

Ev Sineklerinin *MdaE7* (*Musca domestica*- α -Esteraz-7) Geni İle Vektörlükleri Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi

Determination of The Relationship Between the *MdaE7* (*Musca domestica*- α -Esterase-7) Gene of House Flies and The Vector Ability

Fadime Eroğlu*[©]

* Aksaray Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Aksaray, Türkiye

Atf/Cite as: Eroğlu F. Ev sineklerinin *MdaE7* (*Musca domestica*- α -Esteraz-7) geni ile vektörlükleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2024;54(2):126-134.

Öz

Amaç: *Muscidae* familyasında yer alan, kozmopolit bir dağılım gösteren *Musca domestica*'ların insan ve hayvan patojenleri için önemli bir vektör olduğu bilinmektedir. Ancak, *M. domestica*'ların insektisitlere karşı önemli direnç rolü olan *MdaE7* (*Musca domestica*- α -esteraz-7) gen bölgesindeki aleller ile bu patojenlerin vektörlükleri arasındaki ilişki bilinmemektedir. Bu çalışmada, *M. domestica*'nın *MdaE7* gen bölgesindeki direnç alelleri ile vektörlükleri arasında ilişki olup olmadığını moleküler yöntemler ile belirlemek amaçlanmıştır.

Yöntem: İç Anadolu Bölgesindeki Aksaray ilinde yaşayan insanların evlerinden 2023 yılının yaz ayları boyunca toplam 170 erişkin *M. domestica* toplanmıştır. Erişkin *M. domestica*'ların DNA'ları E.Z.N.A® Insect DNA isolation Kiti (Omega Bio-Tek, Georgia, ABD) ile izole edilmiş, *MdaE7* gen bölgesi hedef alınmış, *MdaE49* ve *MdaE50* primerleri kullanılmış, PCR ve DNA dizi analizi yapılmıştır. *M. domestica*'ların vektörlüklerini belirlemek için, DNA izolatlarında bakteri ve parazit türlerine özgü primerler kullanılarak real-time PCR analizi yapılmıştır.

Bulgular: DNA dizi analizi sonuçlarına göre; toplam 170 DNA örneğinin %41.2 (70/170)'sinde iki farklı alel (Gly137→Asp, Trp137→Ser251) tespit edilirken, diğer örneklerde (%58,8; 100/170) alel tespit edilmemiştir. *M. domestica*'ların %35.3 (60/170)'ünde *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* saptanmışken, %64.7 (110/170)'inde bu bakteri türleri bulunmamıştır. *M. domestica*'ların %23.5 (40/170)'inde *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*, *Strongyloides stercoralis* parazit türleri tespit edilirken, %76.5 (130/170)'inde bu parazit türleri tespit edilmemiştir. *M. domestica*'larda tespit edilen aleller ile bakteri ve parazit vektörlükleri karşılaştırılmıştır. Alel tespit edilen *M. domestica*'ların %23.5 (40/170)'ünde parazit tespit edilirken, bu alelleri taşıyan *M. domestica*'larda bakteriyel patojenler saptanmamıştır.

Sonuç: Evlerimizde sağlık tehlikesi oluşturan özellikle tarım ve hayvancılığın yaygın olduğu bölgelerde sık görülen *M. domestica*'ların vektörlüklerinden korunmak ve bu sinekler ile mücadele etmek için insektisitler uygun dozlarda kullanılmalıdır. Mücadele sırasında *M. domestica*'ların direnç mekanizmaları ve vektörlükleri arasındaki ilişkinin bilinmesi doğru mücadele uygulaması yapımında önemlidir.

Anahtar kelimeler: *Musca domestica*, *Mda*, *E7* gen alelleri, bakteri, parazit

ABSTRACT

Objective: It is known that *Musca domestica*, which has a cosmopolitan distribution and belongs to *Muscidae* family, is an important vector of pathogens for humans and animals. However, the relationship between the alleles in the *MdaE7* (*Musca domestica*- α -esterase-7) gene region, which plays an important role in insecticide resistance in *M. domestica*, and the vectors of these pathogens is unknown. In this study, it was aimed to determine with molecular methods whether there was a relationship between the resistance alleles in the *MdaE7* gene region of *M. domestica* and their vectors.

Methods: A total of 170 adult *M. domestica* were collected from the houses of residents of Aksaray province in the Central Anatolia Region during the summer months of 2023. DNAs of adult *M. domestica* were isolated using the E.Z.N.A® Insect DNA Isolation Kit (Omega Bio-Tek, Georgia, USA), *MdaE7* gene region was targeted, *MdaE49* and *MdaE50* primers were used, PCR and DNA sequence analysis were performed. To determine the vectors of *M. domestica*, real-time PCR analysis of DNA isolates was performed using primers specific for bacterial and parasitic species.

Results: According to the results of the DNA sequence analysis; while two different alleles (Gly137→Asp, Trp137→Ser251) were detected in 41.2% (70/170) of a total of 170 DNA samples, no alleles were detected in the other samples (58.8%, 100/170). While *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus pyogenes* were detected in 35.3% (60/170) of *M. domestica*, these bacterial species were not found in 64.7% (110/170). *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis* and *Strongyloides stercoralis* were detected in 23.5% (40/170) of *M. domestica*, while these parasite species were absent in 76.5% (130/170). The alleles detected in *M. domestica* were compared with their bacterial and

Alındığı tarih / Received:
10.08.2023 / 10.August.2023

Kabul tarihi / Accepted:
20.02.2024 / 20.February.2024

Yayın tarihi / Publication date:
14.06.2024 / 14.June.2024

ORCID Kayıtları

F. Eroğlu 0000-0003-2179-1326

✉ eroglufadime@hotmail.com

parasitic vectors. While parasites were detected in 23.% (40/170) of *M. domestica* alleles, bacterial pathogens were not detected in *M. domestica* carrying these alleles.

Conclusion: Insecticides should be used in appropriate doses to combat these flies and protect against vectors of *M. domestica*, which poses a health hazard in our homes, and is especially common in regions where agriculture and animal husbandry are common.

Keywords: *Musca domestica*, *Mda*, *E7* gene allele, bacteria, parasite

GİRİŞ

Halk arasında karasinek olarak bilinen *M. domestica*, iki kanatlılar takımının Muscidae familyasından bir böcek türüdür⁽¹⁾. *M. domestica*'lar beslenmek ve üremek için özellikle organik atıklara ihtiyaç duydukları için çöplük, hayvan barınakları, çiftlikler, gıda artıklarının olduğu ortamlarda kozmopolit olarak bulunurlar ve insanların yaşam alanlarına ortak olurlar⁽²⁾.

Musca domestica'lar organik atıklardan patojen olan bakterileri, mantarları, parazitleri ve virüsleri ağız yoluyla alıp vakum etkisiyle bu mikroorganizmaları kursaklarına çekerler. *M. domestica*'lar tükürük salgısını beslediği yüzeylere bırakarak sindirim sistemlerinde bulunan patojen mikroorganizmaları insanlara ve hayvanlara bulaştırarak, enfeksiyon hastalıklarına vektörlük yaparlar⁽³⁾. *M. domestica*'ların vektörlüğü ile ilgili çalışmalarda, *Bacillus spp.*, *Coccobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Enterobacter spp.* bakteri türleri izole edilmiştir⁽⁴⁾. Bununla birlikte, bazı kaynaklarda *M. domestica*'nın dış yüzeylerinde, kusmuk ve dışıklarında *Ascaris lumbricoides*, *Cryptosporidium spp.*, *Enterobius vermicularis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*, *Taenia spp.*, *Trichuris trichiura* ve *Strongyloides stercoralis* gibi parazitleri taşıdıkları bildirilmiştir^(5,6). Birçok patojen mikroorganizmaya vektörlük yapmaları ve insanların yaşam alanlarına ortak olmaları nedeniyle *M. domestica*'lar her zaman büyük bir halk sağlığı sorunu olmuştur⁽⁷⁾.

Yüzyıllarca, *M. domestica*'lar ile çeşitli kimyasallar kullanılarak mücadele edilmiştir. Ancak, *M. domestica*'lar mücadelede kullanılan insektisitlere karşı davranışsal veya metabolik direnç gösterebilmektedir⁽⁸⁾. *M. domestica*'lardaki glutathion-S-transferaz, asetilkolinesteraz ve monooksijenaz enzimleri insektisitlere karşı

metabolik dirençte önemli rol oynamaktadır⁽⁸⁾. Son yıllarda moleküler yöntemlerin gelişmesiyle *M. domestica*'ların *MdaE7* gen bölgesi hedef alınmış ve bu gen bölgesindeki alellerin insektisitlere karşı direnç ile ilişkili olduğu bildirilmiştir^(8,9).

Insektisit kullanım stratejilerinin doğru belirlenebilmesi için *M. domestica*'nın farklı gen bölgeleri hedef alınmış, DNA dizi analizi yapılmış ve farklı alellere direnç gösterip göstermediği tespit edilmiştir^(4,10). Ancak insektisitlere karşı direnç gösteren bu aleller ile vektörlük arasında ilişki olup olmadığı araştırılmamıştır. Bu çalışmada, iklimi ve coğrafik özellikleri ile çok sayıda zararlı türe gelişim olanağı sağlayan ve hayvancılığın özellikle büyük baş hayvancılığın yaygın olduğu Aksaray ilindeki *M. domestica*'nın *MdaE7* gen bölgesindeki direnç alelleri ile vektörlükleri arasında, ilişki olup olmadığını moleküler yöntemler ile belirlemek amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma; Aksaray Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından (16.02.2023 tarih ve karar no 10) onaylanmıştır.

Örneklerin Toplanması, DNA İzolasyonu ve PCR Analizi: Çalışmadaki erişkin *M. domestica*'lar, kuzey yarımkürede 38-39 kuzey paralelleri ile 33-35 doğu meridyenleri arasında yer alan Aksaray iline bağlı Gülağaç ilçesinden toplanmıştır. Gülağaç ilçesi "38.394337 enlem, "34.346133" boylam coğrafi koordinatları arasında yer almaktadır⁽¹¹⁾. Örnekler *M. domestica*'ların vektörlüklerinin kökenlenebileceği, büyükbaş hayvan yetiştiriciliği yapılan ahırlara yakın, etrafında hayvan gübresi olan ancak yakınlarında çöplüklerin ve açık tuvaletlerin olmadığı kırsal bölgelerdeki insanların yaşadıkları evlerin içinden toplanmıştır. Örneklerin tür teşhisi Aksaray Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Laboratuvarında Prof. Dr. Fadime Eroğlu tarafından

yapılmıştır. Uzunluğu 5-8 mm arasında olan, yalayıcı-emici ağız organellerine sahip, gri thoraksın dorsalinde dört adet siyah renkli uzunlamasına bantları olan, gri ve siyah renkli sinekler erişkin *M. domestica* olarak tanımlanmış ve çalışmaya dahil edilmiştir. *M. domestica*'lar taksonomik olarak etiketlenmemiş ve herhangi bir yerde saklanmamıştır. Çalışmada, tül atrap kullanılarak 2023 yılının yaz aylarında (Haziran-Temmuz-Ağustos) sıcaklığın 28-32°C'de olduğu günlerde, toplam 170 adet erişkin *M. domestica* toplanmış ve laboratuvara taşınmıştır. Çalışmada *M. domestica*'ların vektörlükleri sadece erişkin sineklerde araştırılmış olup, *M. domestica*'ların vektörlük yapabilecekleri bakteri ve parazit türleri lokasyon bazlı çevresel örneklerde araştırılmamıştır.

Erişkin *M. domestica*'ların DNA'ları E.Z.N.A[®]Insect DNA izolasyon kitinin (Omega Bio-Tek, Georgia, ABD) kullanım talimatlarına uygun olarak izole edilmiştir. *M. domestica*'ların PCR analizi için *MdaE7* gen bölgesi hedef alınmış ve;

Forward: MdaE49

(5'-GGGATTGGCTTTCATTAGGAATTCC-3')

Reverse: MdaE50

(5'-CGGAGGATTGTCTATACCTGAATG-3')

primerleri kullanılmıştır⁽³⁾. PCR işlemi için 10x PCR tamponu (Qiagen, Hilden, Almanya), 10 mM dNTP mix, 1 unit Taq polimeraz, 1.5 mM MgCl₂, 50 pmol forward primer, 50 pmol reverse primer, 5.5 µL steril su ve 5 µL DNA, eklenerek son hacim 25 µL olan reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. PCR reaksiyonu 95°C'de 5 dk, 95°C'de 1 dk, 54°C'de 30 sn, 72°C'de 1 dk olan thermal-cycler programı ile amplifiye edilmiştir. PCR ürünleri %1.5'lik agaroz jelde yürütülüp görüntülenmiştir.

DNA Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz: Agaroz jelde yürütülerek görüntülenen PCR ürünleri QIAquick PCR purifikasyon kitinin (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanma talimatlarına göre saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış PCR ürünleri ABI Prism BigDye Terminator V3.1 Cycle sequencing kiti (ThermoFisher Scientific, Litvanya) kullanılarak DNA dizisinin belirlenmesi için hazırlanmıştır. Amplifikasyon ürünleri %70'lik etil alkol ile yıkanmış ve cihazda okuma öncesi kuyucuklara 20 µL yükleme çözeltisi eklenmiştir. İşlem sonrası örneklerdeki nükleotit

dizileri ABI 3100 (Applied Biosystems, ABD) dizi analizi cihazı ile değerlendirilmiştir.

DNA dizi analizi sonucunda elde edilen nükleotit dizileri BioEdit 7.0.9.0 bilgisayar programı kullanılarak (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) her bir örnek için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. DNA dizilerinden elde edilen sonuçlar FASTA formatında bilgisayara kaydedilmiş ve sonuçlar GenBank'ta bulunan diziler ile karşılaştırılmıştır. Nükleotit dizileri ClustalW çoklu eşleme programı, Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE) ve Multiple Alignment with Fast Fourier Transform (MAFFT) programları ile analiz edilmiş ve nükleotitlerin benzerlik oranları belirlenmiştir. Filogenetik analiz için Molecular Evolutionary Genetics Analysis Ver 7.0 (MEGA7, <https://www.megasoftware.net>) programı kullanılmıştır. MEGA7 programında Neighbor joining method ile 30 nükleotit dizisi, taksonlar ve evrimsel mesafeler maximum composite likelihood yöntemi ile bootstrap değeri 1000 alınarak hesaplanmıştır. Analizlerden sonra nükleotit dizi sonuçları, FigTree v1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) ve TreeView (<https://treeview.co.uk/>) programları ile Filogenetik ağaç görselleştirilmiştir.

Real-Time PCR Analizi ve Vektörlüklerin Belirlenmesi: Çalışmada *M. domestica*'ların bakteri ve parazit vektörlüğünü araştırmak için bakteri ve parazitlere özgü primer-problar kullanılarak real-time PCR analizi yapılmıştır. Her bir mikroorganizma için ayrı ayrı reaksiyonlar hazırlanmış ve referans alınan çalışmalara göre real-time PCR analizi yapılmıştır. DNA izolatlarında *Bacillus cereus* vektörlüğünü araştırmak için, toplam 20 µL olan 2 X real-time PCR tamponu (Invitrogen, Viyena, Avusturya), 800 nM forward primer, 800 nM reverse primer, 400 nM prob, 5 µL DNA ve 3,5 µL steril saf su içeren real-time PCR reaksiyonu hazırlanmıştır. DNA izolatları real-time PCR reaksiyonu yaklaşık 2.5 saat süreli thermal-cycler programı (Tablo 1) ile amplifiye edilmiştir⁽¹²⁾. DNA izolatlarında *Pseudomonas aeruginosa* tespit etmek için 30 µM forward primer, 30 µM reverse primer, 15 µM prob, 5 µL DNA, 4.5 µL steril su ve 2X real-time PCR tamponundan (Quantitect, Qiagen, Almanya) oluşan real-time PCR reaksiyonu kullanılmıştır⁽¹³⁾. *Staphylococcus aureus* bakterini saptamak için DNA izolatları, toplam 25 µL olan real-

Tablo 1. *Musca domestica*'lardan izole edilen DNA izolatlarında bakteri vektörlüğünü tespit etmek için kullanılan primer-prob nükleotit dizileri ve thermal-cycler programı

Bakteri	Gen bölgesi	Primer-Prob Nükleotit Dizilimi	Thermal-Cycler Programı
<i>Bacillus cereus</i>	<i>gyrB</i>	F: GCCCTGGTATGTATATTGGATCTAC R: GGYCATAAATACTTCTACAGCAGGA P: CCATTTTTCTTGATACCAA- FAM	95°C 5 dk, 40 döngü (94°C 15 s, 60°C 30 s, 72°C 15 s) 72°C 5 dk
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>regA</i>	F: TGCTGGTGCCACAGGACAT R: TTGTGCAGCGTTTGTTCATTG P: CAGATGCTTGCCCTCAA- TAMRA	95°C 5 dk, 35 döngü (95°C 30 s, 61°C 60 s, 72°C 30 s) 72°C 5 dk
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>pvl</i>	F: AAATGCTGGACAAAACCTCTTGG R: TTTGCAGCGTTTTGTTTCG P: AAATGCCAGTGTTATCC- HEX	95°C 10 dk, 35 döngü (95°C 15 s, 60°C 45 s, 72°C 15 s) 72°C 10 dk
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>spy</i>	F: GCACTCGCTACTATTCTTACCTCAA R: TCGTGCCTTTAATTCCAGCT P: AACGCTTGATACAGGGAG-	95°C 5 dk, 40 döngü, (95°C 15 s, 60°C 30 s, 72°C 15 s) 72°C 5 dk

F: Forward; R: Reverse; P: gen probu

time PCR reaksiyonu (500 nM forward primer, 500 nM reverse primer, 250 nM prob, 5 µL DNA, 5 µL steril su ve 2X real-time PCR tamponu (Invitrogen, Viyena, Avusturya) thermal-cycler programı (Tablo 1) ile amplifiye edilmiştir⁽¹⁴⁾. *Streptococcus pyogenes* bakterilerini tespit etmek için ise, 600 nM forward primer, 600 nM reverse primer, 300 nM prob, 5 µL DNA, 3.5 µL steril su ve 2 X real-time PCR tamponu (Quantitect, Qiagen, Almanya) içeren 25 µL real-time PCR reaksiyonu hazırlanmıştır⁽¹⁵⁾. *M. domestica*'ların bakteri vektörlüğünü saptamak için kullanılan primer-prob nükleotit dizileri ve thermal-cycler programı Tablo 1'de gösterilmiştir.

Musca domestica'dan izole edilen DNA'larda *Cryptosporidium parvum*'u tespit etmek için, 2X real-time PCR tamponu (Quantitect, Qiagen, Almanya), 20 µM forward primer, 20 µM reverse primer, 10 µM prob, 2 µL steril saf su, 5 µL DNA içeren toplam 20 µL olan real-time PCR reaksiyonu kullanılarak, yaklaşık 3 saat süren thermal-cycler programı ile DNA'lar amplifiye edilmiştir⁽¹⁶⁾. DNA izolatlarında *Entamoeba histolytica* olup olmadığını tespit için 20 pmol forward primer, 20 pmol reverse primer, 10 pmol prob, 5 µL DNA, 4 µL steril su ve 2X real-time PCR tamponu (Bio-Rad, Dubai) içeren toplam 25 µL'den oluşan real-time PCR reaksiyonu kullanılmıştır⁽¹⁷⁾. *Gierdia duodenalis* parazitlerini tespit etmek için 15 pmol forward primer, 15 pmol reverse primer, 7.5 pmol prob, 2X real-time PCR tamponu (Quantitect, Qiagen, Almanya), 5 µL DNA ve 3.5 µL steril sudan oluşan real-time PCR reaksiyonu hazırlanmıştır⁽¹⁸⁾.

Toplam 25 µL olan real-time PCR reaksiyonu (300 nM forward primer, 300 nM reverse primer, 150 nM prob, 5 µL DNA, 4.5 µL steril su, 2X real-time PCR tamponu (Invitrogen, Viyena, Avusturya) kullanılarak 60°C'de primerlerin amplifiye olduğu thermal-cycler programı ile DNA izolatlarında *S. stercoralis* olup olmadığı araştırılmıştır⁽¹⁹⁾. Çalışmada parazit vektörlüğünü belirlemek için kullanılan primer-problar ve thermal-cycler programları Tablo 2'de gösterilmiştir.

BULGULAR

MdαE49 ve MdαE50 primerleri kullanılarak *M. domestica*'nın MdαE7 gen bölgesi PCR yöntemi ile çoğaltılmış, yaklaşık 700 bç bantlar elde edilmiştir. PCR ürünleri saflaştırıldıktan sonra DNA dizi analizi yapılmıştır. Çalışmadaki bütün DNA örneklerinin dizi analizinde MdαE7 gen bölgesinde intron 1 bölgesinde yaklaşık 7 kb, intron 2-5 bölgeleri arasında 61-64 bç dizilimlerinde olan iki intron saptanmıştır. İtronlar GT-AG kuralını takip etmekte olup, intronlar çıkarıldıktan sonra %95-99 oranında daha önce yayınlanmış Scott ve Zhang'ın⁽¹³⁾ yaptığı GenBank'a kayıtlı (AY244354.1-AY2443556.1) DNA dizi analizi ile benzerlik göstermektedir. Toplam 170 DNA örneğinin %17.6 (30/170)'sinde ülkemizde ve dünya genelinde yaygın olan iki farklı allel (Gly¹³⁷→Asp, Trp¹³⁷→Ser²⁵¹) tespit edilirken, diğer örneklerde (%82.4; 140/170) allel tespit edilmemiştir. Bu allellerin %63.4 (19/30)'ünün Gly¹³⁷→Asp olduğu,

Tablo 2. *Musca domestica*'lardan izole edilen DNA izolatlarında parazit vektörlüğü tespit etmek için kullanılan primer-prob nükleotit dizileri ve thermal-cycler programı

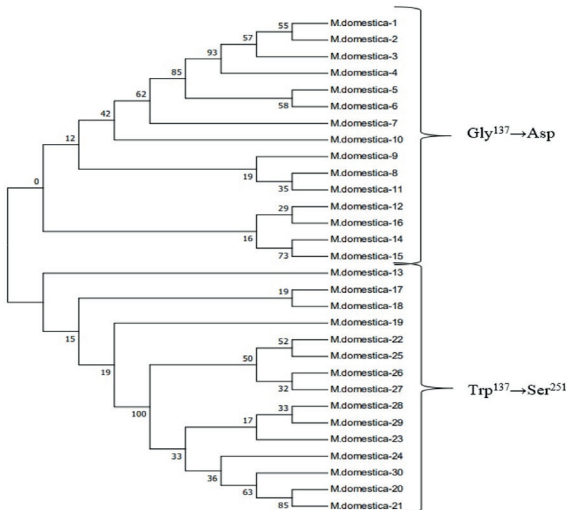
Parazit	Gen Bölgesi	Primer-Prob Nükleotit Dizilimi	Thermal-Cyler Programı
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>hsp70</i>	F: AACTTTAGCTCCAGTTGAGAAAGTACTC R: CATGGCTCTTACC GTTAAAGAATTCC P: AATACGTGTAGAACCACCAACCAATACAACATC-FAM	95°C 10 dk, 35 döngü, (95°C 15 s, 64°C 30 s, 72°C 15 s) 72°C 10 dk
<i>Entamoeba histolytica</i>	18S rRNA	F: AACAGTAATAGTTTCTTTCTTTGGTTAGTAAAA R: CTTAGAATGTCAATTCTCAATTCAT P: ATTAGTACAAAATGGCCAATTCATTCA-FAM	95°C 10 dk, 40 döngü, (95°C 15 s, 55°C 30 s, 72°C 15 s) 72°C 10 dk
<i>Gierdia duodenalis</i>	18S rRNA	F: GACGGCTCAGGACAACGGT R: TTGCCAGCGGTGGTCCG P: CCCGCGCGGTCCCTGCTAG-TAMRA	95°C 10 dk, 35 döngü, (95°C 15 s, 64°C 30 s, 72°C 15 s) 72°C 10 dk
<i>Strongyloides stercoralis</i>	18S rRNA	F: GAATCCAAGTAAACGTAAGTCATTAGC R: TGCCTCTGGATATTGCTCAGTTC P: ACACACCGCCGTCGCTGC-TAMRA	95°C 10 dk, 40 döngü, (95°C 15 s, 58°C 30 s, 72°C 15 s) 72°C 10 dk

F: Forward; R: Reverse; P: gen probu

%36,6 (11/30)'ünün ise Trp¹³⁷→Ser²⁵¹ olduğu saptanmıştır. Filogenetik analizde Gly¹³⁷→Asp aleline sahip *M. domestica*'lar bir grupta, Trp¹³⁷→Ser²⁵¹ aleline sahip *M. domestica*'lar ayrı bir grupta toplanmıştır (Şekil 1).

Bakteri ve parazit vektörlüğünü araştırmak için *M. domestica*'ların DNA'larında bakteri ve parazit türlerine özgü primerler kullanılarak real-time PCR çalışılmıştır. Real-time PCR yönteminin sonucuna göre; *M. domestica*'ların %35.2 (60/170)'ünde *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pyogenes* saptanmışken, %64.8 (110/170)'inde bu bakteri türleri bulunmamıştır. *M. domestica*'ların %10.5

(18/170)'inde *B. cereus*, %8.2 (14/170)'inde *P. aeruginosa*, %7.1 (12/170)'inde *S. aureus*, %9.4 (16/170)'ünde *S. pyogenes* bakteri türleri tespit edilmiştir. *M. domestica*'ların %23.5 (40/170)'inde *C. parvum*, *E. histolytica*, *G. duodenalis*, *S. stercoralis* parazit türleri tespit edilirken, %76.5 (130/170)'inde ise bu parazit türleri tespit edilmemiştir. Parazitlerin dağılımları araştırıldığında, *M. domestica*'ların %5.8 (10/170)'inde *C. parvum*, %7.1 (12/170)'inde *E. histolytica*, %8.2 (14/170)'inde *G. duodenalis*, %2.4 (4/170)'ünde *S. stercoralis* bulunmuştur. *M. domestica*'larda tespit edilen bakteri ve parazit türleri Tablo 3'te gösterilmiştir. Alel tespit edilen *M. domestica*'ların %23.5 (40/170)'inde parazit tespit edilirken, bu alelleri taşıyan sineklerde bakteriyel

**Şekil 1. Filogenetik analiz sonucunda *Musca domestica*'larda tespit edilen alellerin gruplandırılması****Tablo 3. Çalışmadaki (N=170) *Musca domestica* DNA izolatlarında tespit edilen bakteri ve parazit türleri**

Tür	Pozitif n (%)	Negatif n (%)
Bakteri		
<i>Bacillus cereus</i>	18 (10.5)	152 (89.5)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	16 (9.4)	154 (90.6)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14 (8.2)	156 (91.8)
<i>Staphylococcus aureus</i>	12 (7.1)	158 (92.9)
Parazit		
<i>Gierdia duodenalis</i>	14 (8.2)	156 (91.8)
<i>Entamoeba histolytica</i>	12 (7.1)	158 (92.9)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	10 (5.8)	160 (94.2)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	4 (2.4)	166 (97.6)

patojenlere rastlanmamıştır. Çalışmada tespit edilen bakteri ve parazitler çevresel atıklar üzerinde de görülebilen mikroorganizmalardır. Çalışmaya dâhil edilen erişkin *M. domestica*'ların vücutları alkol ile temizlendikten sonra DNA izole edilmiştir. Ancak bu mikroorganizmaların sineklerin tükrük bezlerinden mi yoksa dış vücutlarından mı izole edildikleri bilinmemektedir.

TARTIŞMA

Yüzlerce sinek türünden sadece birkaçı, insanların evlerinde, çiftliklerinde ve çevrelerinde yaygın olarak görülen zararlılardır. Bu sineklerden *M. domestica*'lar hızlı çoğalmaları, insanların yaşam alanları içerisinde yaşamaları ve mikroorganizmaların bulaşmalarında önemli etkileri olduğu için dünya çapında kontrol altına alınmaya çalışılan böcekler arasında ilk sırayı almaktadır. *M. domestica*'lar ile mücadelede uygulaması kolay, hızlı etkili olması ve maliyetinin düşük olması nedeniyle dünya genelinde en çok insektisitler kullanılmaktadır. İnsektisit kullanımı özellikle tarım ve hayvancılık nedeniyle *M. domestica*'ların yoğun olduğu bölgelerde her geçen yıl artmaktadır. Ancak insektisitlerin bilinçsiz kullanımından kaynaklı olarak teknik hatalar ortaya çıkmakta ve *M. domestica*'lar bu insektisitlere karşı fizyolojik ve biyokimyasal direnç göstermektedir. Bu direnç mekanizmaları sonunda çevremizdeki patojen *M. domestica*'ların sayısı ve tehlikesi artmaktadır^(20,21).

DNA dizi analizi yöntemi ile *M. domestica*'nın *MdaE7* gen bölgesi hedef alınmış Gly¹³⁷→Asp aleline sahip olan *M. domestica*'ların diyazinona ve Trp¹³⁷→Ser²⁵¹ aleline sahip *M. domestica*'ların ise malatyona direnç gösterdiği bildirilmiştir⁽³⁾. Bu gen bölgesinde görülen aleller nedeniyle karboksilesteraz enzimin aktivitesi azalır, organofosfat hidrolaz ve malatyon karboksilesteraz aktivite kazanır, *M. domestica*'lar böylelikle stres faktörünü bulunduğu ortamda hayatta kalır⁽³⁾. Taşkın ve ark.'ları⁽²²⁾ yapmış oldukları çalışmada, diyazinona karşı direnç gösteren Gly¹³⁷→Asp alellerinin, malatyona direnç gösteren Trp¹³⁷→Ser²⁵¹ alelleri göre daha yaygın görüldüğünü rapor etmişlerdir⁽²²⁾. Ülkemizin Akdeniz ve Ege bölgelerinde yer alan 16 farklı ilde yapılan çalışmada ise her ildeki *M. domestica*'larda Gly¹³⁷→Asp ve

Trp¹³⁷→Ser²⁵¹ alellerinin görüldüğü ve bu alellerin görülme sıklığı ile ilgili iller arasında anlamlı bir ilişki olmadığı rapor edilmiştir⁽³⁾. Bu çalışmada *M. domestica*'larda önceki çalışmalara benzer oranlarda Gly¹³⁷→Asp ve Trp¹³⁷→Ser²⁵¹ alelleri tespit edilmiştir ve çalışma sonuçlarımız önceki çalışmaları desteklemektedir.

Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), *M. domestica*'ları pisliğe katkı yapanlar olarak sınıflandırmışlar, mikroorganizmaların mekanik vektörü olduklarını, kolera, şigeloz ve salmonelloz gibi gıda kaynaklı hastalıkların yayılmasında önemli rol oynadıklarını bildirmişlerdir⁽²³⁾. Olsen ve ark.'nın⁽²⁴⁾ çalışmalarında *M. domestica*'larda *Salmonella* türü bakterileri izole etmişler ve bu sineklerin gıda kaynaklı enfeksiyonları yayabileceklerini rapor etmişlerdir⁽²⁴⁾. Hindistan'da yapılan bir çalışmada *M. domestica*'lardan fekal-oral yol ile bulaştığı bilinen ishal etkeni olan *Vibrio cholerae* izole edilmiştir⁽²⁵⁾. Banjo ve ark.⁽²⁶⁾ *M. domestica*'larının canlılığını kültür ortamlarında devam ettirmişler ve bu sineklerden, *B. cereus*, *P. aerruginosa*, *S. aureus* bakterileri tespit etmişlerdir⁽²⁶⁾. Nazni ve ark.⁽⁷⁾ ise *M. domestica*'ların kusmuklarında, dışkılarında, vücut yüzeylerinde *Bacillus spp.*, *Coccobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Escherichia spp.*, *Klebsiella spp.*, bakteri türlerini izole etmişlerdir⁽⁷⁾. Bu çalışmada, diğer çalışmalara benzer şekilde *M. domestica*'lardan *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pyogenes* bakteri türleri saptanmıştır. Çalışma sonucumuz, hayvancılık ve tarımın yaygın olduğu bölgelerde yaşayan insanların *M. domestica*'ların yaygın olması ve bakteri vektörlüklerinden dolayı enfeksiyon hastalıkları riski ile karşı karşıya kaldığını göstermektedir.

Musca domestica'lar sadece hayvancılık ve tarımın yaygın olduğu bölgelerde yaşamayıp, restoranlar, hastaneler, gıda merkezleri ve mezbahaneler gibi insan faaliyetlerinin olduğu alanlarda da yaşarlar. Bu sinek türleri sadece bakterilere değil aynı zamanda *E. histolytica*, *E. vermicularis*, *G. duodenalis*, *T. trichiura* ve *S. stercoralis* gibi parazitlere de mekanik vektörlük yapabilmektedirler⁽²⁷⁾. Almanya'da Förster ve ark.'nın⁽²⁸⁾ yaptıkları çalışmada, *M. domestica*'lardan *Ascaris suum*, *Strongyloides ransomi*, *Metastrongylus*

spp., *Haematopinus suis* parazit türleri izole edilmiş ve *M. domestica*'ların insan sağlığını tehdit eden parazit türlerine vektörlük yaptığı belirlenmiştir⁽²⁸⁾. Bu çalışmada, İç Anadolu Bölgesindeki Aksaray ilinde *M. domestica*'larda *C. parvum*, *E. histolytica*, *G. duodenalis* ve *S. stercoralis* parazit türlerinin tespit edilmesi, daha önceki çalışmalarda olduğu gibi *M. domestica*'nın parazitlere de vektörlük yapabileceklerini desteklemektedir.

Dünyada ve ülkemizde *M. domestica*'ların vektörlükleri ve insektisitlere karşı direnci ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yamanel ve ark.'ları⁽¹⁰⁾ Türkiye'nin 11 farklı yerleşim yerinden topladıkları *M. domestica*'ların metil paration ve diazinona gibi insektisitlere direnç gösterdiklerini rapor etmişlerdir⁽¹⁰⁾. Moleküler yöntemler ile *M. domestica*'ların insektisitlere karşı dirençleri araştırıldığında ise monooksijenazlar sınıfında yer alan sitokrom P450 monooksijenazlarını kodlayan genlerin *M. domestica*'da birden fazla sayıda kopyalanmasından dolayı çok geniş bir substrat grubuna etkili olduğu bildirilmiştir. İnsektisit direnç vakalarında, piretroidler gibi bileşiklerin detoksifikasyonunda yer alan bir P450'nin aşırı ekspresyonuna bağlı olabileceği rapor edilmiştir⁽⁴⁾.

Musca domestica'ların insektisitlere karşı direnci ile ilgili çalışmalar, sineğin direnç mekanizmasında etkili olan *MdaE7* geni aleleri ve vektörlükleri arasındaki ilişkiyi içermemektedir. *M. domestica*'lardaki *MdaE7* geni zengin bir alel havuzuna sahiptir ve bu çalışmada Gly¹³⁷→Asp ve Trp¹³⁷→Ser²⁵¹ alellerinin tespit edildiği *M. domestica*'larda *C. parvum*, *E. histolytica*, *G. duodenalis*, *S. stercoralis* tespit edilmesi bu alelerin parazit vektörlüğü ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Çalışmada tespit edilen aleler *M. domestica*'larda organofosfat insektisit direnç mekanizmalarına bakteri türleri duyarlıyken parazit türlerine direnç gösterebileceğini düşündürmektedir. Ancak, daha fazla örnek içeren gelecek zamanda yapılacak vektör ile ilişkili çalışmaların sayısının artırılması çalışmanın doğrulanmasında önemlidir.

İnsanlar yüzyıllarca birçok sinek türü ile birlikte yaşamışlar ve bu sineklerin zararları ile mücadele etmişlerdir. Son yıllarda sinekler ile mücadele kullanılan kimyasallara karşı insektisit direncinin

geliştiği ve bu durum insan sağlığını korumaktan ziyade tehlikeye atmaktadır. Mücadele edilecek sineklerin genlerinin, yaşam döngülerinin, üreme zamanlarının ve vektörlüklerinin bilinmesi doğru uygulamayı yapmada önemlidir. Vektör kontrolünde de kalıcı insektisitler kullanılmakta ve bu durum vektörlerde direnç oluşturmaktadır. *M. domestica*'ların neden olduğu vektörlüklerin mücadelesinde bölgede bulunan hayvanların ve insanların tedavi edilmesi mücadelede önemli etki yaratmaktadır. Ancak tarım ve hayvancılık yapılan bölgelerde hayvanların tedavi süreçleri uzun ve zor olduğu için *M. domestica*'lar ile bulaşan bakteri ve parazit enfeksiyonlarının sürekli tekrar etme durumları söz konusudur. Bu nedenle belirli dönemlerde *M. domestica* ile risk altındaki bölgelerde *M. domestica*'lara karşı mücadele çalışmalarının yapılmasında fayda vardır.

Etik Kurul Onayı: Bu araştırma; Aksaray Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu tarafından (16.02.2023 tarih ve karar no 10) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Bu çalışma Aksaray Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından ASUBAP.2020.035 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: This research was conducted with the approval of Aksaray University, Experimental Animal Ethics Committee (02.16.2023; 10).

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Funding: This study was supported by the Aksaray University Scientific Research Office under the Project number ASUBAP.2020.035.

KAYNAKLAR

1. Çakır D. Antalya ilinde ev sineği (*Musca domestica* L.) popülasyonlarının thameboxam'a karşı direnç durumunun belirlenmesi [Yüksek Lisans Tezi]. Antalya: Akdeniz Üniversitesi, 2018.
2. Gołębowski M, Dawgul M, Kamysz W, et al. Antimicrobial activity of alcohols from *Musca domestica*. J Exp Biol. 2012;215(Pt 19):3419-28. <https://doi.org/10.1242/jeb.073155>

3. Gaar F. Ege ve Akdeniz Bölgelerinden toplanan karasinek (*Musca domestica* L) populasyonlarında *MdaE7* geninin kısmi baz dizi analizinin yapılması ve örneklerde karboksilesteraz enzim aktivitesinin belirlenmesi [Yüksek Lisans Tezi]. Muđla: Muđla Üniversitesi, 2008.
4. Scott JG, Zhang L. The house fly aliesterase gene (*MdalphaE7*) is not associated with insecticide resistance or P450 expression in three strains of house fly. *Insect Biochem Mol Bio*. 2003;33(2):139-44. [https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(02\)00238-2](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(02)00238-2)
5. Liu Y, Chen Y, Wang N, Zhang S. The global prevalence of parasites in non biting flies as vectors: a systematic review and meta-analysis. *Parasit Vectors*. 2023;23;16(1):25. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05650-2>
6. Otu-Bassey IB, Efretuei GK, Mbah M. Gut parasites of medical importance harboured by *Musca domestica* in Calabar, Nigeria. *Trop Parasitol*. 2022;12(2)99-104. https://doi.org/10.4103/tp.tp_51_21
7. Nazni WA, Seleena B, Lee HL, Jeffery J, Rogayah TAR, Sofian MA. Bacteria fauna from the house fly, *Musca domestica* (L). *Trop Biomed*. 2005;22(2):225-31.
8. Adenusi AA, Adewoga TO. Human intestinal parasites in non-biting synanthropic flies in Ogun State, Nigeria. *Travel Med Infect Dis*. 2013;11(3):181-9. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2012.11.003>
9. Acevedo GR, Zapater M, Toloza AC. Insecticide resistance of house fly, *Musca domestica* L from Argentina. *Parasitol Res*. 2009;105(2):489-93. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1425-x>
10. Yamanel Ő, akır Ő. Türkiye'nin bazı karasinek (*Musca domestica* L.) popülasyonlarında organofosfatlı insektisidlerden metil paration ve diazinona karşı geliŐmiŐ direnç. *Türkiye Parazitol Derg*. 2004;28(4):210-4.
11. İlimizin Konumu. [<https://aksaray.csb.gov.tr/ilimiz-konumu-i-96425> (EriŐim tarihi: 13.Aralık.2022)].
12. Dzieciol M, Fricker M, Wagner M, Hein I, Ehling-Schulz M. A novel diagnostic real-time PCR assay for quantification and differentiation of emetic and non-emetic *Bacillus cereus*. *Food Control*. 2013;32(1):176-85. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.010>
13. Shannon KE, Lee DY, Trevors JT, Beaudette LA. Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. *Sci Total Environ*. 2007;382(1):121-9. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.02.039>
14. Dlger D, Ekici S, Albuz , Pakdemirli A. Investigation of nasal *Staphylococcus aureus* carriage in hospital employees and rapid detection of PVL and *mecA* genes by RT-PCR. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. 2020;31(1):47-51. <https://doi.org/10.35864/evmd.731631>
15. Pernica JM, Moldovan I, Chan F, Slinger R. Real-time polymerase chain reaction for microbiological diagnosis of parapneumonic effusions in Canadian children. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2014;25(3):151-4. <https://doi.org/10.1155/2014/757963>
16. Garcés-Sánchez G, Wilderer PA, Munch JC, Horn H, Lebuhn M. Evaluation of two methods for quantification of *hsp70* mRNA from the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* by reserve transcription real-time PCR in environmental samples. *Water Res*. 2009;43(10):2669-78. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.03.019>
17. Roy S, Kabir M, Mondal D, Ali IK, Petri WA Jr, Haque R. Real-time PCR assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Microbiol*. 2005;43(5):2168-72. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2168-2172.2005>
18. Verweij JJ, Blangé RA, Templeton K, et al. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2004;42(3):1220-3. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1220-1223.2004>
19. Verweij JJ, Canales M, Polman K, et al. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009;103(4):342-6. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.12.001>
20. Ahmadi E, Khajehali J, Jonckheere W, Van Leeuwen T. Biochemical and insecticidal effects of plant essential oils on insecticide resistant and susceptible populations of *Musca domestica* L. point to a potential cross-resistance risk. *Pestic Biochem Physiol*. 2022;184:105115. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105115>
21. Cossetin LF, Santi EMT, Garlet QI, et al. Comparing the efficacy of nutmeg essential oil and chemical pesticide against *Musca domestica* and *Chrysomya albiceps* for selecting a new insecticide agent against synanthropic vectors. *Exp Parasitol*. 2021;225:108104. <https://doi.org/10.106/j.exppara.2021.108104>
22. Taşkın V, Kence M. The genetic basis of malathion resistance in housefly (*Musca domestica* L) strains from Turkey. *Genetika*. 2004;40:1475-82.

23. De Jesús AJ, Olsen AR, Bryce JR, Whiting RC. Quantitative contamination and transfer of *Escherichia coli* from foods by houseflies, *Musca domestica* L (Diptera: Muscidae). Int J Food Microbiol. 2004;93(2):259-62.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.003>
24. Olsen AR, Hammack TS. Isolation of *Salmonella* spp. from the housefly, *Musca domestica* L., and the dump fly, *Hydrotaea aenescens* (Wiedemann) (Diptera: Muscidae), at caged-layer houses. J Food Prot. 2000;63(7):958-60.
<https://doi.org/10.4315/0362-028x-63.7.958>
25. Foterdar R. Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) in the transmission of *Vibrio cholerae* in India. Acta Trop. 2001;15;78(1):31-4.
[https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(00\)00162-5](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(00)00162-5)
26. Banjo AD, Lawal OA, Adeduji OO. Bacteria and fungi isolated from housefly (*Musca domestica* L.) larvae. African J Biotechnol. 2005;4(8):780-4.
27. Issa R. *Musca domestica* acts as transport vector hosts. Bull Natl Res Cent. 2019;43:73.
<https://doi.org/10.1186/s42269-019-0111-0>
28. Förster M, Klimpe S, Sievert K. The house fly (*Musca domestica*) as a potential vector of metazoan parasites caught in a pig-pen in Germany. Vet Parasitol. 2009;160:163-7.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.087>