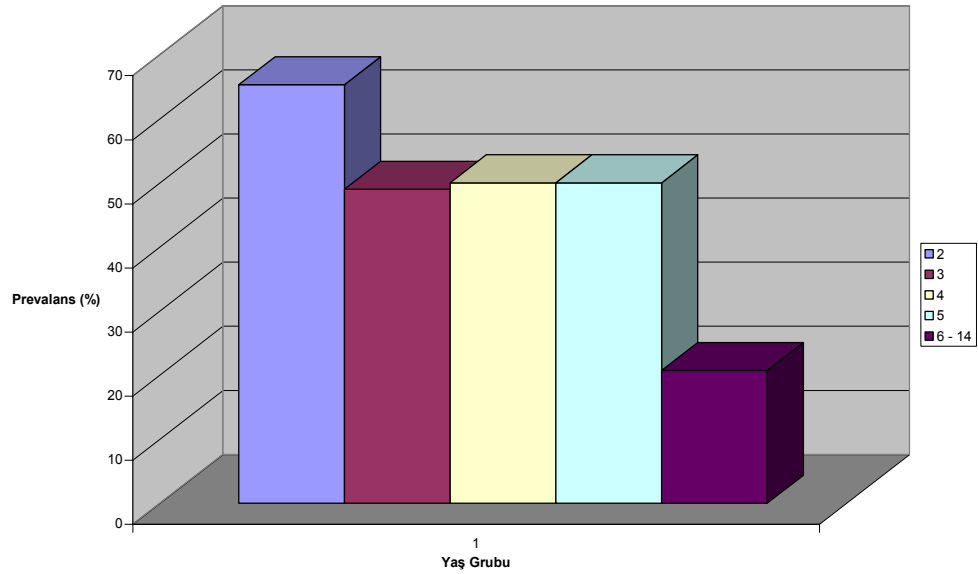
(Tablo 15). Ordu’da ilçeler arasında fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P<0,01$ ). Genel olarak çalışma alanına giren illerden Tokat’da hypodermosis düşük oranda seyrederken, Sinop, Samsun, Amasya ve Ordu illerinde yüksek oranlarda seropozitiflik saptanmıştır.

**Tablo 15.** Ordu ilçelerine göre hypodermosis seropozitifliğinin dağılımı

İlçe	Sığır Sayısı	Enfekte Sığır	
		n	%
Akkuş	13	0	7,7
Aybastı	27	14	51,9
Merkez	157	52	33,1
Perşembe	26	4	15,4
Ünye	89	2	2,2
<b>Toplam</b>	<b>312</b>	<b>72</b>	<b>23,4</b>

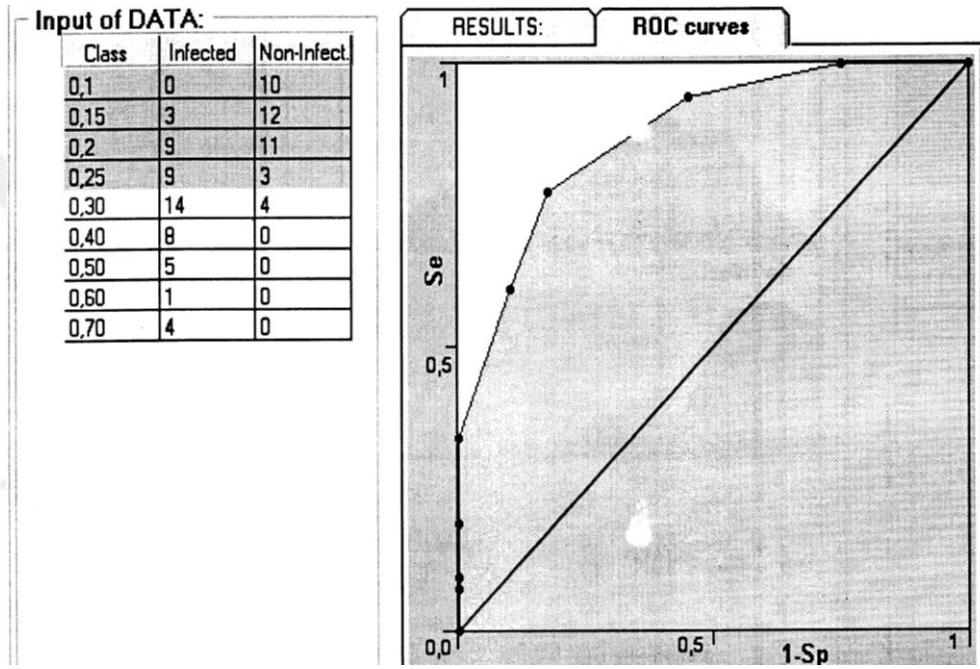
$X^2$ : 45,4;  $P<0,01$

Yaş gruplarına göre ise en yüksek prevalans 2 yaşlı sığırlarda saptanmıştır (Şekil 20)



**Şekil 20.** Yaş gruplarında hypodermosis seroprevalansı

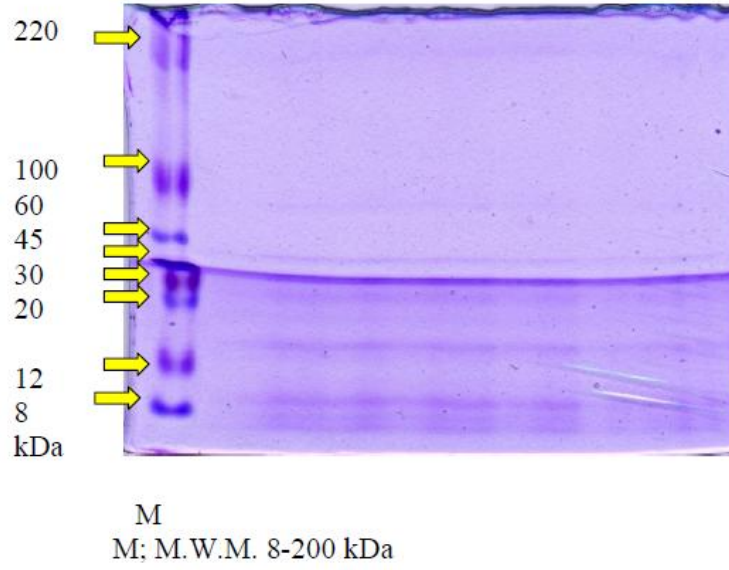
Diğer taraftan, Samsun Lâdik ilçesinde, seropozitif ve seronegatif sığırlarla, sırt derisi altında L<sub>3</sub> saptanan sığırlardan toplanan 93 süt serumunda karşılaştırmalı ELISA ile incelenmesi sonucu %61,3 (57) oranında seropozitiflik saptanmıştır. Süt serumlarının ROC analizinde cut-of OD'si 0,200'ün kabul edildiğinde %95 güven aralığında testin sensitivitesi %77,36 ve spesifitesi %82,50 olarak belirlendi. Sırt derisi altında L<sub>3</sub> saptanan sığırların ve 1,5-4 aylık 8 dananın tamamının kan serumlarında ELISA ile maternal antikor tespit edilmiştir (Şekil 21).



Şekil 21. Süt serumları için ROC analizi

#### 4.2.2. SDS-PAGE Bulguları

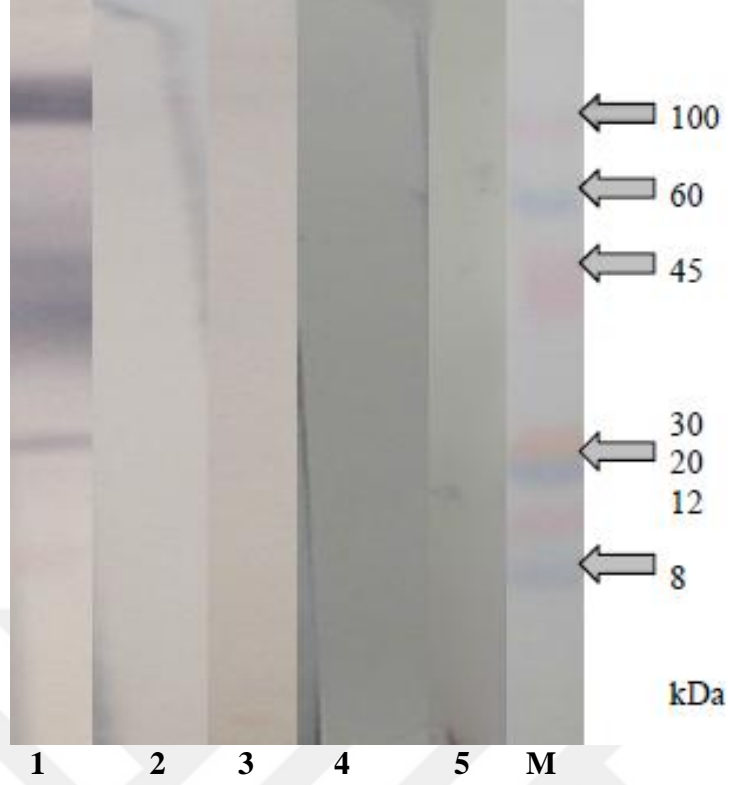
*Hypoderma bovis*'in üçüncü dönem larvalarından elde edilen antijenin SDS-PAGE yöntemi ile analizi ve coomassie blue ile yapılan boyaması neticesinde moleküler ağırlığı 8-220 kDa. arasında değişen farklı polipeptid protein bantları tespit edilmiştir (Şekil 22).



Şekil 22. SDS-PAGE ile *Hypoderma bovis* (L<sub>3</sub>) polipeptit protein bantları

#### 4.2.3. Western Blot Bulguları

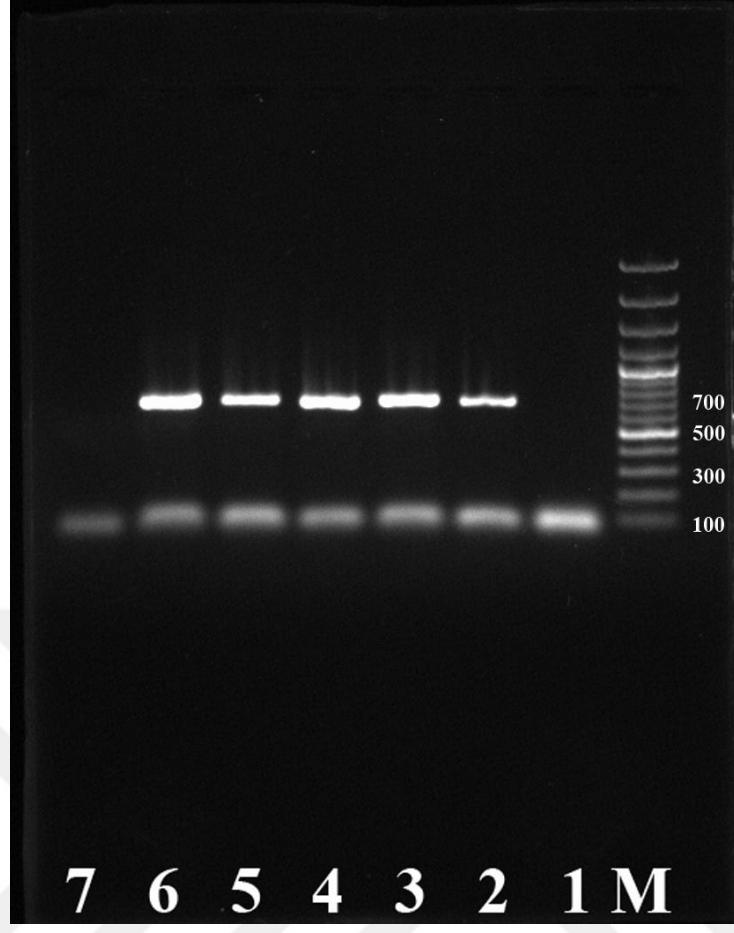
Hypodermosis yönünden, immunizasyon öncesi ve immünizasyon sonrası hiperimmun tavşan kan serumları, referans ve ELISA seropozitif ve seronegatif sığır serumları ile L<sub>3</sub> proteinlerinin transfer edildiği striplerde Western blot analizi yapılmış, sadece hiperimmun tavşan serumlarında moleküler ağırlığı 10-110 kDa arasında değişen 6 farklı polipeptid protein bandı (10, 30, 45, 50, 60, 110 kDa) tespit edilmiş, buna karşın diğer serumlarda protein bandı tespit edilememiştir (Şekil 23).



**Şekil 23.** Sığırlarda ve *Hypoderma bovis* (L<sub>2</sub> ve L<sub>3</sub>) ile immunize edilen tavşanlarda Western blot bulguları. 1; Hiperimmün tavşan serumu, 2; Negatif tavşan serumu, 3; Pozitif referans sığır serumu, 4-5; ELISA pozitif ve negatif sığır serumu, M;M.W. 8-200 (Sigma)

### 4.3. PCR ve Agaroz Jel Elektroforez Bulguları

DNA ekstraksiyonu sonucu elde edilen 77 örneğin *cox1* gen bölgeleri UEA7 ve UEA10 primerleri ile çoğaltıldıktan sonra %1'lik agaroz jel elektroforezde yürütüldü ve yaklaşık 688 bp büyüklüğünde bantlar elde edildi (Şekil 24).

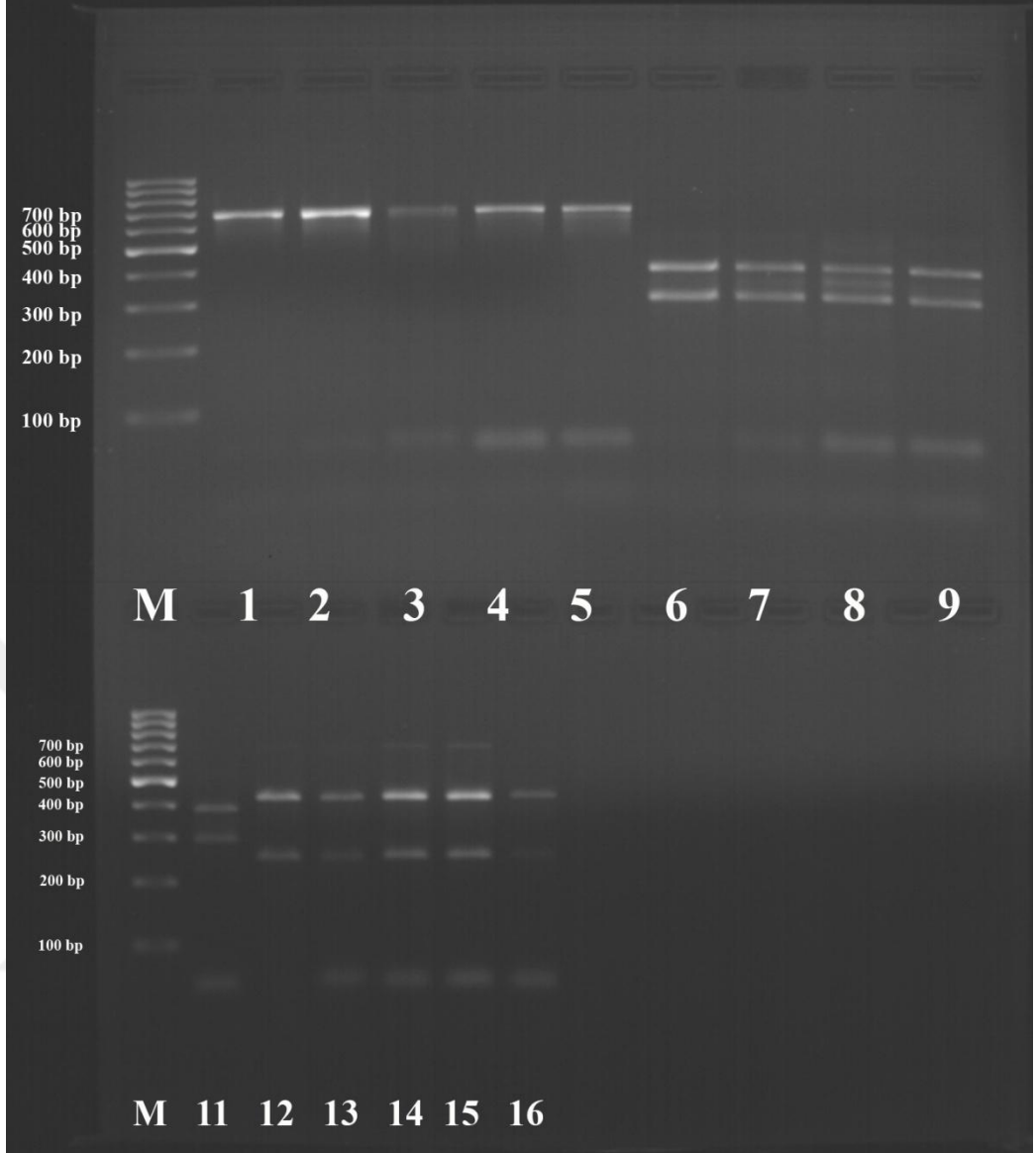


Şekil 24. *Hypoderma bovis* PCR görüntüsü (1 ve 7 Negatif kontrol, 2-6 *H.bovis*)

#### 4.4. RFLP Bulguları

Sitokrom Oksidaz I (mtDNA) geni PCR ürünleri BfaI, HinfI ve TaqI enzimleri ile kesme işlemi yapılmış olup, HinfI enzimi ile 300-388 bp, TaqI enzimi 250-438 bp büyüklükte bant profilleri gözlenmiştir. Ancak BfaI enzimi 77 örneğin PCR ürünlerini kesmediği görülmüştür. Örneklerin HinfI ve TaqI enzimleri ile kesilmeleri sonucu elde edilen bant profillerine göre tamamının *H. bovis* olduğu saptanmıştır (Şekil 25).





**Şekil 25.** *Hypoderma bovis* cox1 (mtDNA) geni PCR ürünlerinin RFLP görüntüsü (1-5 BfaI restriksiyon enzimi, 6-11 HinfI restriksiyon enzimi, 12-16 TaqI restriksiyon enzimi)

#### 4.5. DNA Dizi Analizi Bulguları

Dizi analizine gönderilen 77 PCR ürününün analiz sonuçlarından 8'i (Samsun 5, Sinop 1, Tokat 1, Amasya 1) ABI 3110X sekans cihazı tarafından sonuç vermediği için çalışmada kullanılmadı. Samsun 15, Sinop 13, Tokat 15, Amasya 16 ve Ordu için 11 örnek olmak üzere toplam 69 örneğin dizi analiz sonuçları ABI 3110X sekans cihazı tarafından düzgün okundu. İki yönlü dizi analiz sonuçlarının eşleştirilmesi sonucunda 574 bp uzunluğunda dizi elde edildi. Toplam 69 örneğin Blast analizleri

sonucunda *H. bovis* Elazığ (GU984810, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ve 19) izolatları ile %100 benzerlik gösterdi.

Samsun, Ordu, Amasya, Sinop ve Tokat izolatları Genbank'a kayıt edildi (Ek. 1, 2, 3, 4, 5). Samsun'a ait *H. bovis* izolatı Şekil 26'da gösterilmiştir.

```
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10          20          30          40          50          60
ctgtaccaac tggaattaa attttcagat gattagcaac tttacatgga acacaaatca
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          70          80          90          100          110          120
actactctcc tgcaacttta tgatctttag ggtttgtttt tttattttaca gttggaggat
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          130          140          150          160          170          180
taactggagt aatttttagct aattcatcta ttgatattat tttacatgat acatattatg
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          190          200          210          220          230          240
tagtagctca cttccattat gttttatcta taggagctgt atttgccatt atagctggat
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          250          260          270          280          290          300
tcattcattg atttcatta tttacaggat taacattaa tgttaaacta ttaaaaagcc
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          310          320          330          340          350          360
aatttgcat tatattttta ggagtaaatt taaccttttt ccctcaacac tttttaggg
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          370          380          390          400          410          420
tagctggcat acctcgacgt tattctgatt atccagatgc ttataccaca tgaaatgtaa
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          430          440          450          460          470          480
tttcaactat tggatcatca atttctcttt taagtatttt attattttota tttattattt
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          490          500          510          520          530          540
gagaaagatt actatcacia cgacaagtat tatttcttat ccaattaat tcatcaattg
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          550          560          570          580
aatgattaca aaatacacca ccctctgaac actc
```

Şekil 26. *Hypoderma bovis* Samsun izolatı (KF926088).

## 5. TARTIŞMA

Dünyada sığır hypodermosisi et, süt veriminin düşmesi yanında özellikle dericilik sanayinde büyük ekonomik kayıplara neden olması bakımından oldukça önemli bir paraziter hastalıktır (Bishopp ve ark., 1926; Collins, 1970; Khan ve ark., 2006). Türkiye’de hayvancılık sektöründe sığır yetiştiriciliği önemli bir yer tutmaktadır. Hypodermosis ülkemizde de sığır yetiştiriciliğinde ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Kurtpınar, 1947; Merdivenci, 1963; Çiçek ve ark., 2011).

Dünyada epidemiyolojik ve klinik gözlemlere dayanan çalışmalarda sığır hypodermosisi Pakistan’da %18,4 (Ahmed ve ark., 2012), İspanya’da %19,54 (Moreno ve ark., 1994), Kuzey Afrika’da Cezayir’de %76 (Benakhla ve ark., 1999) oranlarında kaydedilmiş, Moreno ve ark. (1994) İspanya’da ELISA ile yaptıkları serolojik çalışmada %42,3 oranında seropozitiflik saptamışlardır.

Çin’de yapılan bir çalışmada (Guan ve ark., 2005), Çin’in farklı bölgelerinde *Hypoderma* spp. enfestasyonunu Xinjiang’da %51, İç Moğolistan’da %27, Heilongjian’da %13, Jiling’de %6 ve Gansu’da %44 oranlarında saptanmıştır. Hypodermosis ile ilgili İtalya’da yapılan başka bir çalışmada %43,3 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir (Regalbono ve ark., 2003). Kanada’da iki büyük çiftlikte yapılan bir çalışmada hypodermosis’in seroprevalansı paraziter sağaltım yapılan çiftlikte %8-73,3, sağaltım uygulanmayan çiftlikte %76,5-99 oranında saptanmıştır (Colwell, 2006). Haine ve ark. (2004), Belçika’da 390 sığır sürüsü üzerinde yaptıkları incelemede *Hypoderma* spp. enfestasyonunu %48,7 olarak tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada’da *H. bovis* türü tespit edilmiş ve hypodermosisin Orta Karadeniz Bölgesi’nde seroprevalansı %35,2 olarak saptanmıştır. Bu oran Avrupa ve Asya’da saptanan oranların bazılarında düşük bulunmakla birlikte, diğer çalışmalarla benzer şekilde kaydedilmiştir.

Türkiye’de yapılan klinik ve mezbaha çalışmalarında; Sayın ve ark. (2000), *Hypoderma* spp. larvalarının %86’sını *Hypoderma bovis*, %14’nü *Hypoderma*

*lineatum*'un oluşturduğunu, bu iki türün yayılışını, sırasıyla Karadeniz Bölgesi'nde %91, %9; Marmara'da %81, %19; Ege'de %68, %32; Akdeniz'de %83, %17; İç Anadolu'da %93, %7; Doğu Anadolu'da %97, %3 ve Güneydoğu Anadolu'da %80, %20 olarak bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada, meradaki sığırlar üzerinde *Hypoderma* enfestasyonu Karadeniz Bölgesi'nde %28,1, Marmara Bölgesi'nde %28,0, Ege Bölgesi'nde %41,6, Akdeniz Bölgesi'nde %33,0, İç Anadolu Bölgesi'nde %38,9, Doğu Anadolu Bölgesi'nde %41,9, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde %47,8 olduğu bildirilmiştir. Celep ve Gürsoy (1987) Samsun ile Amasya yöresinde yaptıkları çalışmada *Hypoderma* enfestasyonlarını klinik olarak %55-57,8 arasında saptamışlardır. Sığır hypodermosisini; Karatepe ve Karatepe (2008) Niğde yöresinde %5,1, Kara ve ark. (2005) Kars yöresinde %31,9, Gülanber ve ark. (2002) Trakya'da %3,56, Taşçı ve ark. (1994) ile Özdal ve Değer (2005) Van yöresinde sırasıyla %65 ve %35,8 oranında tespit etmişlerdir. Serolojik çalışmalarda Türkiye'de bugüne kadar yapılan çalışmalarda da hypodermosis'in sığırlarda yaygın olduğu ve yaygınlık oranlarının Kasım-Şubat aylarında %5-68 arasında değiştiği belirtilmiştir (Kara ve ark., 2005; Şimşek ve ark., 2005). Diğer serolojik çalışmalarda, Özkutlu ve Sevgili (2005) Şanlıurfa yöresinde hypodermosis'i %38,6, Şimşek ve ark. (2005) Elazığ'da %26,3, Malatya'da %22,3, Diyarbakırda %22,1 oranlarında tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada ise Orta Karadeniz Bölgesi'nde %35,2 seropozitiflik saptanmış olup, illere göre seroprevalans oranları Samsun'da %56,4, Sinop'ta %50,6, Amasya'da %36,8, Ordu'da %23,1 ve Tokat'ta %9,2 olarak tespit edilmiştir. Samsun, Sinop ve Amasya'da saptanan seropozitiflik oranları, Elazığ, Malatya, Diyarbakır ve Şanlıurfa'daki yayılış oranlarından daha yüksek, Tokat'ta bu illere göre daha düşük, Ordu'da ise benzer oranlarda seropozitiflik saptanmıştır. İllere göre saptanan farklı seropozitiflik oranları, yetiştirme yöntemlerine, mera kullanımına, hayvan popülasyonunun sayısına, aylık ortalama yağış miktarının ve nem oranının farklılığına ve aylık ortalama sıcaklıkların sonbahar ve kışın düşük seyretmesine bağlı olabilir (Şekil 11,12,13).

Her ilde seropozitifliğin saptanması hypodermosisin bölgede artropoda bağlı endemik bir enfestasyon olduğunu göstermekle birlikte, her alanda homojen olmayan

birbirinden çok farklı dağılım göstermektedir. Bunlardan süt sığırlarının meraya dayalı beslenmesi, entansif besicilik, sağmal hayvanlara insektisit uygulamamak veya illere göre topraktaki nem oranlarının farklı olması gibi birçok nedeni olabilir. Birde geniş populasyonlar halinde merada otlayan hayvanlar, küçük gruplara göre hypodermosis yönünden daha fazla risk altındadır (Haine ve ark., 2004)

Bu çalışmanın sonuçları iller bazında değerlendirildiğinde Hypodermosisin Lâdik, Kavak ve Vezirköprü'de Samsun merkezden daha yüksek seyretmesi, rakım farkı, bitki örtüsü, mera kullanımının merkezde az olması ve sığır populasyonunun azlığı ile ilişkilendirilebilir. Aynı şekilde Sinop Erfelek ve ilçelere göre saptanan farklı yayılış oranlarının çevre ısı, nem, toprak kullanımı (tarım arazisi, mera, orman arazisi) ve sığırların beslenme şekli kaynaklanabileceği sonucuna varılmış, Tokat'da genel olarak düşük seyretmesinin ise daha çok ekili tarım alanlarının olması, orman, mera, çalılık alanların az olması ve çevre ısısının kış mevsiminde diğer illere göre daha düşük olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir (Şekil 11).

Moreno ve ark. (1994) İspanya'da ELISA ile yaptıkları serolojik çalışmada enfeste hayvanlarda hypodermosis'e karşı biri Şubat-Mart, diğeri Eylül'de olmak üzere iki dönemde oluşan antikorların maksimum düzeyde olduğunu tespit etmişlerdir. Cencek ve Ziomko (2002) tarafından Polonya'da yapılan bir çalışmada Mart, Nisan ve Mayıs aylarının hypodermosis yönünden en iyi örnek toplama zamanı olduğu ortaya konulmuştur. Kanada'da yapılan bir çalışmada (Colwell ve Baron, 1990) en erken enfestasyondan 6 hafta sonra antikor tespit edildiği, 37-43 haftalar arasında antikorların pik yaptığı bildirilmiştir.

Bu çalışmada L<sub>3</sub>'lerin Mayıs-Haziran aylarında toprağa düşmesi nedeniyle Orta Karadeniz Bölgesi'nde serolojik çalışmalarda örnek toplama zamanı olarak ilkbahar döneminin uygun olduğu düşünülmektedir.

İtalya'da yapılan bir çalışmada ELISA ile 32 pastörize süt örneğinin 23'ü pozitif olarak bulunmuştur (Otranto ve ark., 2001). Yine aynı ülkede başka bir çalışmada Regalbono ve ark. (2003), 224 çiftlikte süt örneklerinin %43,3'ünü

seropozitif olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada Samsun Ladik ilçesinden toplanan 93 süt örneğinin 57'si (%61,3) seropozitif olarak tespit edilmiş, ayrıca sırt derisi altında L<sub>3</sub> larvası saptanan sığırlardan doğan 1,5-2 aylık 8 dananın hepsinin kan serumunda ELISA ile seropozitiflik saptanmıştır.

Şimşek ve ark. (2005) yapmış oldukları bir çalışmada *H. bovis*'in üçüncü dönem larvalarından elde edilen antijenlerin SDS-PAGE analizleri sonucunda 6-66 kDa arasında değişen 11 farklı polipeptid bandı tespit etmişlerdir. Colwell (2011), *H. lineatum* L<sub>3</sub>'lerinden yaptıkları SDS-PAGE analizinde de 10-150 kDa arasında protein bantları tespit etmiştir.

Bu çalışmada *H. bovis*'in üçüncü dönem larvalarının SDS-PAGE analizinde 8-200 kDa arasında değişen 8 farklı polipeptid bandı tespit edilmiştir. *Hypoderma bovis*'in birinci dönem larvalarından hazırlanan Hypodermin A antijenlerinin elektroforetik analizinden elde edilen 22-24 kDa'luk bantların antijenik özelliğinin sığır serumlarında *Hypoderma* spp. antikorlarının tespitinde yüksek oranda olduğu yapılan Western blot çalışmalarıyla ortaya konulmuştur (Cencek ve Ziomko, 2002). Bu çalışmada ise *H. bovis*'in üçüncü dönem larvalarından elde edilen antijenlerle immünize edilen tavşanların Western blot ile analizinde 10, 30, 45, 50, 60, 110 kDa'luk bantlar elde edilmiş olmakla birlikte, bu antijenlerin sığır serumlarında *Hypoderma* spp. enfestasyonları yönünden antijenik özelliğe sahip olmadığı ortaya konulmuştur.

Otranto ve ark. (2003a,b; 2006), *Hypoderma* spp. türlerinin identifikasyonunda BfaI, HinfI, TaqI restriksiyon enzimleri ile PCR-RFLP tekniği kullanmışlardır. Bu çalışmada, *H. bovis* HinfI enzimi ile 300-388 bp, TaqI enzimi 250-438 bp büyüklükte bant profilleri gözlenmiştir. Bu bant profilleri Otranto ve ark. (2003a) tarafından belirtilen şekilde *H. bovis*'e ait olan bant profilleri ile benzerlik göstermiştir. Bu çalışmada da larvaların PCR ürünlerinin Otranto ve ark. (2003a)'nın belirttikleri gibi BfaI ile *H. bovis*'i kesmediği, TaqI ve HinfI ile *H. bovis*'i kestiği gözlenmiştir. Yapılan RFLP sonuçlarına göre toplanan 77 larvanın tamamı *H. bovis* olarak tespit edilmiştir.

Moleküler olarak Balkaya ve ark. (2010) 10 larvanın mikroskopik olarak 7'sini *H. bovis*, 3'ünü *H. lineatum* olarak teşhis etmelerine rağmen, DNA dizi analizi sonuçlarında 10 larvanın tamamının *H. bovis* olduğu görülmüştür. Oğuz (2013) ise moleküler olarak RFLP analizinde *H.bovis* ve *H. lineatum* türlerini tespit ettiklerini bildirmiştir. Bu çalışmada DNA dizi analizi sonuçlarının hepsi *H. bovis* olarak saptanmış ve bu durum stereomikroskopik ve RFLP çalışma sonuçları ile uyumluluk göstermiştir. Kullanılan toplam 69 örneğin Blast analizleri sonucunda *H. bovis* Elazığ (GU984810, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ve 19) izolatları ile %100 benzerlik gösterdiği görülmüştür. Bu çalışmada belirlenen *H. bovis* dizinleri ile Otranto ve ark. (2003a)'nın saptadığı *H. bovis* dizinleri nükleotid bazında karşılaştırılması sonuçlarına göre ve GenBank'ta kayıtlı (AF497761) izolatu ile 329-330. nükleotit'de T→C şeklinde iki, 335. nükleotit'de C→A ve 341. nükleotit'de C→T şeklinde 4 nükleotit değişimi saptanmıştır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Türkiye’de ve Orta Karadeniz Bölgesi’nde hypodermosise karşı yeterli sayıda serolojik ve moleküler çalışma olmadığından, enfestasyonun durumu ve türlerin moleküler düzeyde belirlenmesi yapılacak çalışmalara yol göstermesi bakımından önemlidir. Bu çalışma ile Orta Karadeniz Bölgesi’nde sığır hypodermosisinin hala yaygın olarak devam etmekte olduğu ELISA ile serolojik olarak ortaya konmuştur.

Bu çalışma, Orta Karadeniz Bölgesi’nde tür teşhisi bakımından moleküler olarak yapılan ilk çalışma olmuştur. Karadeniz Bölgesi’nde yapılan bir çalışmada (Sayın ve ark. 2000), sığır hypodermosisine *H. bovis* ve *H. lineatum*’un neden olduğu bildirilmiş, ancak bu çalışmada mikroskopik ve moleküler bakıda yalnızca *H. bovis* tespit edilmiştir. Bu çalışmada *H.bovis*’in yaygın bulunması bu türün spinal kanala göç etmesi nedeniyle paraziter ilaçlama zamanlarının önemli olduğu, *H. bovis*’in biyolojisine uygun olarak Orta Karadeniz Bölgesi’nde sonbahar ilaçlamalarının Ekim-Kasım, ilkbahar ilaçlamalarının ise Mart-Nisan ayları arasında yapılmasının uygun olacağı ve hypodermosisin erken teşhisinde ve prevalansının belirlenmesinde ELISA tekniğinin kan ve süt serumlarında uygulanmasının önemli olduğu görülmüştür.

Türkiye’de mikroskopik olarak *H.bovis* ve *H. lineatum* değişik oranlarda bildirilmekle birlikte, Elazığ yöresinde ve bu çalışmada Orta Karadeniz Bölgesi’nde moleküler analizlerde sadece *H.bovis* saptanması ülke genelinde hypodermosisin hangi türe bağlı olarak yayılış gösterdiğinin, yapılacak moleküler çalışmalar ile ortaya konması epidemiyolojik bakımdan önemli olacaktır. Hypodermosisin doğru teşhis edilmesinde mikroskopik teşhisin yanı sıra tanıyı doğrulayıcı yöntem olarak moleküler teşhis tekniklerinden faydalanılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.

Diğer taraftan Türkiye’de sığır hypodermosisine neden olan türlerin yayılışının serolojik ve moleküler yöntemlerle ortaya konması, hastalıkla mücadele ve kontrolü bakımından önemlidir.



## KAYNAKLAR

- Ahmed H, Khan MR, Fontan RP, Sandez CL, Iqbal MF, Naqvi SMS, Qayyum M. Geographical distribution of hypodermosis (*Hypoderma* sp.) in Northern Punjab, Pakistan. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 18 (Suppl-A): 2012, A215-A219.
- Altıntaş N, Yolasığmaz A. Proteinlerin analizi ve SDS-PAGE: Özcel MA, Altıntaş N. Ed. Parazit Hastalıklarında Tanı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 15,1997, 321-341.
- Alicata J.E. Parasitic infections of man and animals in Hawaii. Hawaii Agricultural Experiment Station Technical Bulletin No 61, Honolulu, Hawaii, 1964; 138.
- Amici RR. 2006. Historical Perspectives on the Importance and Impact of Oestrids In:Eds.Colwell, D. D.; Hall, M. J. R.; Scholl, P. J. Oestrid Flies : Biology, Host-Parasite Relationships, Impact and Management. Wallingford, Oxfordshire, GBR: CABI Publishing, 2006; 8-19.
- Anderson JR, Nilssen AC. Trapping oestrid parasites of reindeer: the response of *Cephenemyia trompe* and *Hypoderma tarandi* to baited traps. *Med Vet Entomol.* 1996; 10, 337– 346.
- Anderson JR. Adult Biology. In:Eds.Colwell, D. D.; Hall, M. J. R.; Scholl, P. J. Oestrid Flies : Biology, Host-Parasite Relationships, Impact and Management. Wallingford, Oxfordshire, GBR: CABI Publishing, 2006; 10, 140-166.
- Anonim A map of human mitochondrial DNA indicating diabetes-associated mutations.2013.  
[http://www.nature.com/nature/journal/v414/n6865/fig\\_tab/414807a\\_F1.html](http://www.nature.com/nature/journal/v414/n6865/fig_tab/414807a_F1.html)  
09.10.2013.
- Anonim Meteoroloji Bölge Müdürlüğü. Samsun.  
<http://www.mgm.gov.tr/> 2014.
- Anonim Türkiye İstatistik Kurumu.  
<http://www.tuik.gov.tr> 2014.
- Asbakk K, Oksanen A, Nieminen M, Haugerud RE, Nilssen AC. Dynamics of antibodies against hypodermin C in reindeer infested with the reindeer warble fly, *Hypoderma tarandi*. *Vet Parasitol.* 2005; 129 (3-4): 323-332.
- Azizi H, Pourfajar M, Darabi S, Assadian F, Kahkesh F. A survey of seasonal infestation with *Przhevalskiana* larvae in slaughtered goats and sheep in South-Western Iran. *Pak J Biol Sci.* 2007, 1;10 (219): 3940-3943.

- Balkaya İ, Simsek S, Saki CE. A serological and molecular survey of cattle hypodermosis in east-Turkey. *Vet Parasitol* 2010; 173: 287-291.
- Barnard PC. The Royal Entomological Book Society of British Insects. Royal Entomological Society Book of British Insects. Hoboken, NJ, USA: Wiley-Blackwell, 2011; 397.
- Baron RW, Weintraub J. Immunization of cattle against hypodermatosis *Hypoderma lineatum* (DeVill.) and *H. bovis* (L.) using *H. lineatum* antigens. *Vet Parasitol* 1986;21, 43– 50.
- 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 monophosphoryl lipid A (MPL). *Vet Parasitol.* 1991; 38 (2-3): 185-197.
- Barquet P, Chabaudie N, Nicolas, Boulard C. Action des mines, enzymes sécrétées par l'adulte (Insecte, Oestridae) sur l'expression des neutrophiles. *Vet Res.* 1993; 24, 364.
- Beesley WN. Observations on the biology of the ox warble-fly (*Hypoderma*: Diptera, Oestridae) V. Anaphylactoid shock in laboratory animals and calves following exposure to extracts of larvae of *Hypoderma*. *Ann Trop Med Parasitol.* 1971, 65: 567-572
- Benakhla A, Losson B, Lonneux JF, Boulard C, Benouareth D. Comparative efficacy of different insecticides in the treatment of cattle hypodermosis in north-eastern Algeria. *Vet Res.* 1998, 29(1): 21-29.
- Benakhla A, Lonneux JF, Mekroud A, Losson B, Boulard C. Bovine hypodermosis in north-eastern Algeria: prevalence and intensity of infestation. *Vet Res.* 1999, 30 (5): 539-545.
- Benz GW. Animal health ivermectin. *Southwestern Entomologist*, 1985, Suppl. 7, 43– 50.
- Bishopp FC, Laake EW, Brundrett HM Wells RW. The cattle grubs or ox warbles, their biologies and suggestions for control. United States Department of Agriculture Bulletin No. 1369, Washington, DC. 1926; 119.
- Blagoveshchensky DI. The discovery of *Trichopria* sp. (Insecta: Hymenoptera) in the puparia of *Hypoderma bovis* De Geer. *Parazitology.* 1970; 4, 265– 266 . (Abstract: *Revi Appl Entomol.* B 60, 1745, 1972.)
- Boldbaatar D, Xuan X, Kimbita E, Huang X, Igarashi I, Byambaa B, Battsetseg B, batur B, Battsetseg G, Batsukh Z, Nagasawa H, Fujisaki K, Mkami T. Detection of antibodies to *Hypoderma lineatum* in cattle by Western blotting with recombinant hypodermin C antigen. *Vet Parasitol.* 2001, 99 (2): 147-54.

- Boulard C, Weintraub J. Immunological responses of rabbits artificially infested with the cattle grubs *Hypoderma bovis* and *H. lineatum*. *Int J Parasitol.* 1973; 3, 379–386.
- Boulard C. Modifications histologiques de la sous-muqueuse oesophagienne de bovins parasités par *Hypoderma lineatum* (De Vill.) (Diptera Oestriforme). *Anal Rech Vét.* 1975; 6, 131–42
- Boulard C, Garrone R. Characterization of a collagenolytic enzyme from larvae of *Hypoderma lineatum* (Insecta: Diptera: Oestriform). *Comparative Biochem Physiol.* 1978; 59, 251–255.
- Boulard C, Thornberry H. Warble Fly Control in Europe (Symposium on Warble Fly Control in Europe Brussels, 16-17 Sept. 1982) A.A.Balkema, Rotterdam, Boston, 1984; 155
- Boulard C, Bencharif F. Changes in the haemolytic activity of bovine serum complement by *Hypoderma lineatum* larval proteinases in naive and immune cattle. *Parasite Immunol.* 1984; 6, 459–467
- Boulard C. Advantages of the immunodiagnosis of bovine hypodermosis established by passive hemagglutination and by ELISA, using serum and lactoserum, over the warble count, *Ann Rech Vet.* 1985, (4), 335–343.
- Boulard C, Villejoubert C. Use of pooled serum of milk samples for the epidemiological surveillance of bovine hypodermosis. *Vet Parasitol* 1991; 39: 181-183.
- Boulard C, Villejoubert C, Moire N, Losson B, Lonneux JF. Sero-surveillance of hypodermosis in a herd under therapeutic control. Effect of a low level of infestation. *Vet Parasitol.* 1996; 66, 109–117.
- Boulard C, Banting AL, Cardinaud B. Activity of moxidectin %1 injectable solution against first instar *Hypoderma* spp. in cattle and effects on antibody kinetics. *Vet Parasitol.* 1998; 77: 205-210
- Boulard C. Durably controlling bovine hypodermosis. *Vet Res.* 2002, 33(5): 455-464.
- Boulard C. Larval-Host Parasite Relationship Part A: *Hypodermatinae* host-parasite interactions. In: Eds. Colwell, D. D.; Hall, M. J. R.; Scholl, P. J. *Oestrid Flies : Biology, Host-Parasite Relationships, Impact and Management.* Wallingford, Oxfordshire, GBR: CABI Publishing, 2006; 11: 167-179.
- Boulard C, Alvinerie M, Argente G, Languille J, Paget L, Petit E. A successful, sustainable and low cost control- programme for bovine hypodermosis in France. *Vet Parasitol.* 2008; 158 (1-29): 1-10.

- Breyev KA. Some general principles of the control of parasitic arthropods as exemplified by the control of warble flies. *Entomol Rev.* 1973;52, 142–151.
- Breyev KA, Karazeeva ZF. Materials relating to the biology of the warble fly (*Oedemagena tarandi* L). III. Observations on the pupa and adult flies. *Parazitologiceskij Sbornik Akademija Nauk SSSR Moskva Zoologiceskij muzei.* 1957; 17: 199–228 .
- Brown FG. Toxicological hazards in warble fly eradication programmes. *Vet Parasitol.*, 1977; 3: 265–270.
- Casais R, Martin Alonso JM, Boga JA, Para F. *Hypoderma lineatum*: expression of enzymatically active hypodermin C in *Escherichia coli* and its use for the immunodiagnosis of hypodermosis. *Exp Parasitol.* 1998; 90(1): 14-9.
- Celep A, Gürsoy S. Samsun ve Amasya yöresi sığırlarında hypodermosis'in yayılış nispeti, nokra larvalarının dönemlerine göre sığırlarda kalış zaman ve sürelerinin tespitine dair araştırmalar. *Etlik Vet Mikrob Derg.* 1987; 6(1),143-150.
- Celep A, Açıcı M, Çetindağ M, Gürbüz İ. Samsun yöresi sığırlarında paraziter epidemiyolojik çalışmalar. *Etlik Vet Mikrob Derg.*, 1994; 7(5),153-162
- Cencek T, Ziomko I. Optimal time for serologic diagnosis regions of Poland. *Bull. Vet İns Pulawy.* 2002;46:59-63.
- Chabaudie N, Villejoubert C, Boulard C. The response of cattle vaccinated with hypodermin a to a natural infestation of *Hypoderma bovis* and *Hypoderma lineatum*. *Ins J Parasitol.* 1991; 21(7): 859-862.
- Chabaudie N, Boulard, C. Effect of hypodermin A, an enzyme secreted by *Hypoderma lineatum* (Insect Oestridae), on the bovine immune system. *Vet Immunol Immunopathol.* 1992; 31, 167–177.
- Cogley TP, Anderson JR, Weintraub J. Ultrastructure and fonction of the attachment organ of warble fly eggs (Diptera:Oestridae: Hypodermatinae). *Int J Insect Morphol Embriol.* 1981;10:7-18
- Collins RC. The ecology and economic effects of cattle grub (*Hypoderma* sp.) infestations in native Arizona range cattle. 1970, University Microfilms, A Xerox Company, Ann Arbor, Michigan, Ph.D. Thesis. University of Arizona.
- Chamberlain WF, Scholl PJ. New procedures to enhance survival of third instar *Hypoderma lineatum* (Villers) (Diptera: Oestridae) in artificial media. *J Med Entomol.* 1991, 28:266–269.

- Cicek H, Cicek H, Eser M, Tandogan M, Sarimehmetoglu HO. Prevalence and economic significance of bovine hypodermosis in Afyonkarahisar province of Turkey. *Trop Anim Health Prod* 2011; 43:17–20 Doi 10.1007/S11250-010-9693-0.
- Colebrook E, Hall R. Ectoparasites of livestock in Europe and the Mediterranean region. *Vet Parasitol.* 120, 2004; 251–274.
- Colwell DD. Host– parasite relationships and adaptations to parasitism of first instar cattle grubs, *Hypoderma bovis* (L.) and *H. lineatum* (Vill.). PhD thesis, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. 1989; 257.
- Colwell DD, Baron RW. Early detection of cattle grub (*Hypoderma lineatum* and *H. bovis*) (Diptera; Oestridae) using ELISA. *Med Vet Entomol.* 1990;4(1):35-42.
- Colwell DD. Cattle Grubs: Biology and Control. Agriculture Canada Publication 1880/E, Ottawa, 1992; 17.
- Colwell DD, Berry NM. Tarsal sensilla of the warble flies *Hypoderma bovis* and *H. lineatum* (Diptera: Oestridae). *Annals Entomol Soc America.* 1993; 86,756–765.
- Colwell DD. Persistence of cattle grubs (Diptera: Oestridae) on a Canadian ranch with long-term, continuous therapeutic control. *Vet Parasitol.* 2000; 94:127-132.
- Colwell DD, Jacobsen JA. Persistent activity of topical ivermectin against *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Vet Parasitol.* 2002; 105:247–256.
- Colwell DD, Otranto D. Cross-transmission studies with *Hypoderma lineatum* de Vill. (Diptera: Oestridae): Attempted infestation of goats (*Capra hircus*). *Vet Parasitol.* 2006;141:302-306.
- Colwell DD. Life cycle strategies. In:Eds.Colwell, D. D.; Hall, M. J. R.; Scholl, P. J. *Oestrid Flies : Biology, Host-Parasite Relationships, Impact and Management.* Wallingford, Oxfordshire, GBR: CABI Publishing, 2006a; 5:67-77.
- Colwell DD. Egg morphology. In:Eds.Colwell, D. D.; Hall, M. J. R.; Scholl, P. J. *Oestrid Flies : Biology, Host-Parasite Relationships, Impact and Management.* Wallingford, Oxfordshire, GBR: CABI Publishing, 2006b; 7: 93-97.
- Colwell DD. Larval morphology. In:Eds.Colwell, D. D.; Hall, M. J. R.; Scholl, P. J. *Oestrid Flies : Biology, Host-Parasite Relationships, Impact and Management.* Wallingford, Oxfordshire, GBR: CABI Publishing, 2006c; 8: 98-123.
- Colwell DD, Hall MJR, Scholl PJ. A synopsis of the biology hosts, distribution, disease significance and management of the genera. In:Eds.Colwell, D. D.; Hall, M. J. R.; Scholl, P. J. *Oestrid Flies : Biology, Host-Parasite Relationships, Impact and Management.* Wallingford, Oxfordshire, GBR: CABI Publishing, 2006; 14: 220-303.

- Colwell DD. Hidden antigens from third instar *Hypoderma lineatum*: Impact of immunization on larval survival in artificial infestations. *Vet Parasitol.* 2011; 175, 313–319
- Dacal V, Colwell DD, Lopez C, Perez V, Vazquez L, Cienfuegos S, Diaz P, Morrondo P, Diez-Banos 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.
- Dik B. Veteriner Entomoloji. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları. Konya. 2013; 133-142.
- Diñer Ş. İnsan ve Hayvanlarda Myiasis: Özcel MA, Daldal N. Ed. Parazitoloji'de Artropod Hastalıkları ve Vektörler. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 13, 1997; 169-234.
- Drummond RO. Effectiveness of ivermectin for control of arthropod pests of livestock. *Southwestern Entomologist.* 1985; Suppl. 7: 34–42.
- Eldrige BF, Edman JD. *Medical Entomology.* Kluwer Academic Publishers Dordrecht/Boston/London, 2004; 141-142.
- Fisher W, Pruett JH, Howard VM, Scholl PJ. Antigen-specific lymphocyte proliferative responses in vaccinated and *Hypoderma lineatum*-infested calves. *Vet Parasitol.* 1991; 40:135-145.
- Giangaspero A, Alvinerie M, Traversa D, Paoletti B, Lespine A, Otranto D, Boulard C. Efficacy of injectable and pour-on microdose ivermectin in the treatment of goat warble fly infestation by *Przhevalskina silenus* (Diptera, Oestridae). *Vet Parasitol.* 2003; 4: 333-343.
- Gingrich RE. Acquired resistance to *Hypoderma lineatum*: comparative immune response of resistant and susceptible cattle. *Vet Parasitol.* 1982;233–242.
- Graham OH. The use of animal systemic insecticides to control the common cattle grub *Hypoderma lineatum* (de Villers). UMI Number: DP 16606. Thesis, ProQuest LLC. USA. 2009; 145.
- Gregson JD. Recent cattle grub life-history studies at Kamloops, British Columbia and Lethbridge, Alberta. *Proceedings of the 10th International Congress of Entomology Montreal, 1958; 3: 725–734.*
- Guan G, Luo J, Ma M, Yang D, Wang Y, Gao J, Sun H, Liu Z, Liu A, Dang Z, Boulard C, Yin H. Sero- epidemiological surveillance of hypodermosis in yaks and cattle in North China by ELISA. *Vet Parasitol.* 2005; 129 (1-2): 133-137.

- Gülanber A, Tüzer E, Gargılı A, Toparlık M, Efil İ, Keleş V, Ulutaş M. Trakya'da mezbahada kesilen sığırlarda Hypodermosis. Tr J Vet Anim Sci. 2002;24:429-430.
- 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(1-2): 93-104.
- Harwood RF, James MT. Entomology in Human and Animal Health, 7th edition. Macmillan, New York, 1979; 548.
- Hearle E. Insects and Allied Parasites Injurious to Livestock and Poultry in Canada. Canadian Department of Agriculture, Canada, Publication, 1938; No 604, 108.
- Hendrickx WML, Jansen J, Vries TJ, DeVries TJ. A *Hypoderma diana* (Diptera: Hypodermatidae) infection in a horse. Vet Quarter. 1989; 11, 56–57.
- Hendrickx MO, Anderson L, Boulard C, Smith DG, Weatherley AJ. Efficacy of doramectin against warble fly larvae (*Hypoderma bovis*). Vet Parasitol. 1993; 49: 75–84.
- Holste JE, Colwell DD, Kumar R, Lloyd JE, Pinkall NPM, Sierra MA, Waggoner JW, Langholff WK, Barrick RA, Eagleson JS. Efficacy of eprinomectin against *Hypoderma* spp. in cattle. Am J Vet Res. 1998; 59:56-58.
- Hunter FF, Adserballe CF. Cuticular structures on the antennae of *Hypoderma bovis* De Geer (Diptera: Oestridae) females. Int J Insect Morphol Embryol 1996; 25:173–181.
- Kalelioğlu M, Aktürk G, Aktürk F, Komşuoğlu S, Kuzeyli K, Tiğın Y, Karaer Z, Bingöl R. Intracerebral myiasis from *Hypoderma bovis* larva in a child, Case report, J Neurosurg 1989; 71: 929-931.
- Kalkan A. Hypodermosisin hayvan endüstrisinde sebep olduğu kayıplar. Etlik Vet Bakteriyol Der. 1963; 2: 30–37.
- Kara M, Arslan MO, Gıcık Y. The prevalence of bovine hypodermosis in Kars province, Turkey. Trop Anim Health Prod. 2005; (8): 617-622.
- Karatepe M, Yağcı Ş, Karatepe B, Karaer Z. Sığır kesim artıkları üzerinde gelişmelerini sürdüren myiasis sinekleri. Türkiye Parazitoloj Derg. 2005; 29(4):271-274.
- Karatepe M, Karatepe B. Hypodermosis in cattle slaughtered in Niğde Province, Turkey. Trop Anim Health Prod. 2008A; 40(6): 383-386.
- Kerby W. Spence W. An Introduction to Entomology. London, 1818; Vol. I, ed. 3, 519.

- Khan MN, Iqbal Z, Sajid MS, Anwar M, Needman GR, Hassan M. Bovine hypodermosis: prevalence and economic significance in southern Punjab, Pakistan. *Vet Parasitol.* 2006; 141(3-4): 386-390.
- Khaznadji E, Boulard C, Moire N. Expression of functional hypodermin A, a serine protease from *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae), in Schneider 2 cells. *Exp Parasitol.* 2003;104 (1-2) : 33-39.
- Kilgore WW, Doult RL. (eds). *Pest Control: Biological, Physical and Selected Chemical Methods.* Academic Press, New York and London, 1967; 477.
- 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.
- Kurtpınar H. Anadolu ehli hayvanlarında görülen *Hypoderma* türleri ve mücadeleleri ile ilgili araştırmalar. *Ankara Yüksek Ziraat Enst Derg.* No. 631, 1947; 1–60
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
- Leaning WHD. Ivermectin as an antiparasitic agent in cattle. *Modern Vet Practice,* 1984; 65: 669– 672.
- Lecroisey A, Boulard C, Keil B. Chemical and enzymatic characterization of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. *Europ J Biochem.* 1979; 101, 385– 393.
- Li W, Nasu T, Ma Y, Zhu X, Makimura S. Scanning electron microscopic study of third-instar warbles in yak in China. *Vet Parasitol.* 2004; 121: 167–172.
- Lonneux JF, Losson BJ. The efficacy of moxidectin 0.5% pour-on against *Hypoderma bovis* in naturally infested cattle: parasitological and serological data. *Ver Parasitol.* 1994; 52(3-4);313-320.
- Lopez C, Colwell D.D, Panadero R, Paza A, Perez J, Morrondo P, Diez P, Cascallana J.L, 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.
- Martinez-Gomez F, Gasca-Arroyo A, De Juan F, Hernandez-Rodriguez S. Maternal anti-*Hypoderma* antibodies in calves. *Med Vet Entomol.* 1991; 5, 381–383.
- Mc Graw TA, Turiansky GW. Cutaneous myiasis. *J Am Acad Dermatol.* 2008; 58(6): 907–926
- Mehlhorn H. *Encyclopedia of Parasitology.* 3rd ed. Berlin: Springer; 2008; 628-631.



- Merdivenci A. Türkiye’de sığır (*Bos taurus*)larda *Hypoderma lineatum*(de Villers,1789) un varlığı. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 1963; 10(2): 206-212.
- Meriç İ, Korkut F. Orta Anadolu sığırlarına arız olan *Hypoderma* türleri ve bunların zararlarından korunmada Neguvonun etkisi. Lalahan Zootečni Araş Enst Derg. 1960; 8:69-89.
- Mimioğlu MM. Sığır ve Ankara Keçilerinde Nokra (Hypodermosis). Ankara Üniv Vet ve Ziraat Fak. Basımevi, 1966; 43.
- Mimioğlu MM. Veteriner ve Tıbbi Artropodoloji. Ankara Üniv Basımevi. Ankara. 1973; 132-148.
- Minar J, Breev KA. Laboratory and field rearing of the warble-fly *Hypoderma bovis* (De Geer) (Diptera, Hypodermatidae) in the research of its population ecology. Folia Parasitologia (Praha), 1982; 29: 351–360.
- Minar J, Samsinakova A. Entomophagous fungus *Beauveria tenella* (Deuteromycetes), parasite of pupae of warble fly *Hypoderma bovis* (Diptera, Hypodermatidae). Folia Parasitol. 1977; 24,93.
- Minar J. The attacking of a horse by the deer warble fly *Hypoderma diana* Brauer, 1858 (Diptera, Hypodermatidae). Vet Med. 1987; 32, 187–191.
- Moiré N, Nicolas-Gaulard I, Le Vern Y. Boulard C. Enzymatic effect of hyodermin A, a parasite protease, on bovine lymphocyte membrane antigens. Parasite Immunol. 1997; 19, 21–27.
- Moire N. Hypodermin A and inhibition of lymphocyte proliferation. Parasitol Today, 1998; 14(11): 455-457.
- Monfray K, Boulard C. Preliminary evaluation of four immunological tests for the early diagnosis of *Hypoderma tarandi* causing hypodermosis in reindeer. Med Vet Entomol. 1990; 4, 297– 302.
- Moreno FJ, Wassal DA, Becerra –Martell C, Hernandez-Rotriguez S. Comparison of the use of secretory and somatik antigens in an ELISA of the serodiagnosis of hypodermosis. Vet Parasitol. 1994;52:321-329.
- 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.
- Mosmann TR. Properties and functions of interleukin-10. Adv Immunol. 1994;56: 1–26.
- Natvig, L.R. (1916) Beitrag zur Biologie der Dasselfliegen des Renttieres. Tromoso Museums Aarshefter 38-39,117-133.

- Nelson D.L, Knapp F.W. A flocculation test for the detection of antibodies resulting from the injection of an extract of *Hypoderma* larvae. Am J Vet Res. 1961; 22: 332–334.
- Nelson W.A. Weintraub J. *Hypoderma lineatum* (De Vill.) (Diptera: Oestridae): invasion of the bovine skin by newly hatched larvae. J Parasitol. 1972; 58: 614– 624.
- Nicolas-Gaulard I, Moire N, Boulard C. Effect of the parasite enzyme, hypodermin A on bovine lymphocyte proliferation and interleukin-2 production via the prostaglandin pathway. Immunology. 1995; 84, 160– 165.
- Nilssen AC. Factors affecting size, longevity and fecundity in the rein deer oestrid flies *Hypoderma tarandi* (L.) and *Cephenemyia trompe* (Modeer). Ecol Entomol. 1997a; 22:294-304.
- Nilssen AC. Effect of temperature on pupal development and eclosion dates in the reindeer oestrids *Hypoderma tarandi* and *Cephenemyia trompe* (Diptera: Oestridae). Environmen Entomol. 1997b; 26: 296–306.
- Nilssen AC. Pupal Biology and Metamorphosis Behaviour In:Eds.Colwell, D. D.; Hall, M. J. R.; Scholl, P. J. Oestrid Flies : Biology, Host-Parasite Relationships, Impact and Management. Wallingford, Oxfordshire, GBR: CABI Publishing, 2006; 124-139.
- Nirmala X, Hyspa V, Zurovec M. Molecular phylogeny of Calyptratae (Diptera: Brachycera): the evolution of 18S and 16S ribosomal DNAs in higher 79 dipterans and their use in phylogenetic inference. Insect Mol Biol. 2001; 10: 475-485.
- Oğuz B. Sığırlarda hypodermosise sebep olan türlerin Sitokrom Oksidaz I Gen Dizilerinin PCR-RFLP tekniği ile araştırılması. Türkiye Parazit Derg. 2013; 37: 190-194.
- Oksanen A, Nieminen M, Soveri T, Kumpula K. Oral and parenteral administration of ivermectin to reindeer. Vet Parasitol. 1992; 41: 241–247.
- Oksanen A. Therapeutic efficacy of doramectin against *Cephenemyia trompe* (reindeer throat bot) and *Hypoderma tarandi* (reindeer warble). Bull Scandinavian Soc Parasitol., 1995; 5-17.
- Oksanen A, Nieminen M. Moxidectin as an endectocides in reindeer. Acta Vet Scand. 1998; 39: 483– 489.
- Otranto D. The immunology of myiasis: parasite survival and host defense strategies, Trends Parasitol. 2001;17(4):176-182.

- Otranto D, Testini G, Sottili R, Capelli G, Puccini V. Screening of commercial milk samples using ELISA for immuno-epidemiological evidence of infection by the cattle grub (Diptera:Oestridae). *Vet Parasitol.* 2001; 99 (3): 241-248.
- Otranto D, Colwell D.D, Traversa D, Stevens J.R. Species identification of *Hypoderma* affecting domestic and wild ruminants by morphological and molecular characterization. *Med Vet Entomol.* 2003a; 17: 1–10.
- Otranto D, Traversa D, Tarsitano E, Stevens J.R. Molecular differentiation of *Hypoderma bovis* and *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae) by polymerase chain reaction description fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Vet Parasitol.* 2003b; 112: 197–201.
- Otranto D, Traversa D, Guida B, Tarsitano E, Fiorente P, Stevens JR. Molecular characterization of the mitochondrial Cytochrome Oxidase I gene of Oestridae species causing obligate myiasis. *Med Vet Entomol.* 2003c, 17: 307-315.
- Otranto D, Traversa D, Colell DD, Guan G, Giangaspero A, Boulard C, Yin H. A Third species of *Hypoderma* (Diptera: Oestridae) affecting cattle and yak sin China: Molecular and morphological evidence. *J Parasitol.* 90(59): 2004; 958-965.
- Otranto D, Zalla P, Testini G, Zanaj S. Cattle grub infestation by *Hypoderma* sp. in Albania and risks for European countries. *Vet Parasitol.* 2005a;128(1-2): 157-162.
- Otranto D, Lia RP, Agostini A, Traversa D, Milillo P, Capelli G. Efficacy of moxidectin injectable and pour-on formulations in a pilot control program against bovine hypodermosis in Southern Italy. *Prev Met Med.* 2005b; 69 (1-2): 153-159.
- Otranto D, Paradies P, Testini G, Lia RP, Giangaspero KA, Traversa D, Colwell DD. First description of the endogenous life cycle of *Hypoderma sinense* affecting yaks and cattle in China. *Med Vet Entomol.* 2006; 20 (3) : 325-328.
- Otranto D, Stewens JR. Molecular phylogeny and identification. In:Eds.Colwell, D. D.; Hall, M. J. R.; Scholl, P. J. *Oestrid Flies : Biology, Host-Parasite Relationships, Impact and Management.* Wallingford, Oxfordshire, GBR: CABI Publishing, 2006; 4:51-66.
- Özdal N, Değer S. Van Belediye Mezbahasında kesilen sığır, koyun ve keçilerde hypodermosis. *YYÜ Vet Fak Derg.* 2005; 16(2): 23-25.
- Özkutlu Z, Sevgili M. Şanlıurfa yöresindeki sığırlarda hypodermosis'in seroprevalansı. *Türkiye Parazitoloj Derg.* 2005; 29(4): 275-279.

- Panadero R, Lopez C, Mezo M, Morrondo P, Banoz D. Effect of early treatment with ivermectin and doramectin on the dynamics of antibody response in cattle naturally infested by *Hypoderma lineatum* and *H. bovis*. *Vet Parasitol.* 1997;73:325-334.
- Panadero-Fontan R, Lopez-Sandez C, Para-Fernandez F, Morrondo-Pelayo P, Diez-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(1): 85-94.
- Panadero R, Dacal V, Lopez C, Vazquez L, Cienfuegos S, Diaz P, Morrondo P, Diez-Banos 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, López C, Vázquez L, Díaz P, Pérez A, Cabanelas E, Morrondo P, Díez-Banos P. Effect of reinfestations on systemic immune responses in cattle naturally infested by *Hypoderma* sp. (Diptera: Oestridae). *Vet Parasitol.* 2013; 193: 238– 244.
- Pape T. Phylogeny of the Tachinidae family group (Diptera: Calyptratae). *Tijdschrift voor Entomologie.* 1992; 135: 43-86.
- Pape T. Phylogeny of Oestridae (Insecta: Diptera). *Syst Entomol.* 2001; 26: 133-171.
- Pape T. Phylogeny and Evolution of Bot Flies in Eds. Colwell, D. D.; Hall, M. J. R.; Scholl, P. J. *Oestrid Flies : Biology, Host-Parasite Relationships, Impact and Management.* Wallingford, Oxfordshire, GBR: CABI Publishing, 2006; 3:20-50.
- Patton W.S. Notes on the myiasis-producing *Diptera* of man and animals. *Bull Entomol Res.* 1922; 12, 239– 261.
- Perez JM, Granados JE, Ruiz-Martinez I. Studies on the hypodermosis affecting red deer in central and southern Spain. *J Wild Dis.* 1995;31(4):251-254.
- Pfadt RE. Effects of temperature and humidity on larval and pupal stages of the common cattle grub. *J Econ Entomol.* 1947; 40: 293–303.
- Pruett JH, Barrett CC, Fisher WF. Kinetic development of serum antibody to purified *Hypoderma lineatum* proteins in vaccinated and nonvaccinated. *Southwestern Entomol.* 1987; 12: 79–88.
- Pruett JH, Fisher WF, Temeyer KB. Evaluation of purified proteins of *Hypoderma lineatum* as candidate immunogens for a vaccine against bovine hypodermiasis. *Southwestern Entomologist.* 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 J.H. Immunological control of arthropod ectoparasites – a review. *Int J Parasitol.* 1999; 29, 25–32.
- 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(1): 89-91.
- Rastegaev Yu.M. On parasitism by *Hypoderma bovis* (De Geer) of sheep and goats in Western Siberia. *Parasitologyia.* 1972; 6, 531–533.
- Regalbono A.F., Capelli G., Otranto D., Pietrobelli M. Assesment of cattle grub (*Hypoderma* spp.) prevalence in northeastern Italy: an immunoepidemiological survey on bulk milk samples using ELISA. *Vet Parasitol.* 2003; 111: 343-350.
- Ross H.M. Warble infestation of sheep. *Vet Rec.* 1983; 112, 135.
- San Miguel JM, Alvarez G, Luzon M. Hypodermosis of red deer in Spain. *J Wildl Dis.* 2001; 37(29): 342-326.
- Sayin F, Meric I. Dökme metotla uygulanan Hipolen-6 ve Tiguvon'un sığır hypodermosis'ine karşı etkisi üzerinde araştırmalar. *Ankara Üniv Vet Fakültesi Der.* 1976; 28: 302–307.
- Sayın F, Boulard C, Thornberry H, Boulard C (ed.), Thornberry H. Present situation of hypodermosis in Turkey, Warble fly control in Europe. A symposium in the EC Programme of Coordination of Research on Animal Pathology, Brussels. 16-17 September 1982; 39: 41.
- Sayın F, Kalkan A, Karaer Z. Türkiye'de sığır hypodermosisi üzerine epidemiyolojik araştırmalar. *F.Ü. Sağlık Bil Der.* 2000;14(1): 115-127.
- Scholl P.J, Weintraub J. Gonotrophic development in *Hypoderma lineatum* and *H. bovis* (Diptera: Oestridae), with notes on reproductive capacity. *Ann Entomol Soc America.* 1988; 81: 318–324.
- Scholl PJ, Guillott FS, Wang GT. Moxidectin: systemic activity against common cattle grubs (*Hypoderma lineatum*) (Diptera: Oestridae) and trichostrongyle nematodes in cattle. *Vet Parasitol.* 1992; 41: 203–209.
- Scholl P.J. Biology and control of cattle grubs. *Ann Rev Entomol.* 1993; 39: 53–70.
- Scholl PJ. Management and control of oestrid flies. In:Eds.Colwell, D. D.; Hall, M. J. R.; Scholl, P. J. *Oestrid Flies : Biology, Host-Parasite Relationships, Impact and Management.* Wallingford, Oxfordshire, GBR: CABI Publishing, 2006; 13; 210-219.
- Scholl PJ, Catts EP, Mullen GR. Myiasis (Muscoidea, Oestroidea). In: Eds. Mullen GR, Durden LA. *Medical and Veterinary Entomology Second Edi.* Academic pres is an imprint of Elsevier. London. 2009;18:309-338.

- Shugart JI. In vitro culture of external life stages of Wyoming *Hypoderma lineatum* and *H. bovis*. Thesis, University of Wyoming Larmie, Wyoming December, US.1975.
- Singh B. Molecular Phylogeny of the Oestroidea. UMI 3530621, Published by ProQuest LLC 2012. Digitally signed by John H. Hagen, Virginia University Libraries,149.
- Soulsby, E.J.L.: Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals, 7th edn. Bailliere Tindall, London. 1986: 430-437.
- Stegman P. The Control of the Warble-Fly. Paul Parey, Berlin, Germany, 23 pp.Rev App Entomol. 1920; B 11, 78, 1923.
- Şimşek S, Ütük AE, Köroğlu E, Şaki CE. *Hypoderma bovis* ve *Przhevalskiana silenus* somatik antijenlerinin SDS-PAGE ile tanımlanması. Türkiye Parazitoloj Derg.2005; 29(2): 97-99.
- Şimşek S, Ütük AE, Köroğlu E, Dumanlı N. Seroprevalence of hypodermosis in cattle in some provinces of Turkey. Res Vet Sci. 2008; 84(2): 246-249.
- Taşçı S, Değer S, Akgül Y. Van ve yöresinde hypodermosis. YYÜ Vet Fak Derg. 1994; 5(1-2): 143-153.
- Thrusfield, M. Veterinary Epidemiology. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1995; 479.
- Tyzard IR. Veterinary Immunology : An introduction. St Louis, Mo : Saunders / Elsevier, 2009. 8th ed. ISBN: ISBN 978-1-416-04989-0
- Vercruyse J, Rew RS. Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy. CABI Publishing, 2002; Wallingford Oxon OX10 8DE UK, 432.
- Vyslouzil L. Occurrence of *Hypoderma diana* in an unusual host. Veterinarstvi. 1989; 39, 222.
- Webster KA, Giles M, Dawson C. A competitive ELISA for the serodiagnosis of hypodermosis. Vet Parasitol. 1997; 68 (1-2): 155-64.
- Wood D.M. Morphology of Adult Oestridae In: Eds:Colwell, D. D.; Hall, M. J. R.; Scholl, P. J. Oestrid Flies : Biology, Host-Parasite Relationships, Impact and Management. Wallingford, Oxfordshire, GBR: CABI Publishing, 2006: 6;78-92.
- Yavru S, Şimşek A, Kale M, Bulut O, Yapıcı O, Avcı O, Dik I. Sütçü sığırların kan ve süt serumlarında Bovine Viral Diarrhea Virus antikorlarının ELISA ile belirlenmesi. Eurasian J Vet Sci. 2013;29(2):97-102.

Yin H, Ma M, Yuan G, Huang S, Liu Z, Luo J, Lanzhou GG. Hypodermosis in China. J. Anim And Vet Adv. 2003;2(3):179-183.

Yukarı BA, Eren H. Entomoloji. Akdeniz Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını Ders notu, No:8, 2004; 104.

Zeybek H. Ankara yöresi sığır ve tiftik keçilerinde *Hypoderma* spp. (Nokra) nın yayılışı. Etlik Vet Mikrob Derg. 1988; 6(2): 45-56.

Zumpt F. Myiasis in Man and Animals in the Old World. London Butterworths 1965. p.267.



## EKLER

### Ek1. *H. bovis* Samsun izolatu (KF926088.1)

```
1   ctgtaccaac  tggaaattaa  attttcagat  gattagcaac  tttacatgga  acacaaatca
61  actactctcc  tgcaacttta  tgatctttag  ggtttgttt  tttatttaca  gttggaggat
121 taactggagt  aatthtagct  aattcatcta  ttgatattat  tttacatgat  acatattatg
181 tagtagctca  cttccattat  gttttatcta  taggagctgt  atttgccatt  atagctggat
241 tcattcattg  atttcatta  ttacaggat  taacattaa  tgttaaacta  ttaaaaagcc
301 aatttgcat  tatattttta  ggagtaaatt  taacctttt  ccctcaacac  ttttagggg
361 tagctggcat  acctcgacgt  tattctgatt  atccagatgc  ttataccaca  tgaaatgtaa
421 tttcaactat  tggatcatca  atttctctt  taagtattt  attatttcta  tttattattt
481 gagaaagatt  actatcacia  cgacaagtat  tatttcctat  ccaattaaat  tcatcaattg
541 aatgattaca  aaatacacca  ccctctgaac  actc
```





**Ek2. *H. bovis* Ordu izolati (KF926089.1)**

```
1   ctgtaccaac tgggaattaa attttcagat gattagcaac tttacatgga acacaaatca
61  actactctcc tgcaacttta tgatctttag ggtttgtttt tttatttaca gttggaggat
121 taactggagt aatthtagct aattcatcta ttgatattat tttacatgat acatattatg
181 tagtagctca cttccattat gttttatcta taggagctgt atttgccatt atagctggat
241 tcattcattg atttcatta tttacaggat taacattaaa tgttaaacta ttaaaaagcc
301 aatttgatcat tatatthtta ggagtaaatt taaccttttt ccctcaacac tttttagggt
361 tagctggcat acctcgacgt tattctgatt atccagatgc ttataccaca tgaaatgtaa
421 tttcaactat tggatcatca atttctcttt taagtatttt attatttcta tttattattt
481 gagaaagatt actatcacia cgacaagtat tatttcctat ccaattaaat tcatcaattg
541 aatgattaca aaatacacca ccctctgaac actc
```



### Ek3. *H. bovis* Sinop izolati (KF926090.1)

```
1   ctgtaccaac  tggaaattaa  attttcagat  gattagcaac  tttacatgga  acacaaatca
61  actactctcc  tgcaacttta  tgatctttag  ggtttgtttt  tttatttaca  gttggaggat
121 taactggagt  aatthtagct  aattcatcta  ttgatattat  tttacatgat  acatattatg
181 tagtagctca  ottccattat  gttttatcta  taggagctgt  atttgccatt  atagctggat
241 tcattcatg  atttcatta  tttacaggat  taacattaaa  tgttaaacta  ttaaaaagcc
301 aatttgcat  tatatthtta  ggagtaaatt  taacctttt  ccctcaacac  ttttagggg
361 tagctggcat  acctcgacgt  tattctgatt  atccagatgc  ttataccaca  tgaaatgtaa
421 tttcaactat  tggatcatca  atttctctt  taagtatttt  attatttcta  tttattattt
481 gagaaagatt  actatcacia  cgacaagtat  tatttcctat  ccaattaaat  tcatcaattg
541 aatgattaca  aaatacacca  ccctctgaac  actc
```



**Ek4. *H. bovis* Tokat izolati (KF926091.1)**

```
1   ctgtaccaac tggaaattaa attttcagat gattagcaac tttacatgga acacaaatca
61  actactctcc tgcaacttta tgatctttag ggtttgtttt tttatttaca gttggaggat
121 taactggagt aattttagct aattcatcta ttgatattat tttacatgat acatattatg
181 tagtagctca cttccattat gttttatcta taggagctgt atttgccatt atagctggat
241 tcattcatg  atttcatta tttacaggat taacattaaa tgttaaacta ttaaaaagcc
301 aatttgcat  tatatthtta ggagtaaatt taacctttt  ccctcaacac tttttagggt
361 tagctggcat acctcgacgt tattctgatt atccagatgc ttataccaca tgaaatgtaa
421 tttcaactat tggatcatca atttctctt  taagtatttt attatttcta tttattattt
481 gagaaagatt actatcacia  cgacaagtat tatttcctat ccaattaaat tcatcaattg
541 aatgattaca aaatacacca ccctctgaac actc
```



**Ek5. *H. bovis* Amasya izolati (KF926092.1)**

```
1   ctgtaccaac tggaaattaa attttcagat gattagcaac tttacatgga acacaaatca
61  actactctcc tgcaacttta tgatctttag ggtttgtttt tttatttaca gttggaggat
121 taactggagt aattttagct aattcatcta ttgatattat tttacatgat acatattatg
181 tagtagctca cttccattat gttttatcta taggagctgt atttgccatt atagctggat
241 tcattcatg  atttcatta tttacaggat taacattaaa tgttaaacta ttaaaaagcc
301 aatttgcat  tatattttta ggagtaaatt taacctttt  ccctcaacac tttttagggt
361 tagctggcat acctcgacgt tattctgatt atccagatgc ttataccaca tgaaatgtaa
421 tttcaactat tggatcatca atttctctt  taagtatttt attatttcta tttattattt
481 gagaaagatt actatcacia cgacaagtat tatttcctat ccaattaaat tcatcaattg
541 aatgattaca aaatacacca ccctctgaac actc
```



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Selma KAYA

Doğum Yeri: Ordu/Ünye

Doğum Tarihi: 07.08.1971

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Lisansüstü, Kafkas Üniversitesi,  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Zootečni ABD., 2001  
Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Kafkas Üniversitesi Vet. Fak., KARS, 1998-2003  
İl Tarım Müdürlüğü, KARS, 2003-2007  
Veteriner Kontrol Enstitüsü, SAMSUN, 2007-

E-posta: selmakaya52@hotmail.com