

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ECHINOCOCCUS GRANULOSUS'UN
DOĞU VE GÜNEYDOĞU ANADOLU
BÖLGESİ İZOLATLARININ MOLEKÜLER
AYRIMI**

DOKTORA TEZİ

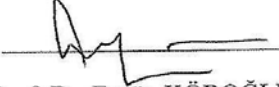
Armağan Erdem ÜTÜK

ELAZIĞ - 2008

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Necip İLHAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

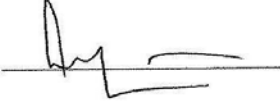
Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.


Prof. Dr. Ergün KÖROĞLU

Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

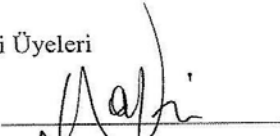
Prof. Dr. Ergün KÖROĞLU



Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

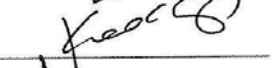
Prof. Dr. Nazir DUMANLI



Prof. Dr. Ergün KÖROĞLU



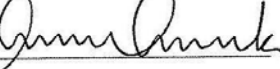
Doç. Dr. Kader YILDIZ



Doç. Dr. Hakan BULUT



Doç. Dr. Sami ŞİMŞEK



Bu tezi rahmetli annem Canan ÜTÜK' ün aziz hatırasına ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmalarım esnasında benden yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Ergün KÖROĞLU'na, örnek kişiliği ile bana yol gösteren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Nazir DUMANLI'ya, fakülte hayatımın her aşamasında bana destek olan hocam ve ağabeyim Doç. Dr. Sami ŞİMŞEK'e, laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan hocam Doç. Dr. Hakan BULUT'a, hocam Yrd. Doç. Dr. Cem Ecmel ŞAKİ'ye, babam Kemal ÜTÜK, rahmetli annem Canan ÜTÜK ve ablam Utku ÜTÜK'e, saha çalışmalarımda bana yardımcı olan Vet. Hek. Hilmi TAŞ ve Vet. Hek. İshak ÖZBEK'e, ayrıca çalışmalarına sağlamış oldukları maddi destekten dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırmalar Kurumuna (TÜBİTAK) teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI.....	i
ONAY SAYFASI.....	ii
İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLO LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ.....	3
3.1. <i>Echinococcus</i> Cinsinin Sınıflandırma, Morfoloji ve Biyolojisi.....	3
3.2. Echinococcosis'in Türkiye ve Dünyadaki Yaygınlığı.....	10
3.2.1. Türkiye'de <i>E.granulosus</i> 'un Son Konak ve Ara Konaklardaki Yaygınlığı.....	10
3.2.2. Dünyada <i>E.granulosus</i> 'un Son Konak ve Ara Konaklardaki Yaygınlığı.....	12
3.3. Hidatidosisin Ekonomik Önemi.....	12
3.4. Türler.....	14
3.5. Alt Türler.....	15
3.6. Suşlar.....	15
3.6.1. <i>Echinococcus granulosus</i> ' un Suşları.....	17
3.6.1.1. Evcil Koyun Suşu (G1).....	17
3.6.1.2. Tazmanya Koyun Suşu (G2).....	18
3.6.1.3. Manda Suşu (G3).....	19
3.6.1.4. At Suşu (G4).....	20
3.6.1.5. Sığır Suşu (G5).....	21
3.6.1.6. Deve Suşu (G6).....	22
3.6.1.7. Domuz Suşu (G7).....	23
3.6.1.8. İnsan Suşu (G9).....	24
3.6.1.9. Keçi Suşu.....	24
3.6.2. <i>E.granulosus</i> 'un Vahşi Yaşam Suşları.....	25
3.6.2.1. Geyik Suşu (G8) ve Fennoscandian Geyik Suşu (G10).....	25

3.6.2.2. Avustralya’da Keseli Hayvanlar ve Dingolar.....	26
3.6.2.3. Afrika Vahşi Yaşam Suşları.....	26
3.6.2.4. Yabani Tavşanlar.....	27
3.7.1. <i>E. multilocularis</i> , <i>E.oligarthrus</i> ve <i>E. vogeli</i>	28
3.7.1.1. <i>E. multilocularis</i> İçerisindeki İntraspesifik Varyasyon.....	29
3.7.1.2. <i>E. vogeli</i> ve <i>E. oligarthrus</i> İçerisindeki İntraspesifik Varyasyon.....	30
3.8. <i>Echinococcus</i> Tür ve Suşlarının Ayrımında Kullanılan Teknikler.....	30
3.9. <i>Echinococcus</i> Cinsinin Tiplendirilmesinde Kullanılan Moleküler Teknikler.....	31
3.9.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	31
3.9.2. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).....	32
3.9.3. PZR-RFLP.....	33
3.9.4. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PZR.....	34
3.9.5. PZR-Single Stranded Conformation Polimorphism (PZR-SSCP) Analizi.....	35
3.9.6. Dideoxy Fingerprinting (ddF).....	37
3.9.7. DNA Baz Dizi Analizi (Sequencing).....	38
3.10. <i>Echinococcus</i> Cinsi İçerisinde Bulunan Suşların Belirlenmesinin Pratik Önemi.	39
3.10.1. Bulaşma ve Kontrol Dinamikleri.....	39
3.10.2. Patogenesis ve Klinik Semptomlar.....	41
3.10.3. İmmunolojik Tanı ve Aşılama.....	41
3.10.4. Kemoterapi.....	42
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	44
4.1. Örneklerin Toplanması.....	44
4.2. Laboratuvar Çalışmaları.....	45
4.2.1. DNA Ekstraksiyonu.....	46
4.2.1.1. Ekstraksiyonun Standardizasyonu.....	46
4.2.1.2. Ekstraksiyon Aşaması.....	46
4.2.1.3. Ekstrakte Edilen Ürünlerdeki DNA Miktarının Belirlenmesi.....	47
4.2.2. Ribozomal Internal Transcribed Spacer 1 (ITS-1) ve Mitokondrial Sitokrom Oksidaz 1 (CO1) Geninin PZR ile Çoğaltılması.....	47
4.2.3. ITS-1 Genin RFLP Analizi (PZR-RFLP).....	49
4.2.4. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz 1 (CO1) Geninin Dizilenmesi.....	50
4.2.5. PZR İşleminde Kullanılan Ayraçlar.....	50

4.2.5.1 DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Ayraçlar.....	50
4.2.5.2. PZR Analizinde Kullanılan Ayraçlar.....	52
4.2.5.3 PZR-RFLP Analizinde Kullanılan Ayraçlar.....	53
4.2.5.4. Elektroforez İşleminde Kullanılan Solüsyonlar.....	55
5. BULGULAR.....	56
5.1. ITS-1 PZR Bulguları.....	57
5.2. ITS-1 RFLP Bulguları.....	59
5.3. Mitokondrial CO1 PZR Bulguları.....	63
5.4. Mitokondrial CO1 Genin Çift Yönlü DNA Dizisi Analizi Sonuçları.....	64
6. TARTIŞMA.....	66
7. KAYNAKLAR.....	76
8. EKLER	
Ek 1. <i>E.granulosus</i> 'un Erzurum Yöresi Sığır İzolatının CO1 Gen Dizisi.....	1
Ek 2. <i>E.granulosus</i> 'un Malatya Yöresi Sığır İzolatının CO1 Gen Dizisi.....	2
Ek 3. <i>E.granulosus</i> 'un Elazığ Yöresi Sığır İzolatının CO1 Gen Dizisi.....	3
Ek 4. <i>E.granulosus</i> 'un Elazığ Yöresi Keçi İzolatının CO1 Gen Dizisi.....	4
Ek 5. <i>E.granulosus</i> 'un Van Yöresi Sığır İzolatının CO1 Gen Dizisi.....	5
Ek 6. <i>E.granulosus</i> 'un Malatya Yöresi Koyun İzolatının CO1 Gen Dizisi.....	6
Ek 7. <i>E.granulosus</i> 'un Malatya Yöresi Koyun İzolatının CO1 Gen Dizisi.....	7
Ek 8. <i>E.granulosus</i> 'un Malatya Yöresi Koyun İzolatının CO1 Gen Dizisi.....	8
Ek 9. <i>E.granulosus</i> 'un Elazığ Yöresi Keçi İzolatının CO1 Gen Dizisi.....	9
Ek 10. <i>E.granulosus</i> 'un Elazığ Yöresi Keçi İzolatının CO1 Gen Dizisi.....	10
Ek 11. <i>E.granulosus</i> 'un Elazığ Yöresi Keçi İzolatının CO1 Gen Dizisi.....	11
9. ÖZGEÇMİŞ	

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1. <i>E.granulosus</i> 'un farklı suşlarının son konak ve ara konakları ile insanlara karşı enfektivitesi ve coğrafi dağılımları.....	28
Tablo 2. <i>E.multilocularis</i> 'in farklı izolatlarının son konak ve ara konak ile insanlardaki enfektivitesi ve coğrafi dağılımları.....	29
Tablo 3. Toplanan izolatların illere ve hayvan gruplarına göre dağılımı.....	45
Tablo 4. <i>Echinococcus</i> cinsinin PZR analizinde ve tiplendirilmesinde kullanılan primerler.....	48
Tablo 5. Mikroskobik inceleme sonrası fertil ve steril kistlerin hayvan gruplarına göre dağılımı.....	56
Tablo 6. Çalışmada incelenen izolatların organlara göre dağılımı.....	57
Tablo 7. Ribozomal ITS-1 gen bölgesi PZR-RFLP tekniği ile incelenen izolatların sayısı ve illere göre dağılımı.....	57
Tablo 8. Mitokondrial CO1 gen bölgesinin DNA dizisi belirlenen izolatlarının sayısı ve illere göre dağılımı.....	58
Tablo 9. Bakısı yapılan izolatların coğrafik kökeni, konak orijini ve diğer özellikleri.....	65

	ŞEKİL LİSTESİ	Sayfa
Şekil 1.	<i>E.granulosus</i> ve <i>E.multilocularis</i> 'in yaşam siklusu.....	6
Şekil 2.	Kistik echinococcosisin dünyadaki yaygınlığı.....	11
Şekil 3.	Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde örneklerin toplandığı iller.....	45
Şekil 4.	Ribozomal ITS-1 gen bölgesi.....	49
Şekil 5.	Mitokondrial CO1 gen bölgesi.....	49
Şekil 6.	<i>E.granulosus</i> 'un koyun, sığır ve keçi izolatlarının ITS-1 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucunda oluşan bandların görünümü.....	59
Şekil 7.	<i>CfoI</i> ile kesimi yapılan ITS-1 PZR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jel görüntüsü.....	60
Şekil 8.	<i>AluI</i> ile kesimi yapılan ITS-1 PZR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jel görüntüsü.....	61
Şekil 9.	<i>MspI</i> ile kesimi yapılan ITS-1 PZR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jel görüntüsü.....	62
Şekil 10.	<i>RsaI</i> ile kesimi yapılan ITS-1 PZR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jel görüntüsü.....	63
Şekil 11.	<i>E.granulosus</i> 'un koyun, sığır ve keçi izolatlarının Mitokondrial CO1 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucunda oluşan 446 bp'lik bandın görüntüsü.....	64

1. ÖZET

Kistik echinococcosis Türkiye’de endemik bir paraziter zoonozdur. Günümüzde Türkiye’de *Echinococcus granulosus*’un suşları hakkında detaylı bilgi bulunmamaktadır. Endemik bir bölgede etkin eradikasyon ve kontrol programlarının sağlanabilmesi için dominant suş ya da suşlar bilinmelidir. Bu amaçla Türkiye’nin Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde bulunan Elazığ, Malatya, Erzurum, Van, Diyarbakır ve Şanlıurfa illerindeki kesimhanelerden 7 keçi, 19 sığır ve 179 koyun olmak üzere toplam 205 hidatik kist izolatu toplanmıştır. Bu izolatlardaki genetik varyasyonu belirlemek amacıyla bütün örneklerin ribozomal ITS-1 (Internal Transcribed Spacer) gen bölgeleri PZR-RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriction Fragment Length Polymorphism) tekniği ile incelenmiştir. Tüm izolatların aynı band profiline sahip olması sonucunda 6 sığır, 4 koyun ve 4 keçi izolatının mitokondrial CO1 (cytochrome oxidase 1) gen bölgesinin dizi analizi yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda bakısı yapılan üç farklı türe ait 205 izolatın hepsinin yaygın koyun suşu (G1) olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Echinococcus granulosus*, PZR-RFLP, DNA dizileme, Türkiye.

2. ABSTRACT

Cystic echinococcosis is an endemic parasitic zoonosis in Turkey. There is still no detailed molecular data about the strains of *Echinococcus granulosus* in Turkey. Dominant strain or strains have to be known for effective eradication and control programs in an endemic area. For this aim 205 hydatid cyst isolates contained 7 goats, 19 cattle and 179 sheep were collected from local abattoirs in Elazig, Malatya, Erzurum, Van, Diyarbakir and Sanliurfa provinces in the East and Southeast Anatolian regions of Turkey. In order to determine genetic variation, ribosomal ITS-1 (Internal Transcribed Spacer) gen regions of all isolates were analysed by PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism). Consequence of the same banding pattern of all isolates mitochondrial CO1 (cytochrome oxidase 1) gene of some selected isolates including 6 cattle, 4 sheep and 4 goat were sequenced. The result of this study demonstrated that all analysed isolates were belonging to the common sheep strain (G1).

Key Words: *Echinococcus granulosus*, PCR-RFLP, DNA sequencing, Turkey.

3. GİRİŞ

Günümüzde *Echinococcus* cinsi içerisinde *Echinococcus granulosus*, *E.multilocularis*, *E.oligarthrus* ve *E.vogeli* olmak üzere taksonomik olarak doğrulanan dört farklı tür bulunmaktadır. Son yapılan moleküler çalışmalarda koyun, Tazmanya koyun ve manda suşunun (G1, G2, G3) *E.granulosus* sensu stricto adıyla beşinci, at suşunun (G4) *E.equinus* adıyla altıncı, sığır suşunun (G5) *E.ortleppi* adıyla yedinci tür olabileceği bildirilmiştir. Ancak bu genotiplerin suş mu, *E.granulosus*'un alt türleri mi yoksa bağımsız türler mi oldukları konusunda henüz yerleşmiş ortak bir görüş bulunmamaktadır. Sadece Çin'de lokal bir bölgede tespit edilen *E.shiquicus*'un yeni bir tür olduğu ifade edilmektedir (33, 37, 118, 121, 122, 137, 149, 155, 176).

3.1. *Echinococcus* Cinsinin Sınıflandırma, Morfoloji ve Biyolojisi

Echinococcus cinsinin sınıflandırmadaki yeri aşağıdaki gibidir (137, 149).

Ülkealtı: Metazoa

Alem: Platyhelminthes

Sınıf: Cestoda

Alt Sınıf: Eucestoda

Takım: Cyclophyllidea

Aile: Taeniidae (Ludwig, 1886)

Cins: *Echinococcus* (Rudolphi, 1801)

Klasik sınıflandırmada yer alan dört türün erişkinleri, son konak karnivorların ince bağırsaklarında, metacestodları ise omnivorların ve

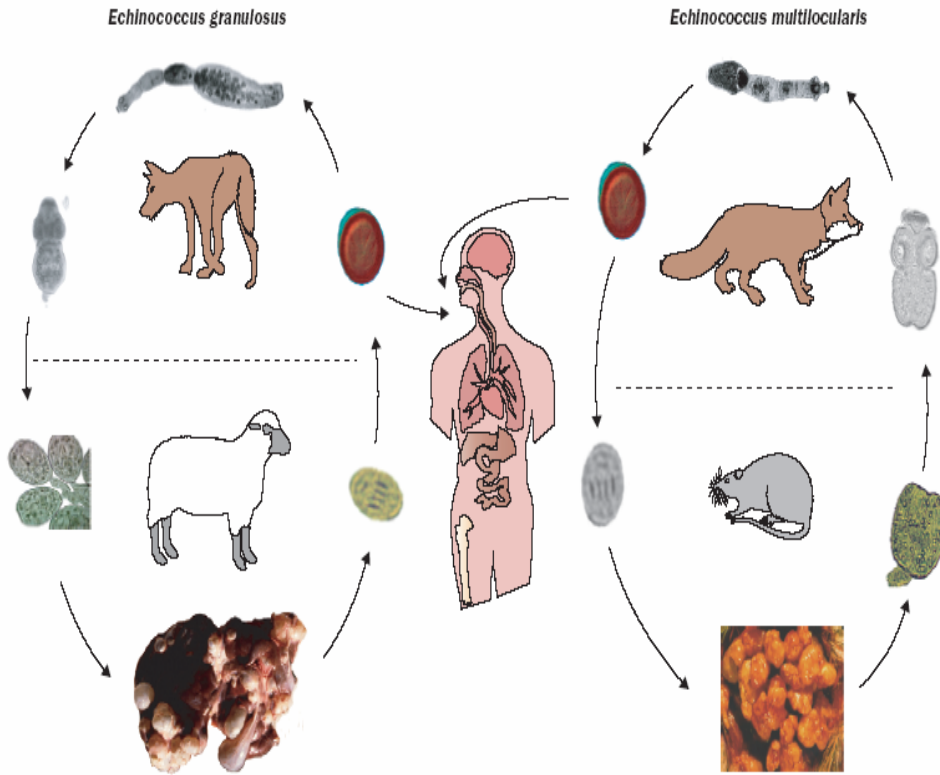
herbivorların karaciğer ve akciğerleri başta olmak üzere çeşitli organ ve dokularında bulunmaktadır. İnsanlar bu dört türün yumurtalarına duyarlı olup metasestodlar insanların çeşitli organ ve dokularında gelişerek echinococcosis'e neden olmaktadır. *Echinococcus granulosus* ve *E.multilocularis*'in sebep olduğu kistik ve alveolar echinococcosis oldukça yaygın olmasına rağmen *E.oligarthrus* ve *E.vogeli*'nin oluşturduğu polycystic echinococcosis Orta ve Güney Amerika ile sınırlıdır. Her ne şekilde olursa olsun bütün *Echinococcus* türleri insanlarda oldukça ciddi ve bazen ölümcül olabilen hastalık tablosuna yol açarken, hayvanların çeşitli organ ve dokularında oluşturduğu yapısal ve fonksiyonel bozukluklar nedeniyle de ekonomik kayıplara neden olmaktadır (6, 96).

Taenia cinsinde bulunan diğer cestodlardan farklı olarak erişkin bir *Echinococcus*'un uzunluğu nadiren 7 mm'yi aşmakta olup genellikle 3-5 adet halkaya sahiptir. Hermafrodit olan erişkin parazitler, son konakların bağırsak mukozasına oldukça sıkı bir şekilde tutunarak yaşamlarını burada sürdürürler. Parazitin seksüel gelişimi 3-4 hafta içerisinde tamamlanmakta, etkenin tür ve suşuna bağlı olarak yumurta üretimi 28. günde başlayabilmektedir. Yumurta ihtiva eden gebe halkalar son konakların dışkıları ile dışarı atılmakta, enfekte konak dışkısında halkalara ilave olarak serbest yumurtalara da rastlanabilmektedir. Dışkı ile dışarı atılan yumurtaların tamamen embriyonlanmış ve enfektif olduğu düşünülmektedir. Ancak dışkıda olgunlaşmamış ve dış ortamda gelişerek enfektif özellik kazanan yumurtalara da rastlamak mümkündür. Dışarı atılan yumurtalar keratinize embriyofor yapısından dolayı olumsuz koşullara oldukça dayanıklıdır. Ara konaklar canlı ve embriyonlu yumurtaları oral yolla ve nadiren de solunum yoluyla alarak enfeksiyona yakalanmakta ve bu konakların

çeşitli organ ve dokularında metasesetodlar gelişmektedir. Alınan yumurtalar ara konağın mide ve ince bağırsaklarında açılmakta ve onkosfer serbest kalmaktadır. Serbest kalan onkosfer çengelleri ve salgıladığı histolitik enzimler vasıtası ile hızla villus epiteline penetre olmakta ve lamina propriyaya ulaşmaktadır. Onkosfer, venül ve lakteallere ulaştığında pasif olarak genellikle karaciğer ve akciğerlere, nadiren böbrek, dalak, beyin, kaslar ve diğer organ ve dokulara taşınmaktadır. Ara konaklarda etkilenen organ ve dokular, *Echinococcus* türüne ve suşuna göre değişmektedir. Örneğin, koyun (G1) ve at suşu (G4) ara konaklarda özellikle karaciğere yerleşirken, sığır (G5) ve deve suşu (G6) akciğerlere yerleşmektedir. Onkosfer bir kez lokalizasyon yerine ulaştıktan sonra, burada aseksüel olarak çoğalan kistik metasesetodu oluşturmaya başlamaktadır. Oluşan kist yapısı ise *Echinococcus* türüne göre değişmektedir. Tüm türlerde kistlerin ortak özelliği, içeride germinal dışarıda ise laminer tabakaya sahip olmasıdır. *Echinococcus multilocularis* haricindeki diğer türlerde laminer tabakayı çevreleyen ve konak tarafından oluşturulan fibröz bir adventisiya tabakası bulunmaktadır. Metasesetodun gelişim süresi parazitin türüne, suşuna, konağın türüne, ırkına, yaşına, cinsiyetine ve bağışıklık durumuna göre farklılıklar arz etmektedir. *Echinococcus granulosus* ile doğal enfekte koyun gibi ara konaklarda kist gelişimi ve protoskoleks oluşumu iki yıla kadar uzayabilirken, *E. multilocularis* ile enfekte rodentlerde 2-4 ay gibi kısa bir sürede oluşabilmektedir. İçerisinde protoskoleks bulunan kistler fertil; bulunmayan kistler ise steril kist olarak adlandırılmaktadır (6, 96, 152).

Echinococcus granulosus'ta metasesetodun aseksüel gelişimi tamamen endojendir. Ancak *E. multilocularis*'de konağa ait adventisiya tabakası

olmadığından dolayı hem endojen hem de eksojen gelişim görülebilmektedir. Bu da larval *E.multilocularis*'e kendisini çevreleyen konak dokusu içerisinde hem infiltratif olarak hem de metasestodtan kopan germinal hücrelerin kan ve lenf dolaşımına geçmesi durumunda diğer organ ve dokulara metastazik olarak yayılma olanağı vermektedir. *Echinococcus oligarthrus* ve *E.vogeli*'de de eksojen gelişim görülmesine rağmen bu gelişim konağa ait adventisiya tabakası ile sınırlandırılmaktadır. Son konaklar protoskoleks ihtiva eden kistleri yemek sureti ile enfeksiyona yakalanmaktadır. Alınan protoskoleksler birkaç saat içerisinde ince bağırsak villusları arasına girmekte ve buraya tutunarak erişkin parazitleri oluşturmaktadır (6, 96, 152).



Şekil 1. *Echinococcus granulosus* ve *E.multilocularis*'in yaşam siklusu (96).

Kistik echinococcosiste son konaklarda çok yoğun enfeksiyonlarda dahi herhangi bir klinik semptom görülmemektedir. Ara konaklarda ise, kistlerin küçük olduğu dönemlerde hastalık asemptomatik olarak seyretmekte; ancak verim kayıpları ortaya çıkmaktadır. Fakat insan gibi yaşam süresi uzun olan ara konaklarda kistler büyük boyutlara ulaşmakta, yaptıkları basınç ve tıkanma etkisi sonucunda klinik tablo ortaya çıkmaktadır. Ancak böbrek, kalp, pankreas, merkezi sinir sistemi, göz ve kemik iliğine yerleşen küçük kistler dahi klinik tablo oluşumuna yol açabilmektedir. Semptomlar, kistin lokalize olduğu organa göre değişmektedir. Karaciğerdeki kistler kan ve safra akışının engellenmesine bağlı olarak reaktif hepatit, sarılık, iştahsızlık ve ishale; akciğerdekiler solunum güçlüğü, atalektazi ve sekonder enfeksiyonlara; beyindeki kistler ensefalitise; kalptekiler kalp yetmezliğine; kemiktekiiler topallık ve spontan kemik kırılmalarına neden olabilmekte, ağır enfeksiyonlarda ise konaklarda kaşeksi ve anemi şekillenebilmektedir. Çeşitli travmatik nedenler ve operasyonlar sırasında kistin patlaması sonucunda serbest kalan protoskoleksler vücudun çeşitli bölgelerine giderek sekonder kistleri oluşturabilmektedir. Bazı durumlarda ise sekonder kistler oluşmadan Tip I aşırı duyarlılık reaksiyonu sonucunda ani ölümler görülebilmektedir (6, 58, 96).

Echinococcosisin son konaklardaki teşhisinde arekolin purgasyon yöntemi, serumda antikor aranması, dışkıda koproantijenlerin aranması, dışkıda parazit DNA'sının aranması ve nekropsi gibi tekniklerden yararlanılırken; hastalığın ara konaklardaki teşhisinde radyoloji, ekografi, manyetik rezonans görüntüleme gibi fiziksel görüntüleme yöntemlerinden ve Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), İndirekt Flouresan Antikor (IFA), İndirekt Hemaglutinasyon (IHA),

Lateks Aglutinasyon Testi (LA), İmmunoelektroforez (IE), Western Blotting (WB) gibi serolojik testlerden yararlanılmaktadır (6, 96, 141-143).

Günümüzde metasestodlara karşı etkin kemoterapotikler bulunmadığından, en radikal tedavi kistlerin operatif olarak uzaklaştırılmasıdır. Ancak opere edilemeyen vakalarda, postoperatif profilaksi amacıyla ve ameliyatlarda sekonder hidatidosis riskini azaltmak için praziquantel ve benzimidazol (albendazol ve mebendazol) grubu ilaçlardan yararlanılmaktadır (96).

Kist hidatikten korunmak amacıyla aşı geliştirme çalışmalarında oldukça önemli adımlar atılmıştır. Yapılan çalışmalarda, onkosferal cDNA kütüphanelerinden seçilen cDNA klonları, *Escherichia coli*' de glutatyon S transferaz (GST) ile füzyon proteini olarak exprese edilmiştir. Bu klonlardan bağışıklığı en yüksek düzeyde uyaran klonun Eg95 klonu olduğu ve *E.granulosus*'a karşı aşılama çalışmalarında başarı ile kullanılabileceği bildirilmiştir. Eg95 aşısının Saponin, Quil A ve ISA 70 olmak üzere üç farklı adjuvantla formüle edilmesi sonucunda %96-98 oranında koruma sağladığı belirtilmiştir (78,79).

Chow ve ark. (28)'nın yaptığı çalışmada, Eg95 proteinini kodlayan genin en az yedi üyeden oluşan bir gen ailesine ait olduğu tespit edilmiştir. Bunlardan aşılama amacı ile kullanılabilecek genin Eg95-1 olduğu ve diğer üç gen ile aynı proteini kodladıkları belirlenmiştir. Eg95-5 ve Eg95-6 genlerinin kodladıkları proteinlerin ise farklı olduğu tespit edilmiştir. Ancak bu proteinlerin bağışıklığı uyarıp uyarmadıkları tam olarak bilinmemektedir. Eg95-7 geninin ise bir pseudogen olduğu belirtilmiştir. Eg95-1 ile aynı proteini kodlayan diğer üç genin genomik yapılarının yüksek derecede korunmuş olduğu tespit edilmiştir. Bu üç

gen ile Eg95-1 geni arasında nükleotid farklılıklarının bulunduğu, ancak bu farklılıkların genlerin kodlanmayan bölgelerinde olduğu bildirilmiştir. Eg95-4 geninin ekzon 3'ünde tespit edilen nükleotid yer değiştirmelerinin ise kodladıkları proteinde herhangi bir değişikliğe yol açmadığı görülmüştür. *E. granulosus*'un farklı suşlarının Eg95 geninde meydana gelebilecek herhangi bir varyasyonun Eg95 aşısının etkinliğini azaltabileceği düşünülmüş, ancak farklı coğrafik bölgelerde uygulanan Eg95 aşısının yüksek düzeyde koruma sağladığı bildirilmiştir (80).

E.multilocularis'de, Eg95'e homoloji gösteren Em95 proteini tanımlanmış ve bu proteinin amino asit dizilerinin *E.granulosus*'un Eg95-1 ve Eg95-6 proteinlerinin aminoasit dizilerine sırası ile %80 ve %84 oranında benzerlik gösterdiği ve challenge enfeksiyonlara karşı farelerde koruyucu bağışıklık oluşumunu sağladığı bildirilmiştir (49, 80).

Ancak aşılama yöntemlerinin henüz uygulanmadığı bölgelerde hidatidosisin yayılmasını önlemek amacıyla;

- a) Köpeklerde parazitin prepatent süresi göz önüne alınarak 1.5-2 aylık periyodlarla antiparaziter ilaçlar (Praziquantel, Arecoline hydrobromide, Niclosamide, Bunamidine hydrochloride) uygulanmalıdır.
- b) Tedaviyi takip eden 3-5 gün boyunca dışkı imha edilmelidir (toplanarak yakılmalı veya derince toprağa gömülmelidir).
- c) Köpek parazitleriyle mücadele edilmesinin yanı sıra yabani karnivorlar da kontrol altına alınmalıdır.
- d) Enfekte organların mezbahaların etrafına rastgele atılması önlenmeli ve mezbahalara yakma fırını üniteleri kurulmalıdır.

- e) Kaçak hayvan kesimleri engellenmelidir.
- f) Enfekte köpek dışkısıyla bulaşabilecek sebze ve meyveler yenilmeden önce bol suyla yıkanmalıdır.
- g) İnsanların hijyen ve sanitasyon hakkında eğitimine önem verilmeli, ayrıca halkın zoonoz hastalıklar konusunda yazılı ve görsel basın tarafından bilgilendirilmesi sağlanmalıdır (3).

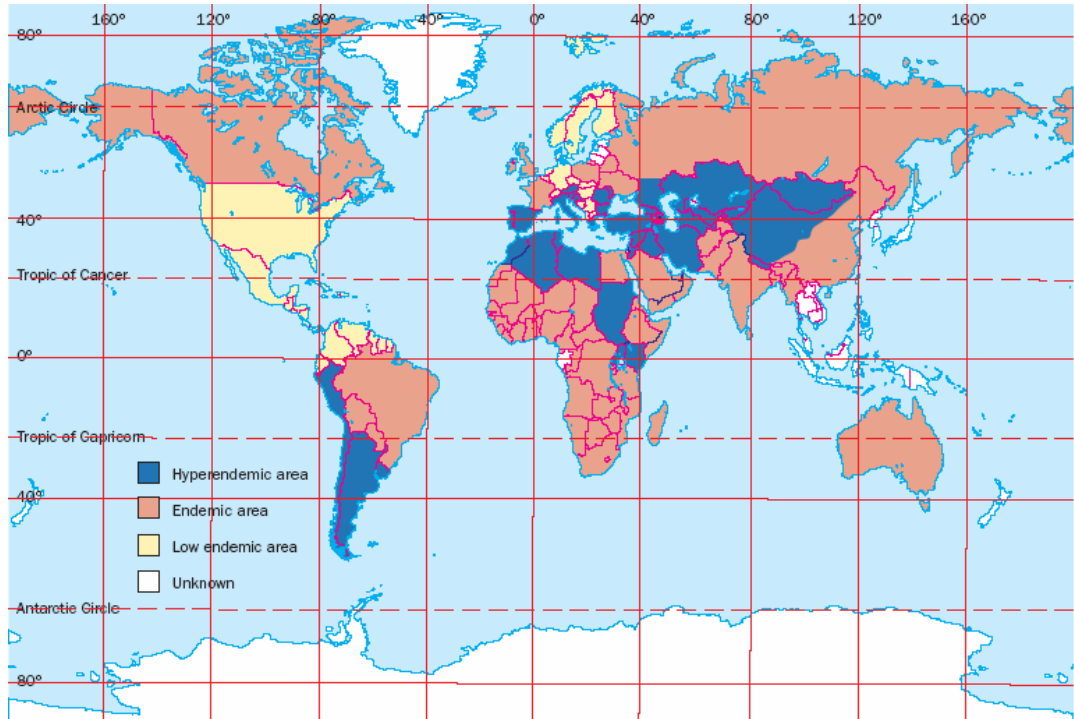
3.2. Echinococcosis'in Türkiye ve Dünyadaki Yaygınlığı

3.2.1. Türkiye'de *Echinococcus granulosus*'un Son Konak ve Ara Konaklardaki Yaygınlığı

Yapılan çalışmalarda *E.granulosus*'un Ankara'da köpeklerde %1-54.5, sığırlarda %9,4-18.6, koyunlarda %7.2-63.2, keçilerde %1.6-9, atlarda %0.78; Kırıkkale'de sığırlarda %14.16; Bursa'da köpeklerde %36, koyunlarda %30-50.7; Erzurum'da sığırlarda %46, koyunlarda %71; İstanbul'da mandalarda % 22.3; Trakya'da koyunlarda %3.5; İzmir'de köpeklerde % 5.5, sığırlarda %56.5, koyunlarda %22.5; Kayseri'de köpeklerde %24; Kars'ta köpeklerde %40.5, sığırlarda %24.7, koyunlarda %48.4, keçilerde %25.1; Konya'da köpeklerde %28.3, sığırlarda %5.6- 11.2, koyunlarda %51.9-79.6, keçilerde %5.9-29.3; Samsun'da sığırlarda %21.1; Elazığ'da köpeklerde %3.33, koyunlarda %62.65; Sivas'da köpeklerde %28, sığırlarda %4.5-20.4, koyunlarda %32.4-33.4; Van'da sığırlarda %19.4-37.8, koyunlarda %32.9-68.7, keçilerde %4.5-32.6 oranlarında yaygınlık gösterdiği bildirilmiştir (4, 107, 145, 163, 180).

Mimioğlu (100) Türkiye’de yapılan çeşitli çalışmalarda hidatidosisin kasaplık hayvanlardaki yayılışının %40-50 arasında, Doğanay (32) ise hayvan cinsine ve bölgelere göre değişmekle birlikte bu oranın %2-52.3 arasında olduğunu bildirmiştir.

Elazığ, Malatya, Muş, Bingöl, Van, Erzincan, Erzurum ve Kars illerinde sığırlarda hidatidosisin seroprevalansını belirlemek amacı ile yapılan bir çalışmada ELISA ve IFA ile ortalama seroprevalansın sırayla %63.3 ve %54.7 olduğu görülmüştür. İllere göre ortalama seroprevalans ise Elazığ’da %59.9, Malatya’da %54.1, Muş’da %81.3, Bingöl’de %64.6, Bingöl’de %69.5, Erzincan’da %57.3, Erzurumda %43.9 ve Kars’da %43.3 olarak belirlenmiştir. Ayrıca Elazığ’da yapılan başka bir çalışmada koyunlarda hidatidosisin seroprevalansı ELISA ile %62, Western Blot ile %66.4 olarak bulunmuştur (140, 141).



Şekil 2. Kistik echinococcosisin dünyadaki yaygınlığı (96).

3.2.2. Dünyada *Echinococcus granulosus*'un Son Konak ve Ara Konaklardaki Yaygınlığı

Yapılan çeşitli çalışmalarda *E.granulosus*'un Kuzey Amerika'da domuzlarda %0.27, geyiklerde %2; Güney Amerika'da köpeklerde %2.1-19.7, sığırlarda %0.9, koyunlarda %0.47-18, evcil domuzlarda %0.23; Avrupa'da köpeklerde %1-8.1, tilkilerde %1.8-35, sığırlarda %0.04-70, koyunlarda %1.2-100, keçilerde %15.4-65, yaban domuzlarında %3.5, evcil domuzlarda %0.001-20.8, atlarda %1.7-9.3, geyiklerde %0.013-2.6; Afrika Kıtasında köpeklerde %22-72, sığırlarda %0.002-46, koyunlarda %0.3-96.3, keçilerde %0.05-56.4, evcil domuzlarda %0.003, develerde %2-61.4; Asya kıtasında köpeklerde %10.2-48, tilkilerde %5-48.7, sığırlarda %0.05-38.9, koyunlarda % 2.1-71, keçilerde % 2.2-12.7, evcil domuzlarda %7.7, develerde %4.7-58.9, geyiklerde %2.1; Avustralya kıtasında köpeklerde %86.9-100, tilkilerde %7-50, koyunlarda %0.66, yaban domuzlarında %18.9-49 arasında yaygın olduğu belirlenmiştir (4).

3.3. Hidatidosisin Ekonomik Önemi

Hidatidosis çiftlik hayvanlarında özellikle karaciğer gibi organların imha edilmesi ve verim düşüklüğüne neden olması, insanlarda ise tıbbi tedavi, morbidite ve mortaliteye yol açması bakımından önemlidir. Hidatidosise bağlı olarak hayvanlarda önemli bir klinik belirti görülmemekte, ancak et ve süt veriminde azalma, yün kalitesinde düşüklük, kısırılık oranında artış ve hepsinden önemlisi de kistli organların ve özellikle karaciğer ve akciğerlerin atılması sonucu büyük ekonomik kayıplar meydana gelmektedir (68, 158).

Nitekim, Türkiye’de Tarım Bakanlığının 1968 yılı bülteninde hidatidosisin koyun ve keçilerde yaygınlık oranı %30 olarak belirtilmiş ve o yılki fiyatlara göre et, süt ve yapağı kaybından ileri gelen zararın sırasıyla yaklaşık 43, 51 ve 81 milyon, ölümlerden ileri gelen zararın ise 86 milyon lira olduğu bildirilmiştir. Yine parazitli hayvanların vücut direncinin kırılmasından dolayı diğer salgın hastalıklara daha kolay yakalandıkları ve parazitlerin genel olarak hayvanlarda %30 oranında verim düşüklüğüne neden olduğu belirtilmiştir. Merdivenci (99) Vibe’ye atfen, sağlıklı koyunlarla karşılaştırıldığı zaman hidatidosisli koyunlarda et veriminde %10.4, yağ veriminde %19, süt veriminde %56-62, yün veriminde %9.5 azalma olduğunu ve her 100 koyundan 12’sinin yavru attığını belirtmiştir. Kist hidatikli organların atılmasıyla ülkemizde sadece 1976-1978 yılları arasında hayvansal protein kaybının 3.7 ton ve bu kaybın o günkü parasal değerinin 300 milyon lira dolayında olduğu hesaplanmıştır. Van Et ve Balık Kurumu Kombinasında 1981-1990 yılları arasında kesimi yapılan 172608 küçükbaş hayvanın %15.9’unun karaciğerinin hidatidosis nedeniyle imha edildiği ve milyarlarca liralık bir ekonomik kaybın olduğu bildirilmiştir. 1992-1993 yıllarında Konya Et ve Balık Kurumu Kombinası’nda hidatidosis nedeniyle imha edilen sakatatların neden olduğu mali kaybın 330.250.000 TL (11.000 USD) olduğu saptanmıştır. Kars’ta bakısı yapılan 5813 sığır, 2742 koyun, 215 keçi ve 138 manda olmak üzere toplam 8908 hayvanda kist hidatik nedeniyle oluşan ekonomik kaybın 1993 yılı birim fiyatlarıyla 170 milyon TL (20.000 USD) olduğu, bu fiyatlara hayvanlarda oluşan verim düşüklüğünden ileri gelen kayıpların dahil edilmediği bildirilmiştir (29, 32, 68, 98, 146, 157, 164).

Gelir düzeyi düşük olan ülkelerden biri olan Uruguay'da hidatidosisten ileri gelen ekonomik kayıplar araştırılmış ve yıllık olarak imha edilen koyun karaciğerlerinin 146.300 USD, ortalama %5'lik karkas kaybının 1.440.000 USD, yapağı kaybının 1.418.560 USD, fertilité bozukluğunun (yavru atma vb.) 2.151.052 USD olmak üzere sadece koyun hidatidosisine bağılı kaybın toplam 5.155.912 USD civarında olduğu, bu oranlara sığırlardaki kayıplar ile insanlardaki sağıık giderleri de eklenince yıllık kaybın 2.9 ile 22.1 milyon USD arasında değııştiğı saptanmıştır. Hidatidosis kaynaklı yıllık ekonomik kaybın Galler'de 1-6.5 milyon, Ürdün'de ise 3.9 milyon USD olduğu kaydedilmiş; yine Ürdün'de yapılan başka bir çalışmada, hidatidosisin enfekte koyun başına neden olduğu mali kaybın 4 USD olduğu hesaplanmıştır. İtalya'nın Sardunya bölgesindeki koyunların ortalama %80'inin hidatik kist ile enfekte olduğu, bunun da yıllık 20 milyar İtalyan Lireti ekonomik kayba yol açtığı hesaplanmıştır (1, 10, 68, 158-160).

3.4. Türler

Echinococcus (Rudolphi, 1801) cinsinin nomenklatür ve sınıflandırması uzun zamandan beri tartışmaya açıktır. *Echinococcus granulosus*'un yaşam siklusu deneysel olarak 1852 yılında Von Siebold tarafından ortaya konulmuştur. 1855 yılında iki farklı hidatik kist tanımlanmıştır. Ancak *E.granulosus*'un kistik hidatidosis hastalığı etkeni olduğunu ve *E. multilocularis* Leuckart, 1863'ün alveolar hidatidosis hastalığı etkeni olduğunu savunan görüş, 1957 yılında Vogel'in *E. multilocularis*'in yaşam siklusunu deneysel olarak açıklamasına kadar kabul görmemiştir. 1910 ve 1970 yılları arasında 14 farklı *Echinococcus* türü

tanımlanmış, bu türlerden sadece *E.oligarthus* (Diesing, 1863) ve *E.vogeli* (Rausch ve Bernstein, 1972) geçerli türler olarak statülerini koruyabilmiş ve diğer türlerin geçersiz olduğu ortaya konulmuştur. Bu nedenle günümüzde *E.granulosus*, *E.oligarthus* *E.multilocularis* ve *E.vogeli* olmak üzere kabul gören 4 tür bulunmakta, *E.granulosus sensu stricto*, *E.equinus* ve *E.ortleppi*'nin ise tür mü yoksa suş mu olduğu konusundaki tartışmalar devam etmekle birlikte *E.shiquicus* yeni bir tür olarak kabul edilmektedir (122, 152, 155, 176).

3.5. Alt Türler

Bugüne kadar *Echinococcus* cinsinde 10 farklı *E.granulosus* ve 3 farklı *E.multilocularis* alt türü tanımlanmıştır. *E.granulosus* alt türlerinden *E.granulosus granulosus* dışında kalan alt türler (*E.g.canadensis*, *E.g.newzealandensis*, *E.g.equinus*, *E.g.borealis*, *E.g.lycaontis*, *E.g.felidis*, *E.g. ortleppi*, *E.g.africanus*, *E.g.dusicyontis*) günümüzde geçersiz olarak kabul edilmektedir. *E.multilocularis*'in, *E.multilocularis multilocularis*, *E.m.sibiricensis* ve *E.m.kazakhensis* olarak adlandırılan 3 alt tür ise geçerliliğini hala korumaktadır (33, 69, 154).

3.6. Suşlar

Günümüzde moleküler verilerin filogenetik analizleri sonucunda suşların taksonomik statüsünün yeniden gözden geçirilmesinin gerekliliği ortaya çıkmıştır. *Echinococcus* cinsi içerisinde bulunan farklı suşların belirlenmesi hidatid hastalığının epidemiyoloji ve kontrolü açısından büyük önem arz etmektedir. Suşlar “bir veya daha fazla sayıda özelliği ile ayırt edilebilen tür toplulukları”,

“morfolojik ve biyolojik özellikleri bakımından ayrılan lokal topluluklar” ve “farklı konak türleri ile sınırlı intraspesifik varyantlar” olarak tanımlanmıştır. Ancak *Echinococcus* türleri için en ideal suş tanımı “aynı türün diğer gruplarından gen frekansları yönünden ve echinococcosisin epidemiyoloji ve kontrolünde aktüel veya potansiyel öneme sahip bir veya daha fazla karakter yönünden istatistiksel olarak farklılık gösteren varyantlar” şeklindedir. Bu tanımın en büyük avantajı tanımın uygulanabilirliğidir. Gen frekanslarındaki farklılıklar suşlar arasında sınırlı bir gen akışının bulunduğu dair ölçülebilir ve güvenilir deliller sağlamaktadır. Bu sınırlı gen akışı suşların ayırımında pratik öneme sahip olan karakterlerdeki farklılıkların genetik temellerinin anlaşılmasında bir belirteç olarak kullanılabilir. Bu tanımdaki suş kavramı pratik bir tanımlayıcı olup evrimsel bir birimi ya da taksonomik bir grubu ifade etmemektedir. Bu tanımlamadan çıkan sonuca göre bir suş, bir veya daha fazla populasyon ihtiva edebilir. Örneğin *E.granulosus*’un evcil koyun suşu dünyanın farklı bölgelerindeki koyunları enfekte eden populasyonlardan oluşmaktadır. Hiç şüphesiz ki bu populasyonlar arasındaki gen değişimi sınırlıdır ve bu populasyonlar gen frekansları bakımından farklılık gösterebilirler, ancak bu populasyonlar pratik öneme sahip karakterler bakımından farklılık gösterene kadar suş olarak adlandırılmazlar. Tanımlanan alt türler suşlar olarak ifade edilebilir ya da edilmeyebilir. Mesela *E.multilocularis*’in Avrupa ve Kuzey Amerika populasyonları farklı morfolojik yapıları ve coğrafik dağılımlarından dolayı farklı alt türler olarak tanımlanmıştır. Ancak günümüzde bu populasyonları birbirinden ayıran pratik öneme sahip karakterler arasında tatmin edici bir fark bulunamamıştır. Bu deliller bulunana kadar da bu alt türlerin suş olarak

adlandırılması mümkün değildir. Konak spesifitesi suşları tanımlamak için zorunlu değildir. Örneğin Avustralya ana karasında *E.granulosus*'un evcil koyun suşu birçok ara konağı enfekte edebilirken ana karada ve Tazmanya'da bulunan farklı suşlar da aynı konağı kullanabilmektedir (19, 91, 94, 95, 152).

Echinococcus cinsi içerisindeki intraspesifik varyasyon nükleik asit sekanslarındaki farklılıklardan kaynaklanmakta ve kendisini, parazitin yaşam siklusunu, konak spesifitesini, gelişim hızını, patojenitesini, antijenite ve kemoteropotiklere duyarlılığını, bulaşma dinamiklerini, hastalığın epidemiyoloji ve kontrol tekniklerini etkileyen fenotipik karakterler olarak yansıtmaktadır. Bu bakımdan endemik bir bölgedeki dominant suşun ya da suşların belirlenmesi parazitin kontrolü ve mümkünse eradikasyonu açısından son derece önemlidir (39).

3.6.1. *Echinococcus granulosus*' un Suşları

3.6.1.1. Evcil Koyun Suşu (G1)

Echinococcus granulosus'un en önemli ve en yaygın ara konakları evcil koyunlardır. Karşılaştırmalı çalışmaların büyük çoğunluğu Avustralya, Yeni Zelanda ve İngiltere'den elde edilen koyun izolatları üzerinde yapılmış ve sonuç olarak adı geçen bölgelerde *E.granulosus*'un koyun suşunun bulunduğu belirtilmiştir. Dünyanın çeşitli bölgelerinden elde edilen numunelerin morfolojik, biyolojik ve moleküler tekniklerle incelenmesi sonucunda Avrupa ve komşu ülkelerindeki koyun suşunun bir örnekliklik gösterdiği ortaya konulmuştur (39, 74, 152, 155, 165).

Günümüzde koyun suşunun Kuzey, Orta ve Güney Amerika, Avrupa, Afrika, Asya ve Avustralya’da bulunduğu bilinmektedir. Koyun suşu koyunlar dışında keçi, sığır, buffalo, yak, deve, domuz ve tek tırnaklılar gibi birçok hayvan grubunda enfeksiyona neden olmaktadır. Bu suşun koyunlarda fertil kistler oluştururken, diğer konaklarda (keçi, sığır, domuz ve yaban domuzu) non-fertil kistlere neden olduğu ve özellikle sığırlardaki düşük kist fertilitesinin önemli nedenlerinden biri olduğu bildirilmektedir. Ayrıca koyun suşu insan enfeksiyonlarının başlıca sebebi olup günümüze kadar yapılan cerrahi operasyonlar sonucunda elde edilen metasestod materyalinin incelemesi sonucunda bu enfeksiyonların büyük çoğunluğundan koyun suşunun sorumlu olduğu ortaya konulmuştur (39, 152, 155).

3.6.1.2. Tazmanya Koyun Suşu (G2)

Geçmişte yapılan morfolojik ve biyolojik çalışmalar, Avustralya’nın Tazmanya Adasındaki koyun izolatlarının Avustralya ve dünyanın diğer bölgelerindeki koyun izolatlarından farklı olduğunu ortaya koymuştur. Günümüzde yapılan moleküler çalışmalar, Tazmanya koyun suşunun (G2) evcil koyun suşundan (G1) kesinlikle farklı olduğunu ortaya göstermektedir. Tazmanya adasındaki *Echinococcus* enfeksiyonlarının kökeninin Avustralya’dakinden farklı bir orijine sahip olduğu, bu küçük popülasyonun genetik bir değişim sonucunda oluştuğu, Tazmanya’da son konaklara düzenli olarak uygulanan arekolin tedavisinin parazitte adaptif bir genetik farklılaşmaya yol açmış olabileceği belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarla Avustralya ana karasından elde edilen koyun izolatları ile Tazmanya Adasından elde edilen koyun izolatlarının bazı

enzim bölgelerinde ve genomik DNA'nın yüksek tekrarlı bölgelerinde önemli farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Kısa bir zaman periyodunda regülatör DNA'da meydana gelen birkaç mutasyonun yapısal gen bölgelerini etkilemeden parazitin gelişim hızında büyük adaptif değişikliklere neden olabileceği düşünülmüş, ancak bu görüş üzerinde yeterince durulmamıştır (12, 14, 71-73, 123, 124, 151, 152).

Bu suş ile yapılan deneysel enfeksiyonlarda yumurta çıkışının enfeksiyonu takip eden 39. günde, koyun suşunda (G1) ise 45. günde olduğu bildirilmiştir. Avustralya'da yapılan çalışmalar koyun suşunun koyun, keçi, sığır, buffalo, yak, deve, domuz ve tek tırnaklılar gibi birden fazla ara konağı enfekte edebileceğini ve belirli bir konak türünün birden fazla suşa (koyun suşu ve Tazmanya koyun suşunun her ikisi de koyunu ara konak olarak kullanabilir) duyarlı olabileceğini ortaya koymuştur. Mitokondrial CO1 bölgesinin DNA dizi analizinin yapıldığı son çalışmalarda bu suşun Tazmanya adası dışında Arjantin, Romanya ve Hindistan'da da bulunduğu ve dünyanın diğer bölgelerinde de bulunma olasılığının yüksek olduğu belirtilmiştir (39, 42, 43, 84, 102, 148, 152, 155).

3.6.1.3. Manda Suşu (G3)

Mandalar özellikle Asya'da *E.granulosus*'un yaygın ara konaklarıdır. Metasestodlar genellikle ara konakların akciğerlerine yerleşmekte ve yüksek fertiliteye neden olmaktadır. *E.granulosus*'un manda izolatlarının morfoloji ve biyolojileri üzerinde detaylı çalışmalar yapılmış ancak bu izolatların manda suşu olup olmadığı anlaşılamamıştır. Elde edilen materyalin ise *E.granulosus canadensis*'e yakın olduğu düşünülmüştür. *E.granulosus*'un manda izolatlarının en önemli özelliği gebe halkalarının sadece 2 segmente sahip olmasıdır.

Günümüzde Random Amplified Polimorphic DNA-PZR (RAPD-PZR) ve DNA dizi analizi gibi moleküler tekniklerle de buffalo suşunun varlığı ortaya konulmuştur (26, 52, 65, 119, 131, 152).

3.6.1.4. At Suşu (G4)

Williams ve Sweatman (173), at ve koyun orijinli *E.granulosus*'un hem erişkin hem de protoskoleksleri üzerinde oldukça kapsamlı ve karşılaştırmalı morfolojik çalışmalar yapmışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda bu iki konaktan elde edilen parazitler arasında özellikle rostellar çengel yapıları ve erkek genital organlarının anatomileri arasında belirgin farklılıklar olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca bu araştırmacılar koyun ve atlarda çapraz enfeksiyon deneyleri yapmışlar ve çalışmalar sonucunda koyun kökenli *E.granulosus* enfeksiyonlarına karşı atların oldukça dayanıklı olduğunu, buna karşın koyunlarda at kökenli *E.granulosus* enfeksiyonlarında sınırlı bir metasestod gelişiminin olduğunu belirtmişlerdir. At suşunun morfolojisi, biyolojisi, fizyolojisi, biyokimyası, metabolizması, moleküler biyolojisi, konak spesifitesi ve epidemiyolojisi detaylıca çalışılmış ve diğer suşlarla karşılaştırılmıştır. İngiltere, Londra, İrlanda, Belçika, İsviçre, Kuzey Afrika ve Yeni Zelanda'da seksenli yıllarda yapılan çalışmalar, İtalya, Lübnan ve Suriye'de altmışlı yıllarda yapılan çalışmaları desteklemiş ve *E. granulosus*'un at suşunun bir örnekliliğini ve coğrafi dağılımını ortaya koymuştur (135, 152, 156).

Günümüzde at suşunun Avrupa, Ortadoğu, Güney Afrika, Yeni Zelanda ve Amerika'da bulunduğu bilinmektedir. Bu suşun yegane son konağı köpeklerdir. Ancak kızıl tilkilerin de hastalığın yayılmasında rolünün olabileceği iddia

edilmektedir. Ara konak spektrumu oldukça dar olup, yalnızca tek tırnaklılar ile sınırlıdır. Atlarda metasestodların en çok lokalize olduğu organ karaciğerdir. Ancak bunun dışındaki organ ve dokularda da metasestodlara rastlamak mümkündür. At suşunun larval dönemlerinde insan, koyun ve sığırlar için enfektif olmadığına dair deliller bulunmaktadır. Son yıllarda at suşunun varlığı çok sayıda moleküler teknikle teyid edilmiştir. Mitokondrial, ribozomal ve nükleer sekans bilgilerinin dikkatli filogenetik analizleri *E. granulosus*'un koyun ve at suşlarının evrimsel farklılıklarını ortaya koymuştur. Geçen 40 yıl içerisinde elde edilen bilgiler ışığında bugün at suşunun tür statüsünde ve *E. equinus* adıyla sınıflandırmadaki yerini alması yönünde öneriler vardır (16, 38, 47, 48, 59, 62, 76, 152, 155).

3.6.1.5. Sığır Suşu (G5)

Rausch (115), tarafından tür olduğu kabul edilmeyen ancak morfolojik, biyolojik ve PZR, PZR-RFLP, RAPD-PZR ve DNA dizileme gibi moleküler tekniklerle net bir şekilde varlığı ortaya konulan sığır suşunun günümüzde yeniden *E. ortleppi* adıyla müstakil bir tür olarak adlandırılması yönünde öneriler vardır. Sığır suşunun tek son konağının köpekler, ara konaklarının ise genellikle sığırlar ve nadiren de insanlar olduğu bilinmektedir. Bu suş son konakta oldukça hızlı bir gelişim göstermektedir. Diğer suşlardan farklı olarak sığır suşunun neden olduğu enfeksiyonlarda prepatent süre ortalama olarak 33-35 gün olup diğer suşlarda ise ortalama gelişim süresi 40-48 gün arasında değişmektedir. Sığırlarda metasestod kistler büyük oranda akciğerlerde bulunmakta ve %90'dan fazlasında enfektif protoskoleksler bulunmaktadır. Steril kuzu, buzağı ve domuz yavruları ile

yapılan enfeksiyon çalışmalarında bu hayvanlara canlı yumurtalar oral yolla verilmiş ve enfekte organlarda 3 mm büyüklüğe kadar ulaşan çok sayıda vezikül oluşmuştur. Ancak enfeksiyondan 3 ay sonra kist gelişimi durmuş ve protoskoleks oluşumu gözlenmemiştir (16, 18, 21, 31, 62, 90, 133, 134, 152, 155, 175).

3.6.1.6. Deve Suşu (G6)

Afrika ve Ortadoğu'nun birçok bölgesinde deve *E. granulosus*'un önemli ara konaklarından birisidir. Aynı endemik bölgede bulunan diğer ara konaklarda görülen kistlerin aksine develerde görülen bu formun kistleri fertildir. Deve izolatları üzerinde yapılan karşılaştırmalı morfolojik çalışmalarda bu formla koyunlardan elde edilen formun rostellar engellerinin büyüklükleri ve sayıları arasında önemli farklılıklar bulunmuş; bu dönemde araştırmacılar bunu konağın neden olduğu bir morfolojik varyasyon olarak nitelendirmişlerdir. Daha sonraki yıllarda Kenya'da yapılan çalışmalar deve suşunun diğer suşlardan farklı olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan alışmalarda Afrika develerinden elde edilen *E.granulosus* izolatlarının köpeklerde oldukça hızlı bir gelişim gösterdiği ve belirgin özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Bu izolatlar morfolojik olarak koyun ve at izolatlarından kolayca ayrılmasına rağmen, sığır izolatları ile benzerlikler göstermektedir. Ancak Ortadoğu, Sudan, Kenya ve Somali'den elde edilen deve izolatları ile yapılan moleküler çalışmalar ile, deve izolatlarının koyun ve sığır izolatları ile olan farklılıkları ortaya konulmuş ve deve suşunun domuz suşu ile çok büyük genetik benzerlikler gösterdiği belirtilmiştir. Deve suşunun son konağı köpekler, ara konakları ise deve ve keilerdir. Ancak yapılan moleküler çalışmalarla sığırların deve suşuna ara konaklık yapabildiği ortaya konulmuştur.

Develerde metasestodlar genellikle akciğerlerde nadiren karaciğer ve diğer organlarda lokalize olmakta ve akciğerdeki kistlerin fertlitesinin %90'dan fazla olduğu bilinmektedir. Günümüzde yapılan çok sayıda moleküler çalışma ile deve suşunun varlığı ortaya konmuş ve insan enfeksiyonlarına neden olduğu bildirilmiştir (2, 5, 16, 19, 21, 30, 31, 40, 41, 48, 61, 62, 87, 88, 91, 124, 131, 153, 172, 182).

3.6.1.7. Domuz Suşu (G7)

Domuz suşunun varlığı, Bulgaristan, Çek Cumhuriyeti, Macaristan, Eski Yugoslavya ve Polonya gibi Avrupa ülkeleri ve Eski Sovyetler Birliği'nde yapılan çalışmalarla ortaya konmuş ve günümüzde yapılan moleküler çalışmalarla da teyid edilmiştir. Domuz suşunun doğal son konaklarının köpekler olduğu bilinmektedir. Ancak yapılan deneysel çalışmalarla gümüş tilkilerinin de domuz suşu ile enfekte olabildikleri ve vahşi karnivorların domuz suşuna konaklık yapabilecekleri belirtilmiştir. Ayrıca domuz suşundan elde edilen yumurtaların domuz yavruları için oldukça enfektif olmasına rağmen, kuzu ve buzağılar için enfektivitelerinin düşük olduğu, domuzlarda metasestodların genellikle karaciğerde bulunduğu, diğer organlarda ise daha az rastlandığı belirtilmiştir. Bu suşun son konak köpeklerdeki olgunlaşma süresi de normalden kısa olup deneysel çalışmalarda enfeksiyondan sonraki 34. günde dışkıda yumurta görülmüştür. Domuz suşunun insanlar için enfektivitesinin düşük olduğu bildirilmiştir. Nitekim Polonya'nın belirli bölgelerinde enfeksiyon oranının domuzlarda %31, köpeklerde ise %11 olmasına rağmen, 20 yıllık bir süreç içerisinde bölgeden sadece bir insan vakasının bildirilmesi bu durumun bir kanıtıdır (31, 38, 53, 109, 124, 136, 152).

3.6.1.8. İnsan Suşu (G9)

Polonyalı hastalardan ince iğne aspirasyon tekniği ile elde edilen parazit materyalinin PZR-RFLP ve DNA dizileme teknikleri ile incelenmesi neticesinde hastaların tüm dünyada yaygın olan koyun suşu ile enfekte olmadıkları görülmüştür. Enfeksiyona neden olan etkenin daha önce belirlenen G7 suşuna oldukça benzerlik gösterdiği, ancak ondan farklı bir suş olduğu kanaatine varılmış ve bu etkene G9 suşu adı verilmiştir (132).

3.6.1.9. Keçi Suşu (?)

Echinococcus granulosus'un keçi izolatları üzerindeki bilgiler oldukça sınırlıdır. Pandey (108), Hindistan keçi izolatları üzerinde yaptığı bir çalışmada bu formun bilinen diğer alt türlerden farklı olduğunu, 60-90 gün gibi uzun bir prepatent süreye sahip olduğunu ve bu formun evrim sürecinde bir suş veya mutant olabileceğini belirtmiştir. Prasad (112) da, *E.granulosus*'un keçi formunun diğer formlardan daha uzun bir prepatent periyoda sahip olduğunu belirtmiştir. Ancak keçilerden elde edilen izolatların suş olarak nitelendirilebilmesi için daha fazla çalışmaya gereksinim duyulduğu aşıkardır.

3.6.2. *Echinococcus granulosus*'un Vahşi Yaşam Suşları

3.6.2.1. Geyik Suşu (G8) ve Fennoscandian Geyik Suşu (G10)

Echinococcus granulosus'un vahşi yaşam siklusundaki en önemli ara konağı muhtemelen geyiklerdir. *E.granulosus*'un geyik suşunun (G8) parazitin evcil çift tırnaklılardaki suşlarına en yakın suş olduğu düşünülmektedir. Kuzey Amerika ve Avrupa'da geyik suşu kurtlar ve kanada geyiği, ren geyiği gibi büyük geyik türleri arasındaki avcı-av ilişkisi ile varlığını devam ettirmektedir. Ancak Kanada, Alaska, Sibirya, Norveç ve İsviçre'de bu suş varlığını, evcil köpek ve evcil geyik siklusu ile de devam ettirebilmektedir. Bu suş diğer suşlardan farklı olarak evcil çift tırnaklılarda enfeksiyona neden olmamakta ve insanlarda da asemptomatik seyretmektedir. Geyik suşu serolojik olarak ve laboratuvar farelerinde oluşturduğu enfeksiyonun karakteristik özellikleri bakımından, parazitin diğer evcil suşlarından ayrılabilir. Başka çalışmalarda bu suşun sığırlar için enfektif olmadığı ve köpeklerde oldukça hızlı gelişim gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca bu suşun erişkin ve larval formları diğer suşlardan morfolojik özelliklerine ve çözünebilir proteinlerin izoelektrik odaklanma özelliklerine göre ayırt edilebilmektedir. Dört ren geyiği ve bir Amerikan geyiğinden elde edilen toplam beş *E.granulosus* izolatının mitokodrial ve ribozomal genleri sekanslanmış ve Finlandiya'daki geyik suşunun Amerikan geyik suşuna benzediği, ancak Amerikan geyik suşundan ve *E.granulosus*'un diğer suşlarından farklı olduğu belirtilmiş ve buna Fennoscandian geyik suşu (G10) adı verilmiştir (17, 24, 25, 75, 89, 115, 116, 125, 126, 152, 174).

3.6.2.2. Avustralya’da Keseli Hayvanlar ve Dingolar

Avustralya kıtasında *E.granulosus*’un iki belirgin yaşam siklusu bulunmaktadır. Birincisi köpek-koyun siklusudur ve bu siklusta domuz ve sığırlar potansiyel aksidental ara konak olarak rol oynamaktadırlar. İkincisi ise keseli hayvanlar (özellikle kangurular) ve dingo siklusudur (*Canis familiaris dingo*). Bu iki siklusun etkileşiminin iyi anlaşılması, kontrol programlarının uygulanabilmesi açısından çok büyük önem taşımaktadır. Bu iki farklı siklus, Avustralya’da iki farklı suşun varlığını ortaya koymaktadır. Parazitin koyun ve keseli hayvan izolatları morfolojik olarak birbirinden farklıdır. Keseli hayvanlardan elde edilen izolatların rostellar çengel sayısı normalin iki katıdır ve kendine özgü şekilleri vardır. Ayrıca bu izolatların kendilerine özgü biyolojileri vardır. Her iki suş da köpeklerde iyi gelişmekte, fakat keseli kökenli silvatic suş dingolarda köpeklerden çok daha hızlı bir gelişim göstermektedir. Ayrıca keseli kökenli silvatic suşun metasestodları koyunlar için enfektif değildir. Avustralya silvatic suşunun dingolarda köpeklerden daha hızlı bir gelişim göstermesi, bu suşun Avustralya ana karasının bu suşla ondokuzuncu yüzyılın sonlarında Avrupalı göçmenlerle giren evcil suştan (koyun suşu) daha önce tanıştığını ortaya koymaktadır. Silvatic suşun dingolarla tanışması ise binlerce yıl önce Asya’dan Avustralya’ya göç eden aborjinler sayesinde olmuş ve bu suş sonradan keselilere adapte olmuştur (72, 150-152).

3.6.2.3. Afrika Vahşi Yaşam Suşları

Afrika’da *E.granulosus*’un son konakları vahşi köpekler (*Lycaon pictus*), çakallar (*Canis mesomelas* ve *C. aureus*) ve sırtlanlar (*Crocuta crocuta*); ara

konakları ise birçok türden vahşi tek ve çift tırnaklılardır. Üzerinde en çok durulan konu ise *E.granulosus*'un arslanlarda bulunmasıdır. Günümüze kadar evcil kediler üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda kedigillerin *E.granulosus*'a konaklık yapamayacağı kanaatini doğurmuşken, birçok Afrika ülkesinde arslan ile çok sayıda ara konak türü arasında silvatik bir siklus bildirilmiştir. Ayrıca Güney Afrika'da 15 vahşi kedi türünden birinin de (*Felis silvestris*=*F. libyca*) *E. granulosus*'a konaklık yaptığı ortaya konmuştur. Afrika'daki bu durum vahşi kedilerde parazitlenen farklı bir suşun varlığını ortaya koymakta, ancak bu suşun evcil kedilerde enfeksiyona neden olup olmadığı bilinmemektedir. Ayrıca morfolojik farklılıklar yanında bu suşun arslan ve yaban domuzu arasında silvatik siklusa sahip olduğu ve köpekler için enfektif olmadığı bildirilmiştir. Bu özelliklerinden dolayı bu suşun taksonomik statüsünün gözden geçirilerek, tür olarak (*Echinococcus felidis* Ortlepp, 1937) adlandırılabilceği belirtilmiştir (42, 57, 85, 86, 101, 116, 148, 152, 169).

3.6.2.4. Yabani Tavşanlar

1972 yılına kadar tavşanların *E.granulosus* için uygun ara konaklar olmadıkları, ancak diğer taenid sestodlara ara konaklık yapabilecekleri düşünülmektedir. Arjantin'de yapılan bir çalışmada 71 Avrupa tavşanından (*Lepus europaeus*) 4'ü enfekte bulunmuş, Arjantin'in çeşitli bölgelerindeki tavşanlarda çok sayıda enfeksiyona rastlanmış ve bu siklusun zoonotik özelliği üzerinde durulmuştur. Bu bölgedeki tilkilerle tavşanlar arasında gerçek bir silvatik suşun bulunup bulunmadığı ve enfeksiyonun parazitin koyun suşunu taşıyan evcil

köpeklerden kaynaklanıp kaynaklanmadığı hususunun açıklığa kavuşturulması için, ilave çalışmalara gereksinim vardır (51, 70, 130, 147).

Tablo 1. *E. granulosus*'un farklı suşlarının son konak ve ara konakları ile insanlara karşı enfektivitesi ve coğrafi dağılımları (5, 14, 39, 75, 132, 155).

Suş	Son konak	Ara konak	İnsanlara karşı	Coğrafi dağılımı
Koyun (G1)	Köpek, tilki, dingo, kurt, çakal, sırtlan	Koyun, keçi, sığır, manda, yak, deve, domuz, tek tırnaklılar, kanguru	Enfektif	Kuzey, Orta ve Güney Amerika, Avrupa, Afrika, Asya, Avustralya
Tazmanya koyun (G2)	Köpek	Koyun, sığır, manda	Enfektif	Tazmanya, Arjantin, Romanya, Hindistan
Manda (G3)	Köpek, tilki (?)	Manda, sığır, koyun	Enfektif	Asya, Avrupa
At (G4)	Köpek	At ve diğer tek tırnaklılar	Düşük veya değil	Avrupa, Ortadoğu, Güney Afrika, Yeni Zelanda, Amerika, Avrupa
Sığır (G5)	Köpek, tilki (?)	Sığır, koyun, keçi, manda	Enfektif	Orta Avrupa, Rusya, Güney Afrika, Hindistan, Sri Lanka
Deve (G6)	Köpek	Deve, keçi, sığır, koyun	Enfektif	Ortadoğu, Afrika, Arjantin, Çin
Domuz (G7)	Köpek, tilki (?)	Domuz, yaban domuzu, sığır, keçi	Enfektif	Avrupa, Rusya, Orta Amerika
Geyik (G8)	Kurt, köpek	Geyikler	Enfektif	Kuzey Amerika, Avrasya
İnsan (G9)	Kanideler	İnsan	Enfektif	Polonya
Fenoskandian geyik suşu (G10)	Kanideler	Geyikler	Asemptomatik	Finlandiya
Arslan	Arslan	Manda, yaban domuzları, yaban öküzü, antilop, zebra,	(?)	Afrika
Tavşan	Gri tilki	Yabani tavşanlar	(?)	Güney Amerika

3.7.1. *Echinococcus multilocularis*, *E.oligarthrus* ve *E.vogeli*

Echinococcus granulosus dışındaki 3 türden sadece *E. multilocularis*'te intraspesifik varyasyon söz konusu olup, coğrafi dağılımı ve konaklarının çok

sınırlı olmasından dolayı *E.oligarthus* ve *E.vogeli*'de intraspesifik varyasyon bulunmamaktadır (19-21, 38, 39, 116, 129).

3.7.1.1. *Echinococcus multilocularis* İçerisindeki İntraspesifik Varyasyon

Echinococcus multilocularis'in son konakları tilkiler ara konakları ise rodentlerdir. Bazı bölgelerde evcil (köpek, kedi) ve yabani karnivorlar da (kurt, çakal, rakun) son konak olarak rol oynayabilmektedir. Bu parazit kuzey yarım kürede (Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya) yaygınlık göstermekte ve insanlarda alveolar echinococcosis denilen hastalığa neden olmaktadır. *Echinococcus multilocularis* içerisindeki intraspesifik varyasyonu belirlemek amacıyla yeterince çalışma yapılmamıştır. Bu türün *E. multilocularis multilocularis* (Europe), *E.m.sibiricensis* (Alaska) ve *E.m.kazakhensis* olmak üzere 3 alt türü olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar *E.multilocularis*'de morfolojik ve biyolojik varyasyonların bulunduğunu, buna karşın, farklı suşlarının söz konusu olmadığını ortaya koymuştur (19, 21, 39, 129).

Tablo 2. *Echinococcus multilocularis*'in farklı izolatlarının son konak ve ara konak ile insanlardaki enfektivitesi ve coğrafi dağılımları (155).

İzolat	Son konak	Ara konak	İnsanlara karşı	Coğrafi dağılımı
Avrupa izolatı	Tilki, köpek, kedi, rakun	Rodentler, evcil ve yabani domuz, köpek, maymun	Enfektif	Avrupa ve Çin (?)
Alaska izolatı	Köpek, tilki, kedi	Rodentler	Enfektif	Alaska
Kuzey Amerika izolatı	Köpek, tilki, kedi, koyoti	Rodentler	Enfektif	Kuzey Amerika
Hokkaido izolatı	Tilki, köpek, kedi, rakun	Rodent, domuz, maymun, at	Enfektif	Japonya

3.7.1.2. *Echinococcus vogeli* ve *E. oligarthrus* İçerisindeki İntراسپسيفك Varyasyon

Echinococcus oligarthrus'un son konakları yabani kedigiller, ara konakları ise rodentlerdir. *E.vogeli*'nin ise son konakları bush köpekleri, ara konakları da küçük kemirgenlerdir. Her iki tür de Orta ve Güney Amerika'da yayılım göstermekte ve insan enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Yapılan moleküler çalışmalar, iki türün de farklı suşlarının olmadığını ortaya koymuştur (19, 21).

3.8. *Echinococcus* Tür ve Suşlarının Ayrımında Kullanılan Teknikler

Echinococcus cinsinin metasestod ve erişkinlerinin tür ayrımı; morfolojik, biyolojik ve epidemiyolojik kriterlere göre yapılmaktadır. Ancak suş ayrımı; morfolojik, biyolojik, biyokimyasal, epidemiyolojik ve moleküler kriterler gibi birçok parametrenin birlikte değerlendirildiği kompleks bir olaydır (16, 20, 21, 152, 154).

Hidatidosisin epidemiyoloji ve kontrolü üzerinde oldukça önemli olan suşlar ekolojik, fizyolojik ve davranış özelliklerine göre ayrılabilmesine rağmen, bu tip karakterler direkt olarak parazit genomu ile ilişkili olmayabilir. Bu nedenle de bu tip karakterler, ekstrinsik karakterler olarak adlandırılmaktadır. Ekstrinsik kriterler tür içi varyasyonların belirlenmesinde çok faydalı bilgiler sağlayabilmesine karşın, bu tip çalışmalar parazit genomu ile direkt olarak ilgilenen tekniklerle desteklenmelidir. Parazit genomu ile direkt ilişkili olan kriterler intrinsik kriterler olarak adlandırılmaktadır. İntراسك kriterler içerisinde sadece DNA dizileme tekniği genotipik farklılıkların direkt ölçümüne olanak sağlamaktadır. İntراسك kriterler suşlar arasındaki sınırlı gen akışının ve gen

frekanslarındaki farklılıkların ölçümünde kullanılabilir. Geçmişte morfolojik çalışmalar *Echinococcus* cinsi içerisindeki suşların belirlenmesinde en çok kullanılan kriter olmasına rağmen, günümüzde morfolojik özelliklerin alt türlerin ve suşların belirlenmesi üzerindeki değeri konusunda görüş ayrılıkları bulunmaktadır (27, 69, 82, 110, 114, 117, 139, 152, 168, 171).

3.9. *Echinococcus* Cinsinin Tiplendirilmesinde Kullanılan Moleküler Teknikler

3.9.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Tekniğin prensibini, izole edilen veya patolojik materyalde bulunan hedef genetik materyallerin (DNA, RNA), spesifik kısa zincirli oligonükleotid primerler yardımı ile, enzimatik olarak çoğaltılması oluşturmaktadır. Reaksiyon başlıca denaturasyon, primerlerin bağlanması (annealing) ve amplifikasyon (extension) olmak üzere üç aşamada gerçekleşmektedir. PZR'ın üç aşamadan oluşan ilk amplifikasyon aşamasının, 25-30 kez tekrarlanması sonucunda, hedef DNA'nın milyonlarca kopyası oluşmaktadır. Amplifikasyon aşamasından sonra elde edilen ürünler, agaroz jel veya poliakrilamid jel elektroforezis ile ayrıştırılmakta, ethidium bromide ile boyanarak veya Southern blot analizi ile görünür hale getirilebilmektedir. PZR genellikle echinococcosisin teşhisinde kullanılmasına rağmen; Dinkel ve arkadaşları (31), bu tekniği diğer araştırmacılar farklı olarak tiplendirme amacıyla kullanmışlardır. Yaptıkları çalışmada; *E.granulosus*'un G1, G5, G6/G7 suşları için spesifik ve duyarlı PZR/semi nested PZR sistemi uygulamışlar, G1 suşunun ve G5/G6/G7 suşlarının tanısında klasik PZR, G5 ile

G6/G7 suşlarının ayırımında ise semi-nested PZR yöntemini kullanmışlardır. *Echinococcus multilocularis*, *E.equinus*, *E.ortleppi* ve *E.granulosus*'un G1, G6 ve G7 suşlarının da dahil olduğu 16 türün izolatlarının değerlendirildiği bu çalışmada PZR analizinin spesifitesi %100 olarak bulunmuştur. Bu PZR analizi yaklaşımı ile elde edilen sonuçlar ile ilk kez Batı Afrika'da insanlarda G6 suşu ile enfeksiyon ortaya konulmuştur. Ayrıca Kenya ve Sudan'da çiftlik hayvanlarında G5 suşu belirlenmiştir (9, 165).

3.9.2. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Restriksiyon enzimleri (RE), çift iplikçikli DNA'da spesifik bölgelerden kesim yaparak, DNA'dan bir genin veya gen taşıyan bir DNA segmentinin çıkarılmasında etkin fonksiyonları olan enzimlerdir. DNA'nın, bu enzimlerden bir veya birkaçı ile kesime uğratıldıktan sonra agaroz jel elektroforezine tabi tutulması ve sonra ethidium bromid ile boyanan jelde oluşan DNA bandlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) adı verilmektedir. Çin'in dört bölgesinden toplanan *E.granulosus* izolatlarından elde edilen DNA'nın RFLP ve Southern blot analizi ile incelenmesi sonucunda, bu dört bölgedeki koyunlardan toplanan izolatlar ile yak ve koyun izolatları arasında genetik bir varyasyon belirlenememiştir. RFLP, PZR-RFLP ve mitokondrial genom analizi tekniklerinin kombine olarak kullanıldığı bir çalışmada, Çin'in kuzeybatısında insanların da dahil olduğu birçok ara konaktan elde edilen 117 izolat incelenmiş ve bu izolatlar arasında genetik bir varyasyon bulunamamıştır (9, 93, 177, 178).

3.9.3. PZR-RFLP

Bu yöntemde bilinen RFLP'den farklı olarak, genomik DNA'nın belirli bir bölgesi, spesifik primerler kullanılarak çoğaltılmaktadır. Elde edilen ürünler bir veya daha fazla sayıda restriksiyon enzimi ile kesilmekte, agaroz jel elektroforez ile ayrılmakta, jel ethidium bromide ile boyanmakta ve son olarak ultraviole ışık altında görüntüleme işlemi yapılmaktadır. PZR-RFLP, *Echinococcus* izolatlarının ya da öteki parazit gruplarının ayırımında kullanılan oldukça basit, duyarlı ve hızlı bir yöntemdir. PZR-RFLP ve DNA dizileme tekniklerinin kombine olarak kullanıldığı çalışmalarda *E. granulosus*'un sığır suşunun insan enfeksiyonlarına neden olduğu; Tunus'ta insan, sığır ve koyun kistlerinin sebebinin G1 suşu olduğu, sığırların G1 suşu için rezervuar konak olarak önemli rol oynadığı ve ayrıca bu ülkede G6 suşunun bulunduğu; Arjantin'de *E. granulosus*'un dört farklı suşunun (G1, G2, G6, G7) bulunduğu, G2 ve G7 suşlarının insan enfeksiyonuna neden olduğu; İran'da G1 ve G6 suşlarının bulunduğu, G6 suşunun insanlar için enfektif olduğu ve bu suşun hem koyunları hem de sığırları enfekte ettiği belirlenmiştir. PZR-RFLP ve çengel morfolojisinin birlikte kullanıldığı bir çalışmada yine İran'da G1 ve G6 suşları teşhis edilmiştir. PZR-RFLP, RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA)-PZR ve DNA dizileme teknikleri birlikte kullanılarak Meksika'da G5 suşunun insan enfeksiyonlarına neden olduğu belirlenmiştir. PZR-RFLP tekniği ile *E. granulosus*'un insan, sığır, koyun, keçi, at, eşek, deve, manda, domuz, kanguru ve köpek izolatları, *E. multilocularis*, *E. vogeli* ve *E. oligarthrus*'un ise rodent izolatları incelenerek, dört *Echinococcus* türü birbirinden ayrılmış; *E. granulosus* izolatlarının incelenmesi sonucunda da G1, G4, G5 ve G6 suşları belirlenmiştir. Yine bu teknik ile İspanya'nın çeşitli

bölgelerinden elde edilen 53 izolat incelenmiş, *E.granulosus*'un *E.multilocularis*'ten ayrımı yapılmış, *E.granulosus*'un farklı suşları tanımlanmış, ve *E.granulosus*'un domuz izolatı içerisinde iki farklı genotipin bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca domuz suşunun ileri ayrımını sağlamak amacıyla da NAD1 ve CO1 genleri çoğaltılıp dizilenmiştir. Çalışma sonucunda İspanya'da G1 ve G7 genotiplerinin bulunduğu bir kez daha ortaya konmuştur. PZR-RFLP analizi ile geyik suşunun (G8) *E.granulosus*'un diğer suşlarından ayrılabilceği, Slovakya'da G7 genotipinin bulunduğu, Rusya ve Kazakistan'daki suşların önceden belirtilen suşlardan farklı olmadığı, Polonya'da ise domuz suşuna çok benzeyen ancak bu suştan ve bilinen diğer suşlardan genetik olarak ayrılan bir suşun (G9) insan enfeksiyonlarına sebep olduğu ortaya konmuştur (2, 9, 17, 18, 21, 45, 53, 61, 83, 90, 103, 124, 132, 136, 182).

3.9.4. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PZR

Arbitrary primed PCR (AP-PCR) olarak da adlandırılan Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PZR), genomik DNA'nın rastgele seçilmiş bir veya daha fazla primer ile çoğaltılması prensibine dayanmaktadır. Kullanılan primerler genellikle 9-10 bazlık kısa primerler olup G-C bakımından zengindir. Bu teknikte primerlerin bağlanma ısısı 40-50°C'ye düşürülmüştür. Düşük sıcaklık derecesinde gerçekleştirilen bağlanma aşamasında, seçilen primerler kromozom üzerinde hem kendilerine özgü bölgelere, hem de özgü olmayan bölgelere bağlanmaktadır. Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık farklılıkları agaroz jelde saptanabilen farklı sayı ve uzunluktaki bandların oluşumuna neden olmaktadır. Aynı tür içerisindeki farklı suşlarda primerlerin

bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirine olan uzaklıkları değişik olacağından, agaroz jel elektroforezinde, amplifiye edilen parçaların sayı ve büyüklüğü de farklılık göstermektedir. Suşlar arasında primerlerin bağlanma yerlerinde gerçekleşmiş olan mutasyonlar (delesyon, insersiyon) band polimorfizminin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Amplifikasyon sonucunda jel elektroforezinde gözlenen her bir izolata ait band profilleri birbirleri ile karşılaştırılmakta aynı band profili gösteren izolatlar “epidemiolojik olarak ilişkili” şeklinde yorumlanmaktadır. Bu teknik kullanılarak yapılan çalışmalarda; *E.granulosus*’un İsveç ve İspanyol izolatlarının karakteristik band özelliği gösterdiği, İspanya’da *E.granulosus*’un üç farklı suşunun bulunduğu, *E.granulosus*’un manda ve sığır suşunun genetik olarak farklı olduğu, İtalya’da koyun izolatlarında suş içi farklılıkların bulunduğu, Slovakya’da domuz izolatlarında belirgin farklılıkların olduğu ve Türkiye’de koyun suşunun varlığı belirlenmiştir. Tekniğin *Echinococcus* cinsine bağlı türlerin tiplendirilmesinde uygun olduğu ancak RAPD-PZR tekniğinin diğer moleküler tekniklerle doğrulanması gerektiği ifade edilmiştir (104, 106, 113, 119, 133, 134, 162, 166).

3.9.5. PZR-Single Stranded Conformation Polimorphism (PZR-SSCP)

Analizi

Single Stranded Conformation Polimorphism (SSCP); sekans farklılığı gösteren DNA örneklerinin belirlenmesinde kullanılan ucuz, kolay, duyarlı ve güvenilir bir yöntemdir. Bu metodun prensibini tek iplikçikli DNA’nın şekil ve büyüklüğüne bağlı olarak, denature olmayan jel içerisindeki elektroforetik hareketi oluşturmaktadır. Çift iplikçikli DNA’nın jeldeki elektroforetik hareketi,

onun büyüklüğü ve uzunluğu ile yakından ilişkilidir. Ancak nükleotid farklılıkları bu hareketi fazla etkilemez. Oysa tek iplikçikli DNA'nın jeldeki elektroforetik hareketi yüzlerce nükleotid içerisindeki tek bir nükleotid farklılığından dahi etkilenir. Çünkü komplementeri olmayan DNA stabil değildir. Tek iplikçikli DNA, jeldeki elektroforetik göçü esnasında sekonder ve tersiyer yapılar kazanmaktadır. Bu şekil değişiklikleri; DNA iplikçığının uzunluğuna, baz eşleşmelerinin sayısına ve yerine bağlıdır. Denatüre olmayan poliakrilamid jel elektroforezinde DNA'nın yapısındaki tek baz farklılığı dahi, oluşan konformasyon ve hareket değişikliği sayesinde belirlenebilmektedir (46, 97, 105, 138).

SSCP analizinin sensitivitesi; DNA konsantrasyonu, incelenen fragmentlerin uzunluğu, elektroforez ısısı, jel kompozisyonu, kullanılan tampon ve pH gibi birçok parametreden etkilenebilir. Tekniğin en büyük avantajı çok sayıda PZR örneğinin eş zamanlı olarak incelenmesine olanak sağlamasıdır. Bu teknik PZR ürünlerini görüntülemek, incelenen genlerde yeterli polimorfizmin olup olmadığını ortaya koymak, polimorfizmin çok olduğu gen bölgelerini belirlemek, çok kopyalı genlerde polimorfizm olup olmadığını tespit etmek ve intraspesifik varyasyonları belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (44, 63, 161).

Bu teknik kullanılarak yapılan çalışmalarda; *Echinococcus* cinsi içerisinde bulunan farklı suşların rahatlıkla belirlenebileceği ortaya konmuş, Arjantin'de *E.granulosus*'un beş farklı suşunun bulunduğu, Türkiye'den elde edilen bazı izolatların G1-G3 aralığında olduğu, *E.multilocularis*'in genotipleri arasındaki nükleotid farklılığının, *E.granulosus*'un farklı suşları arasındaki nükleotid farklılığından 10 kat daha düşük olduğu ve *E.granulosus*'un farklı suşlarının

SSCP profillerine göre DNA sekans analizinden önce tanınarak *Echinococcus* izolatlarının rutin laboratuvar tanısında kullanılabileceği belirtilmiştir (47, 60, 66, 181, 183).

3.9.6. Dideoxy Fingerprinting (ddF)

Dideoxy fingerprinting, nükleik asitlerin jel elektroforezi boyunca kazandığı fiziksel özelliklere dayanan ve PZR ile çoğaltılan DNA segmentlerindeki sekans varyasyonlarının belirlenmesinde kullanılan oldukça etkili bir tekniktir. İlk defa Sarkar ve arkadaşları (128) tarafından uygulanan bu teknik, Sanger sekanslama ve SSCP tekniklerinin bir kombinasyonudur. Bu metotta sadece tek dideoksinükleotidin kullanıldığı Sanger sekanslama yöntemini, denature olmayan (non-denaturing) jel elektroforez sistemi izlemekte ve bu teknik ile PZR ile amplifiye edilen fragmentlerdeki tek sekans değişikliği bile belirlenebilmektedir. DNA'daki mutasyonlar, bandların pozisyon değişiklikleri ya da otoradyografide bir bandın oluşumu veya kaybı ile belirlenebilmektedir. Bu teknik ile sekans uzunluğu 150-250 bp olan fragmentlerdeki tek baz mutasyonu dahi %100 oranında belirlenebilmektedir. Bu teknik ile *Echinococcus* cinsinde bulunan yedi farklı genotipin (G1, G4, G6, G8, O, V ve M2) ayırt edilebileceği ortaya konmuş; G1 genotipine ait sekiz izolatın bazılarında gizli bir varyasyon bulunduğu, G4 ve M2 genotipine ait iki örnekte ise varyasyon bulunmadığı ileri sürülmüştür. Araştırmacılar, O, V ve M2 genotiplerini sırasıyla *E.ortleppi*, *E.vogeli* ve *E. multilocularis*'ten elde etmişlerdir. Ayrıca bu teknik ile DNA sekanslamaya gerek kalmaksızın *Echinococcus* cinsi ve bunun dışında kalan parazitlerin tiplendirilebileceği belirtilmiştir (43, 48).

3.9.7. DNA Baz Dizi Analizi (Sequencing)

Dizi analizinde; Klenow, Tag DNA polimeraz, reverse transkriptaz veya sekans enzimlerinden birisi kullanılarak dizisi saptanacak DNA iplikçığının komplementeri sentezlenmektedir. Çalışmaların çoğunda zincir uzamasının sonlandırılması yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem, DNA polimerazların dNTP'ler yanında, deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri de substrat olarak kullanılmaları esasına dayanır. Sentezlenen DNA iplikçığıne dNTP eklendiğinde uzama devam ederken, ddNTP eklenmesi halinde zincir uzaması durmaktadır. Kalıp DNA'lar, primer, dNTP karışımı ve enzimin konulduğu dört reaksiyon tüpünün her birine bir ddNTP eklenmesinden sonra bağlanma ve uzama işlemleri uygulanmaktadır. Böylece reaksiyon tüplerinde farklı uzunluklarda DNA parçaları oluşmaktadır. Sonuçta ortaya çıkan farklı uzunluktaki DNA parçaları poliakrilamid jelde elektroforeze tabi tutulmaktadır. Dizi analiz sonucunu görünür hale getirmek için radyoaktif madde, kemilüminesans veya floresan veren boyalarla işaretleme yapılmaktadır. Otomatize sistemlerin çoğunda reaksiyonun başlangıcında floresans veren madde ile işaretli primer veya nükleotidler kullanılarak baz dizilimi gözlenebilir hale getirilmektedir. Ancak baz dizi analizinde yöntemin uygulanması ile ilgili zorluklar vardır. Sonuçların yorumlanmasında son derece dikkatli olunması gerekmekte, çünkü artefaktlar problem oluşturabilmektedir. Her iki DNA zincirinin dizi analizi yapılarak, artefakt ve diğer faktörlere bağlı hatalar en aza indirilmelidir. Jele bağlı olmayan dizi analiz yöntemleri (hibridizasyona dayalı, gene-specific-chips) geliştirilerek bu problemlerin önüne geçilebilmektedir. Yöntem pahalıdır ve uygulanabilmesi için gelişmiş laboratuvar olanaklarına

gereksinim duyulmaktadır. Bu teknik kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda, *Echinococcus* cinsine bağılı türlerde çapraz döllenme olayının nadiren şekillendiğı, *E.granulosus*'un at suşunun taksonomik statüsünün yeniden gözden geçirilmesinin gerektiğı ve Finlandiya geyik suşunun (G10) Amerikan geyik suşundan farklı olduğı ortaya konulmuştur. Bu teknik ayrıca RFLP, PZR-RFLP gibi moleküler tekniklerle kombine olarak kullanılmış ve neticede Çin'in kuzeybatısından elde edilen izolatlar arasında genetik bir varyasyon olmadığı, İspanya'da G1 ve G7, İran'da G1, G6 ve Türkiye'de G1 genotiplerinin bulunduğı belirlenmiştir (53, 59, 61, 75, 76, 93, 104, 166, 182).

3.10. *Echinococcus* Cinsi İçerisinde Bulunan Suşların Belirlenmesinin Pratik Önemi

Echinococcus cinsi içerisindeki intraspesifik varyasyon nükleik asit sekanslarındaki farklılıklardan kaynaklanmakta ve kendisini, parazitin yaşam siklusunu, konak spesifitesini, gelişim hızını, patojenitesini, antijenite ve kemoteropotiklere duyarlılığını, bulaşma dinamiklerini, hastalığın epidemiyoloji ve kontrol tekniklerini etkileyen fenotipik karakterler olarak yansıtmaktadır. Bu bakımdan endemik bir bölgedeki dominant suşun ya da suşların belirlenmesi parazitin kontrolü ve mümkünse eradikasyonu açısından son derece önemlidir (39, 152, 155).

3.10.1. Bulaşma ve Kontrol Dinamikleri

Echinococcosisin endemik olduğı bölgelerde kontrol programlarının uygulanabilmesi hastalığın bulaşma dinamiklerinin anlaşılmasına bağılıdır.

Epidemiyolojik açıdan en önemli faktör, parazitin silvatik (yaban hayatı kaynaklı) ve domestik (evcil) siklusları arasında bir ilişkinin olduğu bölgelerde etkenin konak spesifitesidir. Örneğin; Avustralya’da *E.granulosus*’un silvatik siklusta (küçük kanguru-dingo) yer alan formunun evcil ara konaklar için enfektif olup olmadığı, echinococosisin kontrolü açısından son derece önemlidir. Şayet bu form evcil koyunlar için enfektif olsaydı, tüm dingo popülasyonunu ortadan kaldırmadan etkin bir kontrol programının uygulanması imkansız hale gelecekti. Ancak günümüzde silvatik suşun koyunlarda iyi gelişmediği bilinmekte ve kontrol çabaları koyun-köpek siklusu üzerinde yoğunlaşmaktadır (152).

Kenya gibi çok sayıda ara konağın bulunduğu endemik bölgelerde parazitin konak spesifitesinde farklılıkların olma ihtimali de son derece önemlidir. Diğer endemik bölgelerde suşlar belirli ara konaklara adapte olmakta ve spesifik konakları dışında iyi gelişmemektedir. Şayet endemik bir bölgede parazitin fertil kistler ürettiği çok sayıda duyarlı ara konak bulunuyorsa, ya parazitin oldukça geniş konak spektrumuna sahip bir suşu vardır ya da bu bölgede parazitin birden fazla suşu bulunmaktadır (152).

Echinococcus suşlarının prepatent periyotları arasındaki farklılıklar bulaşmayı etkileyen önemli bir faktördür. Son konakların düzenli olarak ilaçlandığı kontrol programlarında amaç, paraziti prepatent süreyi tamamlamadan öldürmek ve yumurta üretimini engelleyerek yaşam siklusunu kırmaktır. Bu nedenle endemik bölgelerdeki dominant suşların ve bu suşların prepatent periyotlarının belirlenmesi antiparaziter ilaçlarla yapılan kontrol programlarında etkinliğin sağlanabilmesi açısından önem arz etmektedir (152).

Bulaşmada etkili diğer faktörler ise yumurtaların dayanıklılığı ve metasestodların gelişim özellikleridir. İsviçre’de yapılan çalışmalar *E.granulosus*’un suşlarının kist gelişiminin farklı olduğunu ortaya koymuştur. İsviçre sığırlarında sığır suşu genellikle fertil kistler meydana getirirken, diğer suşlar steril ve dejenere kistler oluşturmaktadır. Ayrıca bu sığırlarda kistler genellikle akciğerlerde, oldukça küçük ve dokunun derinliklerine doğru gelişmektedir. Bu durumda kistler organ muayenesinde gözden kaçmakta ve kasaptan alınan enfekte sakatatların şehirlerdeki köpeklerle verilmesi sonucunda bu köpekler köy köpeklerinden daha fazla risk altında kalmakta ve etken alışılmadık bir şekilde yayılmaktadır (35, 152).

3.10.2. Patogenesis ve Klinik Semptomlar

Echinococcus suşlarının ara konaklardaki patogenezi ve dolayısı ile oluşturduğu klinik etkiler bakımından farklılıkların bulunduğu dair deliller bulunmaktadır. Kenya ve Libya’da bulunan *E.granulosus* suşlarının insanlar için son derece enfektif olduğu, Kuzey Amerika’daki yerli silvatic suşların insanlarda iyi huylu ve genellikle asemptomatik enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir. Ancak suşların enfektivitesinin farklı olduğunu kanıtlayan kontrollü deneysel çalışmalar yapılmamıştır (43, 50, 152, 174).

3.10.3. İmmunolojik Tanı ve Aşılama

Arakonakların *Echinococcus* cinsine karşı verdikleri serolojik yanıt sadece türler tarafından değil, suşlar tarafından da etkilenmektedir. Bu antijenik heterojenitenin farklı endemik bölgelerde immunodiagnostik prosedürlerin

seçiminde göz önünde bulundurulmasının ve suş farklılıklarından etkilenmeyen antijen fraksiyonlarının belirlenmesinin hastalığa karşı etkin kontrol stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemli olduğu vurgulanmaktadır. Benzer bir şekilde bir suşa karşı etkin bir aşının, çok sayıda suşun enfeksiyona neden olduğu endemik bölgelerde hastalığın eliminasyonunda etkili olamayacağı belirtilmektedir (24, 54, 55, 56, 64, 77, 81, 111, 120, 152).

3.10.4. Kemoterapi

Hastalığın kontrolü açısından önemli noktalardan bir tanesi de metasetodlara karşı etkin kemoterapotiklerin geliştirilmesidir. Ancak günümüzde metasetodlara karşı etkin kemoterapotiklerin bulunmaması nedeniyle en radikal tedavi kistlerin operatif olarak uzaklaştırılmasıdır. *Echinococcus granulosus* ve *E.multilocularis*'e karşı benzimidazol grubu birkaç bileşik üzerinde çok sayıda klinik çalışma yapılmış, ancak elde edilen sonuçlar son derece değişken bulunmuştur. Kemoterapotikler özellikle opere edilemeyen kistlerde, hayati öneme sahip kistlerde, postoperatif profilaksi amacıyla ve ameliyatlarda sekonder hidatidosis riskini azaltmak amacıyla kullanılmaktadır. Farklı *Echinococcus* suşları kemoterapotiklere farklı duyarlılık göstermekte ve bu durum klinik çalışmalardaki başarının değişmesine neden olabilmektedir. Bu olasılık *Echinococcus* suşlarının fizyolojik, metabolik ve biyokimyasal farklılıklar göstermesi ile desteklenmektedir (23, 36, 67, 92, 116, 127, 152).

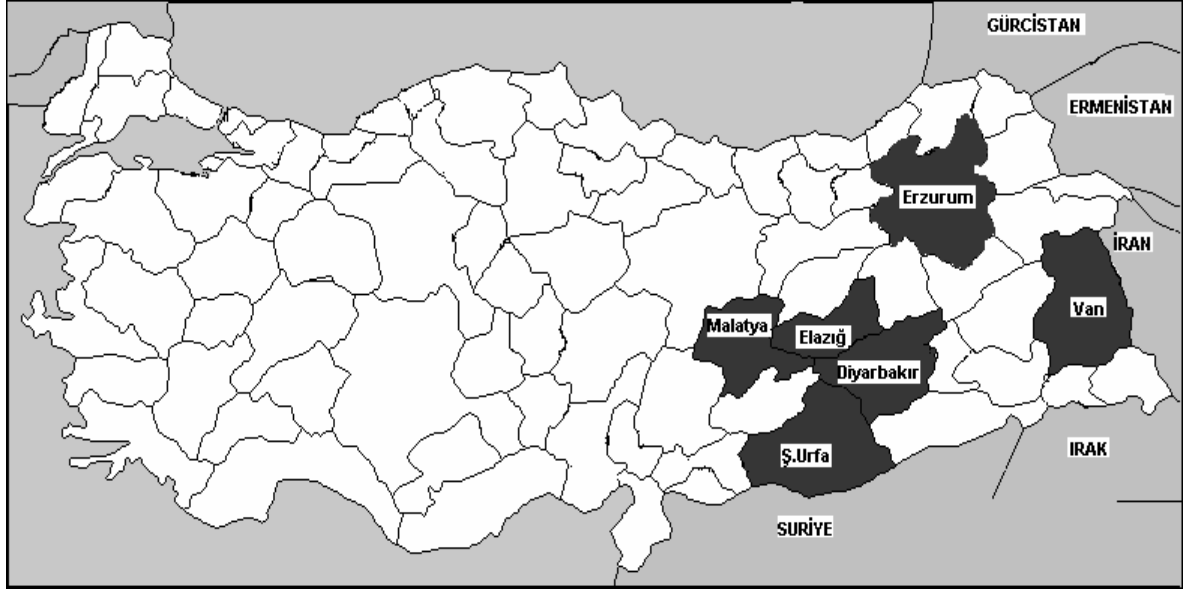
Bu çalışma ile Türkiye'nin önemli hayvancılık potansiyeline sahip geniş bir coğrafyasındaki çiftlik hayvanlarından elde edilen *E.granulosus* izolatlarındaki genetik polimorfizmin ortaya konması, böylece ülkemizdeki olası suşların

belirlenmesi, elde edilen verilerin aşı ve ilaç geliştirme çalışmalarına ışık tutması, hastalığın tedavi ve kontrolünde daha etkin stratejilerin geliştirilmesi ve dolayısıyla ülkemiz hayvancılık ekonomisine önemli katkı sağlanması hedeflenmiştir.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışma, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesi'nde bulunan hayvancılık potansiyeli ve iklimsel özellikleri farklı olan Elazığ, Malatya, Erzurum, Van, Şanlıurfa ve Diyarbakır illerinde Haziran-2005 ve Kasım-2006 tarihleri arasında yürütülmüştür. Adı geçen illerdeki kesimhanelerde kesimi yapılan sığır, koyun ve keçilerin karaciğer ve akciğerleri başta olmak üzere çeşitli organ ve dokuları inspeksiyon ve palpasyonla muayene edilmiş, aspire edilebilecek büyüklükte kistleri olan organlar ayrılmıştır. Steril ve kalın uçlu bir enjektörün kanülü kist içerisine sokulduktan sonra piston yavaşça ileri geri hareket ettirilmiş ve kist sıvısının karışması sağlanarak kist sıvısı, içerisindeki protoskolekslerle birlikte enjektöre çekilmiştir. Enjektör ters çevrilerek 3-5 dakika beklenmiş ve protoskoleksler dibe çökünce üstte kalan kist sıvısının bir kısmı atılmıştır. Ayrıca fertil olmayan kistler diseke edilerek germinal membranları çıkarılmaya çalışılmıştır. Aspire edilen kist sıvısı ve diseke edilen kist dokusu, içerisinde %70'lik etanol bulunan cam şişelere alınmış ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır. Çalışmada aynı organda bulunan farklı kistlerin içeriği karıştırılmamış ve her kistten elde edilen içerik ayrı ayrı şişelere alınmış ve numaralandırılmıştır.



Şekil 3. Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde örneklerin toplandığı iller.

Tablo 3. Toplanan izolatların illere ve hayvan gruplarına göre dağılımı

Türler	Örnek Toplanan İller						Toplam
	Elazığ	Malatya	Erzurum	Van	Şanlıurfa	Diyarbakır	
Sığır	16	14	26	11	-	15	82
Koyun	30	56	23	35	50	30	224
Keçi	1	-	1	4	1	-	7
Toplam	47	70	50	50	51	45	313

4.2. Laboratuvar Çalışmaları

Laboratuvara getirilen şişeler iyice çalkalandıktan sonra mikropipetle 10 µl kist sıvısı alınarak lam lamel arasına konulmuş ve mikroskop altında incelenmiştir. İçerisinde protoskoleks bulunan kistler fertil, bulunmayanlar ise steril olarak kabul edilmiştir. Germinal membranlar da protoskolekslerin bulunup bulunmadığı yönünde mikroskopik olarak incelenmiştir.

4.2.1. DNA Ekstraksiyonu

4.2.1.1. Ekstraksiyonun Standardizasyonu

Bir örneğin ml'sinde bulunan ortalama protoskoleks sayısını belirlemek amacıyla şişe iyice çalkalanıp bir mikropipet yardımı ile 10 µl sıvı lam lamel arasına konularak mikroskopta protoskoleks sayımı yapıldı. Her şişeden 3 örnekleme yapılarak bunların ortalaması alındı ve 10 µl sıvıdaki ortalama protoskoleks sayısı belirlendi. Daha sonra ortalama 50, 100, 200, 400, 800, 1000 protoskoleks kullanılarak ekstraksiyon yapıldı. 200 protoskoleksin altında yapılan ekstraksiyondan elde edilen genomik DNA kullanılarak yürütülen PZR'de band elde edilemedi. Neticede 200 ve üzerinde protoskoleks taşıyan örneklerden yapılan ekstraksiyondan elde edilen genomik DNA kullanılarak yapılan PZR'de edilen bandların kalitesinin aynı olduğu görüldü ve çalışmanın geri kalanında her örnek için DNA ekstraksiyonunda ortalama 200 protoskoleks kullanıldı.

4.2.1.2. Ekstraksiyon Aşamaları

Öncelikle protoskoleksler veya duruma göre germinal membran 5 kez PBS ile yıkanıp 2 mg/ml Proteinaz-K ihtiva eden 500 µl TEN-SDS solüsyonu içerisinde 56 °C'de 4 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon süresince tüpler periyodik aralıklarla vortekslenerek sindirim işleminin daha etkili olması sağlandı. Sindirim işleminden sonra bu solusyon üzerine 6 M NaCl'den 250 µl ilave edilip 5 sn vortekslendi. Takiben 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant temiz bir ependorf tüpe alınıp pellet atıldı. Hedef DNA kadar (600µl) fenol-kloroform-izoamil alkol ilave edildi ve elle 5 dk kadar alt-üst edildi. Sonra 13.000

rpm’de 10 dk santrifüj edilip oluşan iki fazdan üst kısım fenollü kısma değmeden alındı. Hedef DNA’nın 1/10’u kadar 3 M Sodyum asetat ve 2.5 katı kadar saf etil alkol ilave edilip -20 °C’de bir gece inkubasyona bırakıldı. Ertesi gün tüpler 13.000 rpm’de 10 dk santrifüj edilip süpernatant atıldı ve pellet üzerine 1ml %70’lik etil alkol ilave edilerek tekrar 13.000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve tüpler ters çevirilerek kurumaya bırakıldı. Pellet, üzerine 50 µl steril distile su eklenerek sulandırıldı ve hedef DNA olarak kullanıldı.

4.2.1.3. Ekstrakte Edilen Ürünlerdeki DNA Miktarının Belirlenmesi

Ekstraktlardaki DNA miktarı spektrofotometre (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer) ile ng/µl olarak belirlendi.

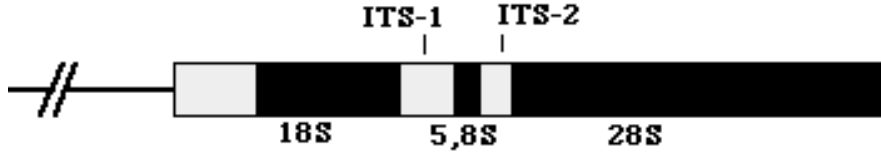
4.2.2. Ribozomal Internal Transcribed Spacer 1 (ITS-1) ve Mitokondrial Sitokrom Oksidaz I (CO1) Geninin PZR ile Çoğaltılması

Toplam 50 µl’lik hacimde hazırlanan PZR karışımına 5 µl 10X PZR buffer, 5 µl 25 mM MgCl₂, deosinükleotidlerin her birinden 250 µM, 1.25 U *Taq* DNA Polymerase enzimi (MBI Fermentas, Lithuania), primer çiftlerinin her birinden 20 pmol ve ortalama 200 ng template DNA ilave edildi. PZR amplifikasyonunda 95 °C’de 2 dk ön denatürasyon aşamasını takiben, toplam 35 PZR siklusu 95°C’de 1 dk denaturasyon, 50 °C’de 1 dk annealing, 72 °C’de 1 dk sentez olarak gerçekleştirildi. Son siklusu takiben 72 °C’de 5 dk son uzama işlemi yapıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu Thermo-Hybaid PX2 cihazında gerçekleştirildi. Çalışmada ITS-1 genini çoğaltmak için BD1 ve 4S, CO1 genini çoğaltmak için JB3 ve JB4.5 adlı primerler (Bio Basic, Markham Onterio,

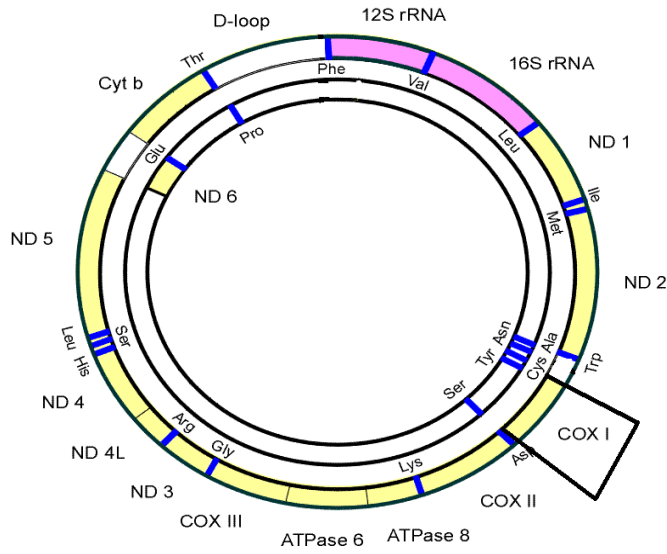
Canada) kullanıldı. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda elde edilen ürünler agaroz jel elektroforeze tabi tutuldu. Bu amaçla %1,5'lık agaroz jel hazırlandıktan sonra, 15 µl PCR ürünü, 5 µl yükleme solüsyonu (Promega, Madison, WI, USA) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Elektroforez işlemi Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tampon solüsyonu kullanılarak jel tankında 90 voltta 1 saat süreyle gerçekleştirildi. Daha sonra jel, ethidium bromide (10mg/ml) ile 30 dk boyanıp, UV transilluminatörde bandların varlığı yönünden incelendi. Bandların moleküler ağırlığını belirlemek için 100 bp'lik marker (Promega, Madison, WI, USA) kullanıldı. PZR uygulamalarında pozitif kontrol olarak daha önce DNA dizi analizi yaptırılarak koyun suşu olduğu belirlenen koyun izolatının DNA'sı, negatif kontrol olarak ise steril distile su kullanıldı.

Tablo 4. *Echinococcus* cinsinin PZR analizinde ve tiplendirilmesinde kullanılan primerler.

Primer	Gen bölgesi	Nükleotid Dizisi	Kaynak
BD1	ITS-1	GTCGTAACAAGGTTTCCGTA	21
4S	ITS-1	TCTAGATGCGTTCGA(G/A)TGCGATG	21
JB3	CO1	TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT	21
JB4.5	CO1	TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG	21



Şekil 4. Ribozomal ITS-1 gen bölgesi (7)



Şekil 5. Mitokondrial CO1 gen bölgesi (8)

4.2.3. ITS-1 Genin RFLP Analizi (PZR-RFLP)

Elektroforez işlemini takiben ITS-1 geni yönünden pozitif olduğu belirlenen PZR ürünleri restriksiyon (kesme) işlemine tabi tutuldu. *CfoI* (Promega, 10u/μl, Madison, WI, USA), *AluI* (Bioron, 10u/μl, Ludwigshafen, Germany), *RsaI* (Bioron, 10u/μl, Ludwigshafen, Germany), *MspI* (Bioron, 10u/μl, Ludwigshafen, Germany) restriksiyon enzimleri ile ayrı ayrı kesimleri gerçekleştirmek amacıyla 10μl PZR ürünü, 0.5μl restriksiyon enzimi, 2μg BSA, 2

µl 10X restriksiyon buffer ve 5.5 µl steril distile su kullanıldı. *CfoI*, *AluI* ve *RsaI* enzimleri için 37 °C’de ve *MspI* enzimi için 55°C’de 2 saatlik inkubasyon işlemi uygulandı. Kesim işlemine maruz bırakılan ürünler %3’lük agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. Ethidium bromide ile boyamayı takiben oluşan profiller UV transilluminatörde analiz edildi ve fotoğraflandı (Fuji Film Thermal Imaging System, FTI-500).

4.2.4. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz 1 (CO1) Geninin Dizilenmesi

Mitokondrial CO1 gen ürünlerinin 11 tanesi REFGEN (Ankara, Türkiye) firmasına 3 tanesi de Queensland Enstitüsü’nün Moleküler Parazitoloji Laboratuvarına (QIMR, Queensland, Australia) gönderilerek çift yönlü DNA dizi analizi yaptırıldı ve sonuçlar BLAST search’le (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) GenBank’taki sonuçlarla karşılaştırıldı.

4.2.5. PZR İşleminde Kullanılan Ayraçlar

4.2.5.1 DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Ayraçlar

Proteinase-K Solusyonu (Promega, Madison, WI, USA)

Bu solusyon 1 ml’inde 25 mg proteinase-K olacak şekilde hazırlandı ve porsiyonlara ayrılarak kullanılıncaya kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

Fosfat Buffer solüsyonu (1X PBS)

NaCl	8 gr
KCl	0.2 gr
Na ₂ HPO ₄	1.44 gr
KH ₂ PO ₄	0.24 gr

Bu karışımın pH'sı 7.4'e ayarlanıp toplam hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

TEN-SDS Solüsyonu

Tris-HCl	50 mM (pH=8)
EDTA	5 mM
NaCl	100 mM
SDS	%10 (w/v)

Tris-HCl, EDTA, NaCl karışımından 9 kısım alınıp 1 kısım %10'luk SDS ile karıştırıldı.

50 mM Tris-HCl (Calbiochem, Darmstadt, Germany)

900 ml distile suda 6.055 gr Tris baz çözdürüldü. HCl ile pH=8'e ayarlanıp, son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

5 mM EDTA (Calbiochem, Darmstadt, Germany)

1000 ml distile suda 1.8612 gr EDTA çözdürüldü.

100 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Germany)

1000 ml distile suda 5.844 gr NaCl çözdürüldü.

%10 SDS (Applichem, Darmstadt, Germany)

1000 ml distile suda 100 gr SDS çözdürüldü.

6 M NaCl solüsyonu (Merck, Darmstadt, Germany)

35 gr NaCl 100 ml distile suda çözdürüldü.

3 M Sodyum Asetat solüsyonu (Merck, Darmstadt, Germany)

40.8 gr Sodyum Asetat 100 ml distile suda çözdürüldü.

4.2.5.2. PZR Analizinde Kullanılan Ayraçlar

10 X PCR Buffer (MBI Fermentas, Lithuania)

750 mM Tris-HCl (pH=8,8; 25 °C)

200 mM (NH₄)₂SO₄

% 0,1 Tween 20

Her PCR numunesi için 5 µl kullanıldı.

MgCl₂ (MBI Fermentas, Lithuania)

25 mM MgCl₂ her PZR numunesi için 5 µl kullanıldı.

dNTP Set (100 mM; dATP, dTTP, dCTP, dGTP; MBI Fermentas, Lithuania)

Her deoksin kleotitten eşit oranda alındı ve steril distile su ile 1/20 oranında sulandırıldı. Her PZR numunesi için 4  l kullanıldı.

Taq DNA Polymerase Enzimi (5 U/  l; MBI Fermentas, Lithuania)

Her PCR numunesi için 1,25 U (0,25  l) kullanıldı.

Primerler (Bio Basic, Markham Onterio, Canada)

Çalışmada kullanılan primerlerin tamamı Bio Basic firmasından temin edildi. Primerler PZR'de her numune için 20 pmol olacak şekilde sulandırıldı.

4.2.5.3 PZR-RFLP Analizinde Kullanılan Ayraçlar

***CfoI* Restriksiyon Enzimi (10u/ l, Promega, Madison, WI, USA)**

Her PZR ürünü için 0.5  l enzim kullanıldı.

***AluI* Restriksiyon Enzimi (10u/ l, Bioron, Ludwigshafen, Germany)**

Her PZR ürünü için 0.5  l enzim kullanıldı.

***RsaI* Restriksiyon Enzimi (10u/ l, Bioron, Ludwigshafen, Germany)**

Her PZR ürünü için 0.5  l enzim kullanıldı.

***MspI* Restriksiyon Enzimi (10u/μl, Bioron, Ludwigshafen, Germany)**

Her PZR ürünü için 0.5μl enzim kullanıldı.

10X restriksiyon buffer (*CfoI*, Promega, Madison, WI, USA)

60 mM Tris-HCL (pH:7.5)

1M NaCL

60 mM MgCL₂

10 mM DTT

Her PZR ürünü için 2 μl restriksiyon buffer kullanıldı.

BSA (Bovine Serum Albumin) (0.1 mg/ml, Promega, Madison, WI, USA)

Her PZR ürünü için 2 μg BSA kullanıldı.

10X restriksiyon buffer (*AluI*, *RsaI*, *MspI*, Bioron, Ludwigshafen, Germany)

10 mM Tris-HCl (pH=7.9)

10 mM MgCl₂

1 mM DTT

Her PZR ürünü için 2 μl restriksiyon buffer kullanıldı.

BSA (Bovine Serum Albumin) (100 μg/ml, Bioron, Ludwigshafen, Germany)

Her PZR ürünü için 2 μg BSA kullanıldı.

4.2.5.4. Elektroforez İşleminde Kullanılan Solusyonlar

5X Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) Elektroforez Tampon Solüsyonu

Tris	54,4 g
Borik Asit	27,2 g
EDTA	4,6 g

Yukarıdaki maddeler tartılıp distile su ile 1 lt'ye tamamlanıp pH 8,3'e ayarlandı. Elektroforez solüsyonu olarak 1 X oranında sulandırılarak kullanıldı.

Agarose LE, (Promega, Madison, US)

Agaroz jel 1XTBE ile hazırlandı.

100bp DNA ladder (Promega, Madison, US)

Her elektroforez işleminde 7.5 µl kullanıldı.

Loading Dye Solüsyonu (6X; Promega, Madison, US)

1/6 oranında sulandırıldı ve her 15 µl PCR ürünü için 5 µl kullanıldı.

Ethidium Bromide (Promega, Madison, US)

Ethidium bromide solusyonundan 0.5 µl alınarak distile su ile 15 µl'ye tamamlandı. Agaroz jeli boyama için 300 ml distile suya 600 µl ethidium bromide katılarak kullanıldı.

5. BULGULAR

Bu çalışma süresince 124'ü fertil, 189'u da steril olmak üzere toplam 313 hidatik kist materyali toplanmış ve bu kistlerin hayvan gruplarına göre dağılımı Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Mikroskopik inceleme sonrası fertil ve steril kistlerin hayvan gruplarına göre dağılımı

Türler	Kist Sayıları		Toplam
	Fertil kist sayısı	Steril kist sayısı	
Sığır	14	68	82
Koyun	175	49	224
Keçi	-	7	7
Toplam	189	124	313

Toplanan 313 hidatik kist materyalinden yeteri kadar protoskoleks içermeyen, ön çalışma esnasında tükenen ve DNA ekstraksiyonu başarılı olmayan kist materyalleri çıktıktan sonra kalan toplam 205 adet izolat çalışmada kullanılmış, bu kistlerin organlara ve hayvan türlerine göre dağılımları ve fertilitte durumları Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Çalışmada incelenen izolatların organlara göre dağılımı

Türler	Karaciğer (KC)		Akciğer (AC)		KC ve AC		Toplam
	Fertil	Steril	Fertil	Steril	Fertil	Steril	
Sığır	6	-	8	5	-	-	19
Koyun	49	-	65	2	61	2	179
Keçi	-	-	-	7	-	-	7
Toplam	55	-	73	14	61	2	205

Tablo 6’da da görüldüğü gibi, koyunlardan elde edilen toplam 179 izolatın 4’ü (%2,23), sığırlardan elde edilen 19 izolatın 5’i (%26.3) ve 7 keçi izolatının hepsi steril bulunmuştur.

5.1. ITS-1 PZR Bulguları

Bu çalışma ile örnek toplanan 6 farklı ildeki sığır, koyun ve keçilere ait toplam 205 izolatın ribozomal ITS-1 gen bölgesi PZR-RFLP tekniği ile incelenmiştir. Bütün örneklerin *CfoI*, *AluI*, *RsaI* ve *MspI* enzimleriyle kesimi yapılmış ve bakısı yapılan izolatların illere ve hayvan gruplarına göre dağılımı Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Ribozomal ITS-1 gen bölgesi PZR-RFLP tekniği ile incelenen izolatların sayısı ve illere göre dağılımı

Türler	Örnek Toplanan İller						Toplam
	Elazığ	Malatya	Erzurum	Van	Şanlıurfa	Diyarbakır	
Sığır	4	3	6	3	-	3	19
Koyun	30	31	21	28	41	28	179
Keçi	1	-	1	4	1	-	7
Toplam	35	34	28	35	42	31	205

Çalışma neticesinde farklı illerden toplanan sığır, koyun ve keçi izolatları içinden seçilen 14 adet izolatın mitokondrial CO1 gen bölgesinin DNA dizisi belirlenmiş ve bunların illere ve hayvan gruplarına göre dağılımı Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Mitokondrial CO1 gen bölgesinin DNA dizisi belirlenen izolatlarının sayısı ve illere göre dağılımı

Türler	Örnek Toplanan İller						Toplam
	Elazığ	Malatya	Erzurum	Van	Şanlıurfa	Diyarbakır	
Sığır	2	1	1	1	-	1	6
Koyun	1	1	-		1	1	4
Keçi	1	-	1	1	1	-	4
Toplam	4	2	2	2	2	2	14

Protoskoleks ve germinal membranlardan izole edilen DNA’ların BD1 ve 4S primerleriyle PZR amplifikasyonuna tabi tutulmaları sonucunda bütün örneklerde biri 1000 bp diğeri 1100 bp olan iki band elde edilmiştir (şekil 6).

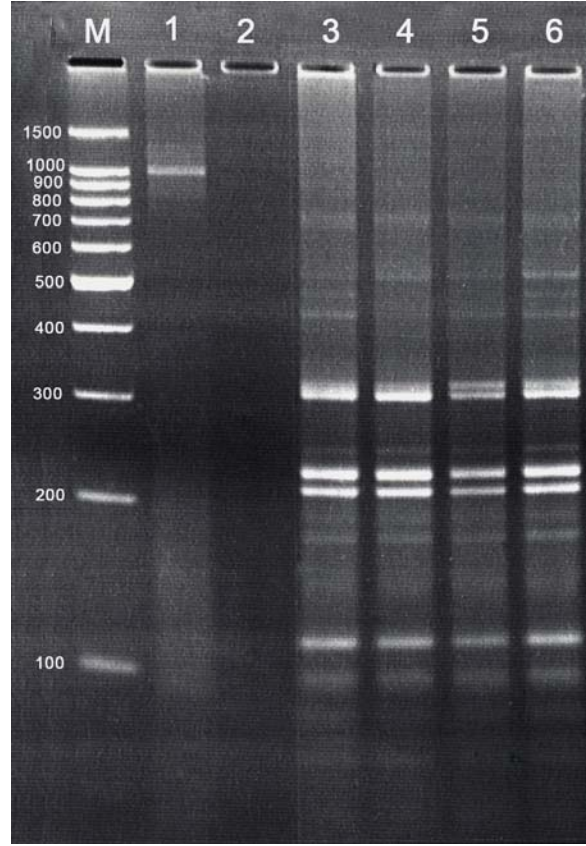


Şekil 6. *Echinococcus granulosus*'un koyun, sığır ve keçi izolatlarının ITS-1 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucunda oluşan bandların görünümü **M:** DNA marker, **1:** Pozitif kontrol, **2:** Negatif kontrol, **3:** Koyun izolatu, **4:** Sığır izolatu, **5:** Keçi izolatu

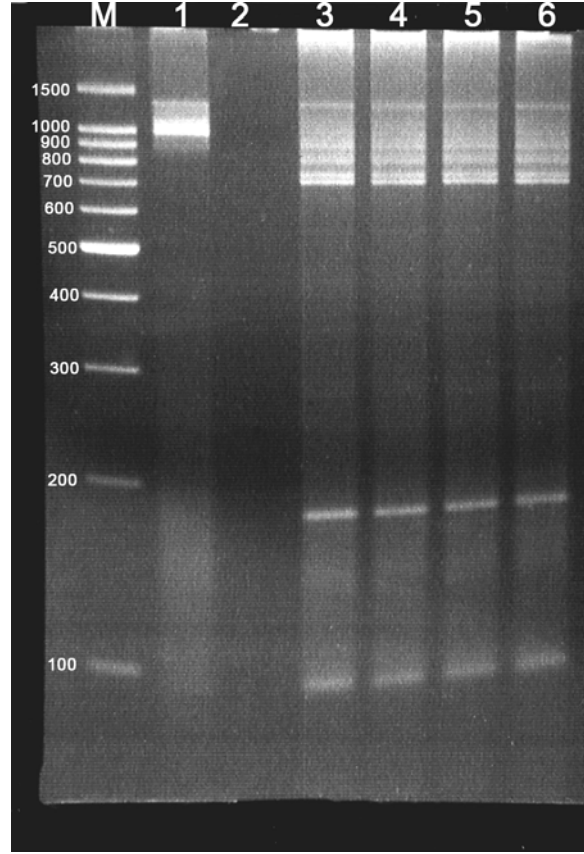
5.2. ITS-1 RFLP Bulguları

Tablo 6'de özetlenen ITS-1 pozitif PZR ürünlerinin *CfoI*, *RsaI*, *AluI* ve *MspI* adlı restriksiyon enzimleri ile kesimleri sonucunda şekil 7, 8, 9, 10'da gösterilen band profilleri elde edilmiştir. Adı geçen dört enzim ile de kesimi yapılan bütün örneklerde aynı band profili elde edilmiş, bu band profillerinin pozitif kontrol (koyun suşu-G1) ile kıyaslandığında hepsinin aynı olduğu ve

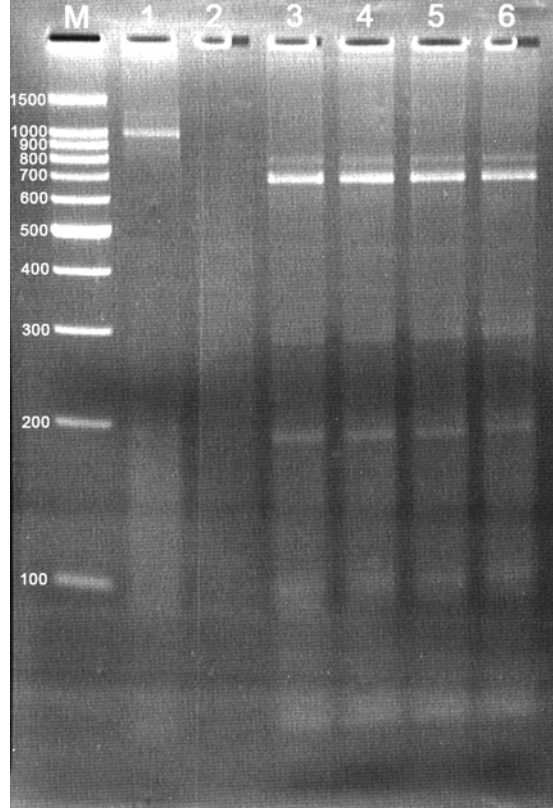
neticede bu çalışmada bakısı yapılan bütün izolatların koyun suşu (G1) olduğu belirlenmiştir.



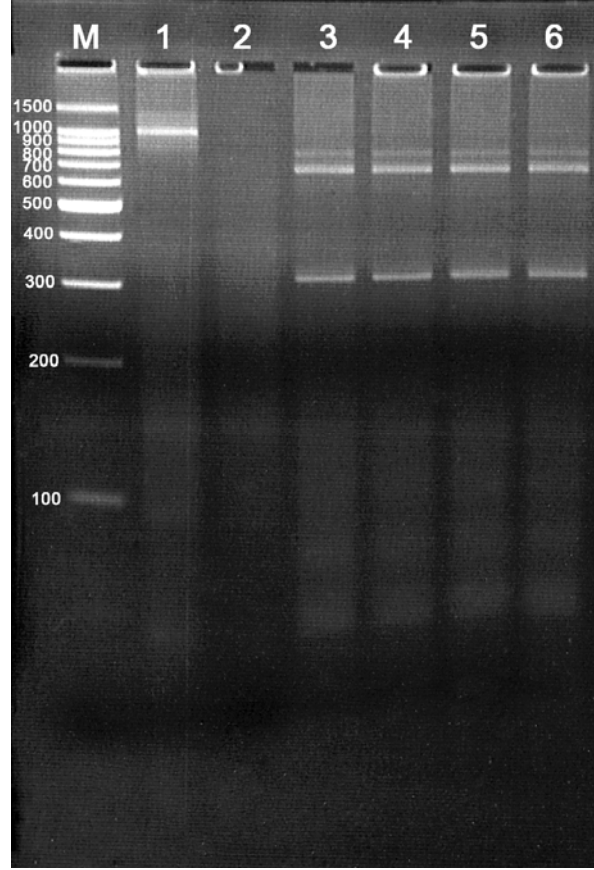
Şekil 7. *CfoI* ile kesimi yapılan ITS-1 PZR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jel görüntüsü. **M:** Marker, **1:** Master miks içerisinde PZR ürünü var restriksiyon enzimi yok **2:** Master mix içerisinde restriksiyon enzimi var DNA yok **3:** Koyun (G1) suşunun band profilleri (pozitif kontrol) **4:** Koyun izolatu **5:** Sığır izolatu **6:** Keçi izolatu.



Şekil 8. *AluI* ile kesimi yapılan ITS-1 PZR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jel görüntüsü. **M:** Marker **1:** Master miks içerisinde PZR ürünü var restriksiyon enzimi yok **2:** Master mix içerisinde restriksiyon enzimi var DNA yok **3:** Koyun (G1) suşunun band profilleri (pozitif kontrol) **4:** Koyun izolatu **5:** Sığır izolatu **6:** Keçi izolatu.



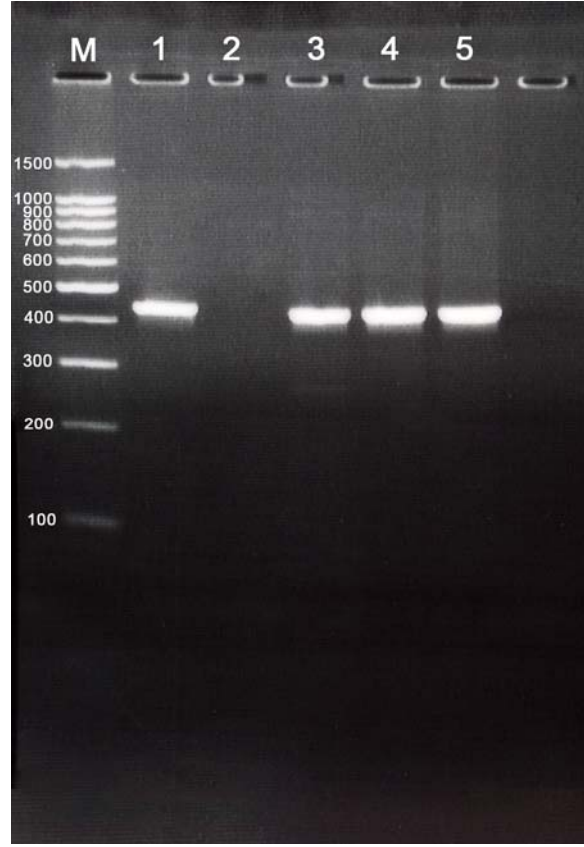
Şekil 9. *MspI* ile kesimi yapılan ITS-1 PZR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jel görüntüsü. **M:**Marker, **1:**Master miks içerisinde PZR ürünü var restriksiyon enzimi yok **2:**Master mix içerisinde restriksiyon enzimi var DNA yok **3:**Koyun (G1) suşunun band profilleri (pozitif kontrol) **4:** Koyun izolatu **5:**Sığır izolatu **6:** Keçi izolatu.



Şekil 10. *RsaI* ile kesimi yapılan ITS-1 PZR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jel görüntüsü. **M:**Marker **1:**Master miks içerisinde PZR ürünü var restriksiyon enzimi yok **2:**Master mix içerisinde restriksiyon enzimi var DNA yok **3:**Koyun (G1) suşunun band profilleri (pozitif kontrol) **4:**Koyun izolatu **5:**Sığır izolatu **6:** Keçi izolatu.

5.3. Mitokondrial CO1 PZR Bulguları

Çalışmada protoskoleks ve germinal membranlardan elde edilen genomik DNA'ların parazitin mitokondrial CO1 gen bölgesini çoğaltan JB3 ve JB 4.5 primerleriyle PZR amplifikasyonuna tabi tutulmaları sonucunda 446 bp büyüklüğünde band elde edilmiş ve şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11. *Echinococcus granulosus*'un koyun, sığır ve keçi izolatlarının mitokondrial CO1 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucunda oluşan 446 bp'lik band **M**:DNA marker **1**:Pozitif kontrol **2**:Negatif kontrol **3**:Koyun izolatı **4**:Sığır izolatı **5**:Keçi izolatı.

5.4. Mitokondrial CO1 Genin Çift Yönlü DNA Dizi Analizi Sonuçları

Elde edilen izolatların PZR-RFLP profillerinin hepsinin aynı olması sonucunda rasgele seçilen 2 adet sığır ve 1 adet koyun izolatına ait CO1 gen ürünleri Queensland Enstitüsü'nün Moleküler Parazitoloji Laboratuvarına (QIMR, Queensland, Australia); 4 adet sığır, 3 adet koyun ve 4 adet keçiye ait CO1 gen ürünleri ise REFGEN (Ankara, Türkiye) firmasına gönderilerek çift yönlü DNA

dizi analizi yaptırılmıştır. Elde edilen verilerin BLAST search ile (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) GenBank'taki sonuçlarla karşılaştırılması sonucunda; Türkiye'nin Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde bulunan Elazığ, Malatya, Erzurum, Van, Şanlıurfa ve Diyarbakır illerinden elde edilen ve bu çalışmaya dahil edilen sığır, koyun ve keçi izolatlarının hepsinin koyun suşu (G1) olduğu belirlenmiştir.

Tablo 9. Bakısı yapılan izolatların coğrafik kökeni, konak orijini ve diğer özellikleri.

Örnek No	Konak	Orijin	Parazitli organ	Fertilite	Genbank Accession No
1	Sığır	Erzurum	Karaciğer	Fertil	EF689726
2	Sığır	Malatya	Akciğer	Fertil	EF693891
3	Sığır	Elazığ	Karaciğer	Fertil	EF693892
4	Sığır	Van	Karaciğer	Fertil	EU006775
5	Koyun	Malatya	Akciğer	Fertil	EU006776
6	Koyun	Malatya	Karaciğer	Fertil	EU006777
7	Koyun	Malatya	Karaciğer	Fertil	EU006778
8	Keçi	Elazığ	Akciğer	Steril	EU006780
9	Keçi	Elazığ	Akciğer	Steril	EU006781
10	Keçi	Elazığ	Akciğer	Steril	EU006774
11	Keçi	Elazığ	Akciğer	Steril	EU006782
12	Koyun	Elazığ	Karaciğer	Fertil	-
13	Sığır	Elazığ	Akciğer	Steril	-
14	Sığır	Elazığ	Karaciğer	Fertil	-

6. TARTIŞMA

Echinococcus granulosus'un neden olduğu kistik echinococcosis dünya çapında yaygın ve son derece önemli bir helmintozoonozdur. Hastalık insanlarda oldukça ciddi ve bazen ölümcül olabilirken, hayvanların çeşitli organ ve dokularında oluşturduğu yapısal ve fonksiyonel bozukluklar nedeniyle de ekonomik kayıpların oluşmasına neden olmaktadır. Genellikle son konak köpek, tilki, çakal, kurt gibi bir etçil olmasına rağmen, etkenin farklı suşları farklı coğrafi bölgelerde sığır, koyun, keçi, geyik, deve, manda, tavşan, kanguru, domuz, at, eşek gibi çok sayıda memeli ara konağı ve insanları enfekte edebilmektedir (6, 96, 152).

Bu suş farklılıkları parazitin yaşam siklusu, konak spesifitesi, gelişim hızı, patojenitesi, antijenitesi, kemoteropotiklere duyarlılığı, bulaşma dinamikleri, hastalığın epidemiyoloji ve kontrol teknikleri üzerinde son derece önemlidir. Bu bakımdan endemik bölgelerde kontrol ve eradikasyon programlarının hayata geçirilebilmesi, bu bölgelerde baskın suş veya suşların belirlenmesine bağlıdır. *Echinococcus* cinsi içerisinde bulunan farklı türleri belirlemek için morfolojik, biyolojik ve epidemiyolojik kriterler yeterli olmasına rağmen; suş ayrımı için morfolojik, biyolojik, biyokimyasal, epidemiyolojik ve moleküler kriterler gibi çok sayıda parametreden yararlanılmaktadır. Morfolojik ve biyolojik çalışmalar, suş tayininde çok değerli bilgiler sağlamasına rağmen; bunların konak ve çevresel faktörlerden etkilenebileceği ve genetik düzeydeki farklılığı yansıtmayacağı asla unutulmamalıdır. Halbuki moleküler teknikler, parazit genomunun doğrudan

karakterizasyonuna olanak sağlarken konağa ve çevreye ait faktörlerden etkilenmemektedir (15, 19, 39, 152, 155).

Yapılan moleküler çalışmalar sonucunda *E.granulosus* türü içerisinde koyun suşu (G1), Tazmanyaya koyun suşu (G2), manda suşu (G3), at suşu (G4), sığır suşu (G5), deve suşu (G6), domuz suşu (G7), geyik suşu (G8), vahşi yaşam suşları (aslan suşu, lagomorph suşu), domuz suşuna çok benzeyen ancak ondan genetik olarak ayrılan insan (G9) suşu ve Fennoscandian geyik suşu (G10) olmak üzere çok sayıda suşun varlığı ortaya konulmuştur. Ayrıca suş içi genetik varyasyonların olabileceği, G1, G4 ve G5 suşlarındaki genetik farklılıkların bu suşların tür (G1, G2 ve G3 için *E.granulosus* sensu stricto, G4 için *E.equinus*, G5 için *E.ortleppi*) statüsünde ele alınmasını gerektirecek kadar fazla olduğu, *E.multilocularis*'in genotipleri arasındaki nükleotid farklılığının *E.granulosus*'un farklı suşları arasındaki nükleotid farklılığından 10 kat daha düşük olduğu, *E.oligarthrus* ve *E.vogeli* türlerinin farklı suşlara sahip olmadığı ortaya konulmuştur (39, 60, 75, 122, 132, 155).

Günümüzde *Echinococcus* cinsi içerisindeki genetik varyasyonu belirlemek amacıyla prob hibridizasyon tekniği, PZR, RFLP, PZR-RFLP, RAPD-PZR, SSCP, ddF ve DNA dizileme gibi çok sayıda moleküler teknik kullanılmaktadır. Bu çalışmada kullanılan PZR-RFLP ve DNA dizileme teknikleri *Echinococcus* cinsi içerisindeki genetik varyasyonu belirlemek amacıyla ayrı ayrı ya da kombine olarak çok sayıda çalışmada kullanılmıştır (2, 6, 9, 17, 18, 21, 31, 43, 45, 47, 48, 53, 59, 61, 62, 75, 76, 83, 90, 93, 103, 104, 106, 113, 124, 132, 133, 134, 136, 165, 166, 177, 178, 181-183).

PZR-RFLP'nin ayırım gücü orta düzeyde olmasına rağmen; uygulaması ve yorumlaması kolay olup, kısa sürede sonuç vermektedir. Tekniğin tiplendirilebilirliği ve stabilitesi mükemmel, laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği iyi, kurma maliyeti orta düzeyde ve sistem standardize edildikten sonra test başı maliyet düşüktür (34).

DNA dizileme ise moleküler teknikler arasında en klasik ve en güvenilir olanıdır. Genotipik farklılıkların direkt ölçümüne olanak sağlayan başka bir teknik bulunmaması, DNA dizilemeyi referans yöntem haline getirmiştir. Sonuçların yorumlanmasında son derece dikkatli olunması gerekmektedir. Çünkü artefaktlar problem oluşturabilmektedir. Ancak her iki DNA zincirinin dizi analizi yapılarak, artefakt ve diğer faktörlere bağlı hatalar en aza indirilmektedir. Tekniğin stabilitesi, laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği iyi, ayırım gücü yüksek, tiplendirilebilirliği mükemmel olup uygulaması zor ve maliyeti yüksektir. Sonuçlar PZR-RFLP'den daha uzun sürede alınmaktadır (34, 104).

Villalobos ve ark. (170), BD1 ve 4S primerlerini kullanarak ribozomal ITS-1 bölgesini çoğaltmış ve G7 genotipi için bu bölgenin 1,0 ve 1,1 kb büyüklüğünde band verdiğini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar G1 genotipi için ise 0,9 ve 1,0 kb büyüklüğünde bandlar elde ettiklerini ve sadece ITS-1 bölgesinin bu şekilde çoğaltılması ile genotiplendirme yapılabileceğini ve G1 ve G7 suşlarının ayırımının yapılabileceğini ifade etmişlerdir. Yine Šnábel ve ark. (136), BD1 ve 4S primerlerini kullanarak ribozomal ITS-1 bölgesini çoğaltmış ve G7 genotipi için bu bölgenin 1,0 ve 1,1 kb büyüklüğünde band verdiğini belirtmişlerdir. Ancak bu çalışmada ribozomal ITS-1 bölgesinin aynı primerle çoğaltılması ile 1,0 ve 1,1 kb büyüklüğünde iki band elde edilmiş olup bu

örneklerin DNA dizi analizi neticesinde G1 suşu olduğu belirlenmiştir. Böylelikle Villalobos ve ark. (170), ile Šnáběl ve ark. (136)'nın aksine sadece ITS-1 bölgesinin tek başına çoğaltılmasının suş ayırımında bir katkısının olmadığı, suş ayırımının yapılabilmesi için bu bölge çoğaltıldıktan sonra restriksiyon enzimleri ile kesilerek band profillerinin incelenmesi ve gereken durumlarda mitokondrial CO1 geninin dizilenmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

Ribozomal ITS-1 bölgesinin PZR-RFLP analizinde restriksiyon enzimi olarak farklı çalışmalarda değişik enzimler kullanılmıştır. Bowles ve ark. (18), *CfoI*, *MspI*, *AluI*, Bowles ve McManus (21), *CfoI*, *RsaI*, *AluI*, *MspI* ve *TaqI*, M'rad ve ark. (83), *CfoI*, *HpaII*, McManus ve ark. (93), *CfoI*, Rosenzvit ve ark. (124), *CfoI*, *HpaII* ve *RsaI*, Harandi ve ark. (61), *HhaI*, *RsaI*, *AluI*, *MspI* ve *TaqI*, Maravilla ve ark. (90), *HhaI*, *RsaI*, *AluI* ve *MspI*, Scott ve ark. (132), *CfoI*, *RsaI*, *MspI* ve *AluI*, Ahmadi ve Dalimi (2), *HpaII*, *RsaI*, *AluI*, ve *TaqI*, Villalobos ve ark. (170), *CfoI*, *RsaI*, ve *MspI* adlı enzimleri kullanmışlardır.

Bu çalışmada da restriksiyon enzimi olarak genelde birçok çalışmada kullanılan *CfoI*, *RsaI*, *AluI* ve *MspI* adlı enzimler kullanılmıştır.

PZR-RFLP tekniği ile *E.granulosus*'un insan, sığır, koyun, keçi, at, eşek, deve, manda, domuz, kanguru ve köpek izolatları; *E.multilocularis*, *E.vogeli* ve *E.oligarthrus*'un ise rodent izolatları olmak üzere toplam 149 izolat incelenmiş, bu teknik ile dört *Echinococcus* türünün birbirinden ayrılabilceği belirtilmiştir. Ayrıca *E.granulosus* izolatlarının incelenmesi sonucunda da G1, G4, G5 ve G6 olmak üzere 4 farklı suş belirlenmiştir (21).

Dünya'nın değişik coğrafik bölgelerinde *Echinococcus* suşlarının PZR-RFLP ve DNA dizi analizi ile belirlenmesine yönelik çok sayıda çalışma

yapılmıştır. Hollanda’da 11 yaşında bir erkek çocuğun dalağından ameliyatla çıkarılan hidatik kist materyalinin PZR-RFLP ve DNA dizileme teknikleri ile incelenmesi sonucunda, etkenin *E.granulosus*’un G5 suşu olduğu ve sığırların insan enfeksiyonlarına rezervuarlık yapabileceği belirtilmiştir (18). Scott ve ark. (132), Polonya’da bir hastadan ince iğne aspirasyon tekniği ile alınan biyopsi materyalini incelemişler ve hastanın yaygın olan G1 suşu ile enfekte olmadığını belirlemişlerdir. Bunun üzerine ribozomal ITS-1 fragmentini hedef alarak yaptıkları PZR-RFLP analizi sonucunda, etkenin domuz suşuna çok benzeyen ancak domuz suşundan ve daha önce bildirilen suşlardan farklı bir suş olduğunu belirtmişler ve buna insan (G9) suşu adını vermişlerdir (125). Snabel ve ark. (136), Slovakya’da yaptıkları bir çalışmada *E.granulosus*’un G7 ve G9 genotiplerinin NAD1 sekansları içerisinde ayıramayacağını belirtmiş ve bu iki genotipi birbirinden ayırmak için PZR-RFLP yöntemi ile ITS-1 bölgesini incelemişlerdir. Sonuç olarak elde edilen bandların G7 genotipi için tipik olduğunu ve bu genotipin Slovakya’da bulunduğunu belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada (17), ITS-1 bölgesinin PZR-RFLP analizi ile geyik suşunun *E.granulosus*’un diğer suşlarından ayrılabilceği belirtilmiştir. Arjantin’de PZR-RFLP ve DNA dizileme (CO1 ve NAD1 genleri) tekniklerinin birlikte kullanılarak yapıldığı bir çalışmada (124), *E.granulosus*’un 4 farklı suşu (G1, G2, G6, G7) belirlenmiş ve bu çalışma ile Arjantin’de ilk kez G2 ve G7 suşlarının insan enfeksiyonuna neden olduğu ortaya konmuştur. İtalya’nın Sardinya bölgesinde toplam 91 adet koyun, sığır ve domuz izolatu PZR-RFLP ve DNA dizileme teknikleri ile incelemiş ve 89 izolatu G1 suşu, 2 adet domuz izolatının ise G7 suşuna ait olduğu belirlenmiştir (167). *Echinococcus granulosus*’un

İspanyol suşlarının ayrımı amacıyla İspanya'nın çeşitli bölgelerinden elde edilen 53 izolatın karakterizasyonu için PZR-RFLP yöntemi kullanılmıştır. Sonuç olarak; *E.granulosus*'un *E.multilocularis*'ten ayrımı yapılmış, İspanya'daki *E.granulosus* suşları tanımlanmış ve *E.granulosus*'un domuz izolatı içerisinde iki farklı genotipin bulunduğu belirlenmiştir. Domuz suşunun ileri ayrımını sağlamak amacıyla da NAD1 ve CO1 genleri çoğatılıp dizilenmiştir. Çalışma sonucunda İspanya'da G1 ve G7 genotiplerinin bulunduğu bir kez daha ortaya konulmuştur (53). Zhang ve ark. (182), İran'da 4 insan, 2 sığır, 3 koyun, 5 keçi ve 2 adet deve olmak üzere toplam 16 izolatı, PZR-RFLP ve DNA dizileme teknikleri ile incelemiş; insan sığır, koyun ve keçi izolatlarının G1 suşu, 2 adet deve izolatının ise G6 suşu olduğunu belirlemişlerdir. İran'da yapılan başka bir çalışmada (83), 50 insan, 166 sığır, 153 koyun ve 3 deve izolatı PZR-RFLP tekniği ile incelenmiştir. 37 izolatın CO1 geninin dizilenmesi ile tüm insan, sığır ve koyun izolatlarının G1 suşu olduğu, ancak 3 deve izolatının G6 suşu olduğu belirlenmiştir. Yine İran'da (2), çengel morfolojisi ve PZR-RFLP tekniği ile 12 insan, 23 koyun ve 21 deve izolatı incelenmiş, bu çalışmada da insan ve koyun izolatlarının tamamının G1 suşu, deve izolatlarının ise G6 suşu olduğu ortaya çıkmıştır. RFLP, PZR-RFLP ve mitokondrial genom analizinin kombinasyonu ile Çin'in kuzeybatısında insanların da dahil olduğu birçok ara konaktan elde edilen 117 izolat incelenmiş ve bu izolatların tamamının G1 suşu olduğu ortaya konmuştur (93). Bowles ve ark. (16), dünyanın çeşitli ülkelerinden kendilerine gönderilen 56 *Echinococcus* izolatının mitokondrial CO1 bölgesini dizileyerek dört *Echinococcus* türünü, *E.multilocularis*'in iki alt türünü ve *E.granulosus*'un 7 farklı suşunu birbirinden ayırmışlardır. Le ve ark. (76), *E.granulosus*'un 2 suşunu

(G1, G4) ve öteki Taeniid cestodların ve *Taenia crassiceps*'in tüm mitokondrial genomunu dizilemişler; DNA dizilerini *E.multilocularis* ve *Hymenolepis diminuta*'nın genomu ile karşılaştırmışlar, sonuçta tüm bu türlerin genom yapılarının benzer olduğunu görmüşlerdir. Protein kodlayan genlerin incelenmesi sonucunda da *E.granulosus*'un G1 ve G4 suşlarının birbirinden oldukça farklı olduğunu ve bunların özel bir statüyü hak ettiğini ileri sürmüşlerdir. Lavikainen ve ark. (75), dört ren geyiği ve bir Amerikan geyiğinden elde ettikleri toplam beş *E.granulosus* izolatının mitokodrial ve ribozomal genlerini dizilemişler ve Finlandiya'daki geyik suşunun Amerikan geyik suşuna benzediğini, ancak Amerikan geyik suşundan ve *E.granulosus*'un diğer suşlarından farklı olduğunu belirtmişler ve buna Fennoscandian geyik suşu (G10) adını vermişlerdir. Libya'nın batısında bulunan Benghazi bölgesinden toplanan 12 sığır, 3 insan, 5 deve ve 10 koyun izolatının mitokondrial CO1 geninin incelenmesi sonucunda izolatların tamamının G1 suşu olduğu belirlenmiştir (144). Bulgaristan'da *E.granulosus*'un sığır, koyun, domuz, çakal ve kurt izolatlarının nüklear ve mitokondrial gen dizilerinin incelenmesi sonucunda ara ve son konaklardaki predominant suşun G1 olduğu belirtilmiştir (22). Çin'in Xinjiang Uygur özerk bölgesinde 47 insandan elde edilen 67 hidatik kist materyalinin mitokondrial CO1 gen bölgesinin dizilenmesi sonucunda 45 hastanın G1, 2 hastanın ise G6 suşu ile enfekte olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada ayrıca 13 köpekten elde edilen 45 parazit materyali incelenmiştir. İncelenen erişkin parazitlerden 42 tanesinin G1 suşu olduğu belirlenmiştir. Ayrıca G1 suşu ile enfekte bir köpekte bulunan 3 adet erişkin parazitin G6 suşuna ait olduğu, son konaklarda *E.granulosus*'un farklı suşlarının neden olduğu miks enfeksiyonlara rastlanabileceği ifade edilmiştir (11).

Hindistan’da 1 sığır, 6 manda ve 5 koyun izolatının ITS-1, CO1 ve NAD1 gen bölgesi dizilenmiştir. NAD1 dizilerinin incelenmesi sonucunda izolatların tamamının G1 suşu olduğu, ancak CO1 dizilerinin incelenmesi sonucunda 2 koyun ve 1 manda izolatının G2 suşu olduğu gözlenmiştir. İlk defa bu çalışma ile mandalarda G2 suşunun enfeksiyona neden olduğu ortaya konmuştur (14).

Türkiye’de *E.granulosus*’un farklı izolatları içerisindeki genetik varyasyonu belirlemeye yönelik çalışmalar son derece sınırlıdır. Türkiye’den yurt dışına gönderilen 2 koyun izolatı Bowles ve McManus (16), tarafından PZR-RFLP tekniği ile incelenmiş ve G1 suşu olduğu tespit edilmiştir. Yine Türkiye’den gönderilen koyun izolatları Bowles ve ark. (21), tarafından DNA dizileme tekniği ile incelenmiş ve bu izolatların da G1 suşu olduğu ifade edilmiştir. Bağcı ve ark. (13), Türkiye’nin farklı bölgelerinden İstanbul’a kesim için getirilen koyunlardan elde ettikleri kist materyallerinde *E.granulosus*’un suşlarını araştırmışlardır. Çalışmada toplanan bütün örneklerin CO1 geninin dizi analizini yapmışlar, bakısını yaptıkları 100 koyun izolatının 98’inde G1 suşunu, 2’sinde de G3 (manda) suşunu tespit etmişlerdir. Türkiye ve Slovakya’daki kistik echinococcosis etkenlerinin genetik karakterizasyonunu sağlamak amacıyla yapılan bir ön çalışmada, Türkiye’den elde edilen 2 koyun ve 7 insan izolatı ile Slovakya’dan elde edilen 2 domuz izolatının CO1 ve NAD1 genleri PZR ile çoğaltıldıktan sonra SSCP yöntemi ile analiz edilmiştir. Slovakya’dan elde edilen domuz izolatının analizi sonucunda G7 genotipinin DNA dizileri ile tamamen aynı DNA dizileri elde edilirken; Türkiye’den elde edilen koyun izolatlarının G1-G3 aralığında olduğu, Türkiye’deki koyun ve insan izolatlarının genotiplerinin aynı olduğu ve Türkiye ve Slovakya’dan elde edilen izolatlar arasında belirgin

farklılıklar olduğu ortaya konmuştur. Buna bağlı olarak da her iki ülkede kendine özgü suşların olabileceği belirtilmiştir (181). Yıldız ve Gürcan (179), larval rostellar çengel morfolojisini kullanarak yaptıkları çalışmada, koyun ve sığırlardan elde ettikleri izolatların koyun suşuna ait olabileceğini belirtmişlerdir. Ütük ve ark. (166), yaptıkları bir ön çalışmada, Elazığ'daki bir kesimhaneden elde ettikleri 20 adet koyun izolatını RAPD-PZR tekniği ile incelemişler ve izolatların tamamının band profillerinin aynı olduğunu görmüşlerdir. Araştırmacılar bunun üzerine rastgele seçtikleri 2 örneğin mitokondrial CO1 geninin dizi analizini yapmışlar ve izolatların tamamının G1 suşu olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışma ile Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerindeki Elazığ, Malatya, Erzurum, Van, Şanlıurfa ve Diyarbakır'daki kesimhanelerden toplanan 179 koyun, 19 sığır ve 7 keçi izolatının ribozomal ITS-1 bölgesi PZR-RFLP tekniği ile incelenmiştir. Elde edilen izolatların hepsi aynı band profilini göstermiştir.

Echinococcus granulosus'un farklı suşlarını belirlemek amacıyla Bowles ve ark. (18), CO1 genini, yine bir başka çalışmada Bowles ve ark. (16), CO1 ve NDI genini, M'rad ve ark. (83), CO1 genini, Rosenzvit ve ark. (124), CO1 ve NDI genini, Maravilla ve ark. (90), CO1 genini, Scott ve ark. (132), NDI genini, Villalobas ve ark. (170), CO1 ve NDI genini, González ve ark. (53), CO1 ve NDI genini, Zhang ve ark. (182), CO1 ve NDI genini, Šnábel ve ark. (136), NDI genini, Lavikanien ve ark. (75), CO1 ve NDI genini, Kamenetzky ve ark. (66), CO1 genini, Bağcı ve ark. (13), CO1 genini dizilemişlerdir.

Bu çalışmada ise daha spesifik olması nedeni ile (14, 136) 6 sığır, 4 koyun ve 4 adet keçi izolatının mitokondrial CO1 gen bölgesi çoğaltılmış ve

dizilenmiştir. Elde edilen dizi analiz bilgilerinin değerlendirilmesi sonucunda sığır, koyun ve keçilerin dünyada en yaygın ve en patojen suş olduğu kabul edilen koyun suşu (G1) ile enfekte olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışma *E.granulosus*'un farklı izolatları içerisindeki genetik polimorfizmi belirlemek amacıyla Türkiye’de yapılan en kapsamlı çalışma olup, ilk defa PZR-RFLP ve DNA dizileme gibi son derece güvenilir, stabil ve birbirini tamamlayan iki moleküler teknik bir arada kullanılmıştır. Sığır ve keçi izolatlarının genetik polimorfizminin incelenmesi bakımından da yine Türkiye’de ilk çalışma olma özelliğine sahiptir.

Yapılan bu çalışma ile, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinden toplanan sığır, koyun ve keçi izolatları incelenmiş, bundan sonra Türkiye’de echinococcosis’e karşı etkin teşhis ve tedavi teknikleri, eradikasyon, aşı ve ilaç geliştirme çalışmalarına ışık tutacak ve dolayısıyla ülkemiz hayvancılık ekonomisine önemli katkı sağlayacak veriler elde edilmiştir. Elde edilen veriler sığır, koyun ve keçilerin insan enfeksiyonları için rezervuar konak olabileceğini ve bunun halk sağlığı açısından önemli olduğunu da ortaya koymuştur. Ülke genelinde etkin bir kontrol programının sağlanabilmesi için Türkiye’deki diğer bölgeleri kapsayan benzer çalışmaların yapılması *E.granulosus*'un ülkemizdeki olası diğer suşlarının belirlenmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Abo-Shehada MN. (1993). Some observations on hydatidosis in Jordan. J Helminthol 67: 248-252.
2. Ahmadi N, Dalimi A. (2006). Characterization of *Echinococcus granulosus* isolates from human, sheep and camel in Iran. Inf Gen Evol 6: 85–90.
3. Akyol ÇV. (2001). Hidatidoz ve halk sağlığı yönünden önemi. J Fac Vet Med 20: 137-142.
4. Akyol ÇV. (2004). *Echinococcus* Türlerinin Epidemiyolojisi. “Echinococcosis” N Altıntaş, R Tınar ve A Çoker (Editörler). Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova, İzmir. Sayfa 259-283.
5. Al-Yaman FM, Assaf L, Hailat N, Abdel-Hafez SK. (1985). Prevalance of hydatidosis in slaughtered animals from North Jordan. Ann Trop Med Parasitol 79: 501-506.
6. Amman RW, Eckert J. (1995). Clinical Diagnosis and Treatment of Echinococcosis in Humans. “Echinococcus and Hydatid Disease” RCA Thompson ve AJ Lymbery (Editors). Cab International, Wallingford, Oxon. Sayfa 411-463.
7. Anonim.(2008). Phylogenetic Analysis of Mitochondrial DNA: Detection of Mutations in Patients with Occipital Stroke. Erişim: (<http://herkules.oulu.fi/isbn9514255674/html/>). Erişim Tarihi: 23.01.2008.
8. Anonim.(2008). Phylogeny. Erişim: (<http://www.rzuser.uniheidelberg.de/~bu6/Introduction11.html>). Erişim Tarihi: 23.01.2008.
9. Arda M. (1994). Biyoteknoloji: Bazı Temel İlkeler. Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, Ankara. No: 2 İkinci Baskı.
10. Attanasio E, Ferretti G, Palmas C. (1985). Hydatidosis in Sardinia: Review and recommendations. Trans R Soc Trop Med Hyg 79: 154-158.
11. Bart JM, Abdulkader M, Zhang YL, Lin RY, Wang YH, Nakao M, Ito A, Craig PS, Piarraoux R, Vuitton DA, Wen H. (2006). Genotyping of human cystic echinococcosis in Xinjiang, PR China. Parasitol 133: 571-579.
12. Bart JM, Morariu S, Knapp J, Ilie MS, Pitulescu M, Anghel A, Cosoroaba I, Piarroux R. (2006). Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania. Parasitol Res 98: 130-137.
13. Bağcı Ö, Vural G, Baca AÜ, Gauci C. (2007). Türkiye’de Koyunlarda Cytochrom C Oxidase Subunit 1 Gen Analizi ile *Echinococcus granulosus* Genotipinin Belirlenmesi. Tübitak Proje No: 104 V 132, İstanbul.
14. Bhattacharya D, Bera AK, Bera BC, Maity A, Das SK. (2007). Genotypic characterisation of Indian cattle, buffalo and sheep isolates of *Echinococcus granulosus*. Vet Parasitol 143: 371-374.
15. Bowles J. (1993). Genetic Approches to the Identification and Evolutionary Study of Helminth Parasites, Universty of Quesland, St.Lucia, Quesland, Australia, Ph.D.
16. Bowles J, Blair D, McManus DP. (1992). Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. Mol Biochem Parasitol 54: 165-173.

17. Bowles J, Blair D, McManus DP. (1994). Molecular genetic characterization of the cervid strain (Northern Form) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol* 109: 215-221.
18. Bowles J, Knapen FV, McManus DP. (1992). Cattle strain of *Echinococcus granulosus* and human infection. *The Lancet* 339: 1358.
19. Bowles J, McManus DP. (1993). Molecular variation in *Echinococcus*. *Acta Trop* 53: 291-305.
20. Bowles J, McManus DP. (1993). NADH dehydrogenase I gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int J for Parasitol* 23: 969-972.
21. Bowles J, McManus DP. (1993). Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. *Mol Biochem Parasitol* 57: 231-239.
22. Breyer I, Georgieva D, Kurdova R, Gottstein B. (2004). *Echinococcus granulosus* strain typing in Bulgaria: The G1 genotype is predominant in intermediate and definitive wild hosts. *Parasitol Res* 93: 127-130.
23. Bryant C, Flockhart HA. (1986). Biochemical strain variation in parasitic helminths. *Adv Parasitol* 25: 275-319.
24. Cameron TWM. (1960). The incidence and diagnosis of hydatid cyst in Canada. *Echinococcus granulosus* var. *Canadensis*. *Parasitologia* 2: 381-390.
25. Cameron TWM, Webster GA. (1961). The Ecology of Hydatidosis, *Studies in Disease Ecology*. American Geographical Society, Washington. Sayfa 141-160.
26. Capuano F, Rinaldi L, Maurelli MP, Perugini AG, Veneziano V, Garippa G, Genchi C, Musella V, Cringoli G. (2006). Cystic echinococcosis in water buffaloes: Epidemiological survey and molecular evidence of ovine (G1) and buffalo (G3) strains. *Vet Parasitol* 137: 262-268.
27. Chance ML. (1979). The identification of *Leishmania*. *Symposia of the British Society of Parasitology* 17: 55-74.
28. Chow C, Gauci CG, Cowmen AF, Lighthowers MW. (2001). A gene family expressing a host-protective antigen of *Echinococcus granulosus*. *Mol Biochem Parasitol* 118: 83-88.
29. Çivi S, Güler S, Kesci S. (1995). Konya Et ve Balık Kurumu ve Konet Tesisleri kayıtlarına göre kist hidatik nedeniyle oluşan ekonomik kayıplar. *T Parazit Derg* 19: 237-242.
30. Dailey MD, Sweetman GK. (1965). The taxonomy of *Echinococcus granulosus* in donkey and dromedary in Lebanon and Syria. *Ann Trop Med Parasitol* 59: 463-477.
31. Dinkel A, Njoroge EM, Zimmermann A, Walz M, Zeyhle E, Elhamdi IE, Mackenstedt U, Romig T. (2004). A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus*-complex, with reference to the epidemiological situation in Eastern Africa. *Int J for Parasitol* 34: 645-653.
32. Doğanay A. (1986). Zoonoz Olarak Ekinokokkozun Halk Sağlığı Yönünden Önemi. *Hayvancılık Sempozyumu, Cumhuriyet Üniversitesi, Tokat Ziraat Fakültesi, Tokat*.
33. Dubinský P, Stefanciková A, Turceková L, Macko Jk, Soltýs J. (1998). Development and morphological variability of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol Res* 84: 221-229.

34. Durmaz R. (2001). Moleküler Epidemiyolojinin Prensipleri. "Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji" R Durmaz (Editör). İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya. Sayfa 139-147.
35. Eckert J. (1981). Echinokokkose. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift. 94: 369-378.
36. Eckert J. (1986). Prospects for Treatment of Metacestod Stage of *Echinococcus*. "Biology of *Echinococcus* and Hydatid Disease" RCA Thompson (Editor). Allen&Unwin, London. Sayfa 250-290.
37. Eckert J, Gemmel MA, Matyas Z, Soulsby EJJ. (1984). Guidelines for Surveillance, Prevention and Control of Echinococcosis/ Hydatidosis. WHO, Geneva. Sayfa 5-35.
38. Eckert J, Thompson RCA. (1988). *Echinococcus* strains in Europe: A review. Z Tropenmed Parasitol 39: 1-8.
39. Eckert J, Thompson RCA. (1997). Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphises on their infectivity to humans. Acta Tropica 64: 19-34.
40. Eckert J, Thompson RCA, Lymbery AJ, Pawlowski ZS, Gottstein B, Morgan UM. (1993). Further evidence for the occurrence of a distinct strain of *Echinococcus granulosus* in European pigs. Parasitol Res 79: 42-48.
41. Eckert J, Thompson RCA, Michael SA, Kumaratilake LM, El Sawah HM. (1989). *Echinococcus granulosus* of camel origin: Development in dogs and parasite morphology. Parasitol Res 75: 536-544.
42. Eugster RO. (1978). A Contrubition to the Epidemiology of Echinococcosis/Hydatidosis in Kenya (East Africa) with Special Reference to the Kajido District. Universty of Zurich, Ph.D.
43. French CM, Nelson GS, Wood M. (1982). Hydatid disease in the Turkana District of Kenya I. The background to the problem with hypotheses to account for the remarkably high prevalance of the disease in man. Ann Trop Med Parasitol 76: 425-437.
44. Gasser RB. (1997). Mutation scanning methods for the analysis of parasite genes. Int J for Parasitol 27: 1449-1463.
45. Gasser RB. (1999). PCR-based technology in veterinary parasitology. Vet Parasitol 84: 229-258.
46. Gasser RB, Monti JR. (1997). Identification of parasitic nematodes by PCR-SSCP of ITS-2 rDNA. Mol Cell Prob 11: 201-209.
47. Gasser RB, Zhu X, McManus DP. (1998). Display of sequence variation in PCR-amplified mitochondrial DNA regions of *Echinococcus* by single-strand conformation polymorphism. Acta Tropica 71: 107-115.
48. Gasser RB, Zhu X, McManus DP. (1998). Dideoxy fingerprinting: Application to the genotyping of *Echinococcus*. Int J for Parasitol 28: 1775-1779.
49. Gauci C, Merli M, Muller V, Chow C, Yagi K, Mackenstedt U, Lightowlers MW. (2002). Molecular cloning of a vaccine antigen against infection with the larval stage of *Echinococcus multilocularis*. Infect Immun 70: 3969-3972.

50. Gebreel AO, Gilles HM, Prescott JE. (1983). Studies on the seroepidemiology of endemic diseases in Libya. *Ann Trop Med Parasitol* 77: 391-397.
51. Gemmell MA. (1960). Advances in knowledge on the distribution and importance of hydatid disease as world health and economic problems during the decade. *Helminthological Abstracts* 1950-1959 29: 355-369.
52. Gill HS, Venkateswara R. (1967). Incidence and fertility rate of hydatid cysts in Indian buffalo (*Bos Bubalus*). *Bulletin De l'office International Des Epizooties* 69: 989-997.
53. González LM, Daniel-Mwambete K, Montero E, Rosenzvit MC, McManus DP, Gárate T, Cuesta-Bandera C. (2002). Further molecular discrimination of Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Exp Parasitol* 102: 46-56.
54. Gottstein B, Eckert J, Fey H. (1983). Serological differentiation between *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* infections in man. *Zeitschrift Für Parasitenkunde* 69: 347-356.
55. Gottstein B, Eckert J, Michael SA, Thompson RCA. (1987). *Echinococcus granulosus* antigens: Immuno-electrophoretic and western blot analysis of hydatid cyst fluids. *Parasitol Res* 73:186-189.
56. Gottstein B, Schantz PM, Toderov T, Saimot AG, Jacquier P. (1986). An international study on the serological differential diagnosis of human cystic and alveolar echinococcosis. *Bull WHO* 64: 101-105.
57. Graber M, Thai J. (1980). L'échinococcose des artiodactyles sauvages de la République Centrafricaine: Eexistence probable d'un cycle lion-phacochère. *Revue Élevage Médecine Vétérinaire Pays Tropicaux* 33: 51-59.
58. Güralp N. (1981). *Helmintoloji*. 2. Baskı. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara. Sayfa: 505-515.
59. Haag KL, Araújo AM, Gottstein B, Zaha A. (1998). Selection, recombination and history in a parasitic flatworm (*Echinococcus*) inferred from nucleotide sequences. *Mem Ins Oswaldo Cruz* 93: 695-702.
60. Haag KL, Zaha A, Araujo AM, Gottstein B. (1997). Reduced genetic variability within coding and non-coding regions of the *Echinococcus multilocularis* genome. *Parasitol* 115: 521-529.
61. Harandi MF, Hobbs RP, Adams PJ, Mobedi I, Morgan-Ryan UM, Thompson RCA. (2002). Molecular and morphological characterization of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Iran. *Parasitol* 125: 367-373.
62. Herwerden VL, Gasser RB, Blair D. (2000). ITS-1 ribosomal DNA sequence variants are maintained in different species and strains of *Echinococcus*. *Int J for Parasitol* 30: 157-169.
63. Hongyo T, Buzard GS, Calvert RJ, Weghorst CM. (1993). Cold SSCP: A simple, rapid and non-radioactive method for optimized single strand conformation polymorphism analyses. *Nucl Acids Res* 21: 3637- 3642.
64. Hultdt G, Johansson GSO, Lanttos S. (1973). Echinococcosis in Northern Scandinavia. *Arch Environ Health* 26: 35-40.

65. Islam AW. (1982). The prevalance of hydatid disease in buffalos in Bangladesh. *Ann Trop Med Parasitol* 76: 623-626.
66. Kamenetzky L, Gutierrez AM, Canova SG, Haag KL, Guarnera EA, Parra A, García GE, Rosenzvit MC. (2002). Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Inf Genet Evol* 2: 129-136.
67. Kammerer WS, Schantz PM. (1984). Long term follow-up of human hydatid disease (*Echinococcus granulosus*) treated with a high dose mebendasole regimen. *Am J Trop Med Hyg* 33: 132-137.
68. Koroğlu E, Şimsek S. (2004). Hidatidosisin Neden Olduğu Ekonomik Kayıplar. "Echinococcosis" N Altıntaş, R Tınar ve A Çoker (Editörler). Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova, İzmir. Sayfa 259-283.
69. Kumaratilake LM, Thompson RCA. (1982). A review of the taxonomy and speciation of the genus *Echinococcus Rudolphi* 1801. *Zeitsch Parasit* 68: 121-146.
70. Kumaratilake LM, Thompson RCA. (1982). Hydatidosis/ echinococcosis in Australia. *Helminth Abst Ser A* 51: 233-252.
71. Kumaratilake LM, Thompson RCA. (1983). A comparision of *Echinococcus granulosus* from differrent geographical areas of Australia using secondary cyst development in mice. *Int J for Parasitol* 13: 509-515.
72. Kumaratilake LM, Thompson RCA. (1984). Biochemical characterization of Australian strains of *Echinococcus granulosus* by isoelectric focusing of soluble proteins. *Int J for Parasitol* 14: 581-586.
73. Kumaratilake LM, Thompson RCA. (1984). Morphological characterization of Australian strains of *Echinococcus granulosus* by isoelectric focusing of soluble proteins. *Int J for Parasitol* 14: 467-477.
74. Kumaratilake LM, Thompson RCA, Eckert J. (1986). *Echinococcus granulosus* of equine origin from different countries possess uniform morphological characteristics. *Int J for Parasitol* 16: 529-540.
75. Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvela-Koski V, Meri S. (2003). Molecular genetic characterization of the fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol* 127: 207-215.
76. Le TH, Pearson MS, Blair D, Dai N, Zhang LH, McManus DP. (2002). Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse-dog and sheep-dog strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol* 124: 97-112.
77. Leikina ES. (1984). Immunology of unilocular and multilocular hydatidoses and the application of the aquired knowledge to the control of these helminthiasis. *Trudy Gel'mintologicheskoi Laboratorii (Biokhimiya i Fiziologiya Gel'mintov i Immunitet Pri Gel'mintozakh)* 32: 68-78.

78. Lightowlers MW, Gemmell MA, Harrison GB, Heath DD, Rickard MD, Roberts MG. (1992). Control of Tissue Parasites. II. Cestodes. "Animal Parasite Control Utilizing Biotechnology" WK Young (Editor). CRC Press, Boca Raton, FL, USA. Sayfa 165-191.
79. Lightowlers MW, Lawrence SB, Gauci CG, Young J, Ralston MJ, Maas D, Heath DD. (1996). Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immun* 18: 457-462.
80. Lightowlers MW, Jensen O, Fernandez E, Iriarte JA, Woolard DJ, Cauici CG, Jarkins DJ, Heath DD. (1999). Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the Eg95 hydatid vaccine in sheep. *Int J for Parasitol* 29: 531-534.
81. Lightowlers MW, Rickart MD, Horney RD, Obendorf DL, Mitchel GF. (1984). Serological diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in sheep using cyst fluid antigen processed by antibody affinity chromatography. *Aust Vet J* 61: 101-108.
82. Lumsden WHR. (1974). Biochemical taxonomy of *Leishmania*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 68: 74-75.
83. M'rad S, Fiiseti D, Oudni M, Mekki M, Belguith M, Nouri A, Sayadi T, Lahmar S, Candolfi E, Azaiez R, Mezhoud H, Baba H. (2005). Molecular evidence of ovine (G1) and camel (G6) strains of *Echinococcus granulosus* in Tunisia and putative role of cattle in human contamination. *Vet Parasitol* 129: 267-272.
84. Macpherson CNL. (1983). An active intermediate host role for man in the life cycle of *Echinococcus granulosus* in Turkana, Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 32: 397-404.
85. Macpherson CNL. (1986). *Echinococcus* Infection in Wild Animals in Africa. "Wildlife /Livestock Interfaces on Rangelands" S Macmillan (Editor). Inter-African Bureau for Animal Resources, Nairobi. Sayfa 73-78.
86. Macpherson CNL, Karstad L, Stevenson P, Arundel JH. (1983). Hydatid disease in Turkana District of Kenya, III. The significance of wild animals in the transmission of *Echinococcus granulosus*, with particular reference to Turkana and Masailand in Kenya. *Ann Trop Med Parasitol* 77: 61-73.
87. Macpherson CNL, McManus DP. (1982). A comparative study of *Echinococcus granulosus* from human and animal hosts in Kenya using isoelectric focusing and isoenzyme analysis. *Int J for Parasitol* 12: 515-521.
88. Macpherson CNL, Smyth JD. (1985). In vitro culture of strobilar stage of *Echinococcus granulosus* from protoscoleces of human, camel, sheep and goat origin from Kenya and buffalo origin from India. *Int J for Parasitol* 15: 137-140.
89. Mankhaeva VS, Shumilov MF. (1982). Development of *Echinococcus granulosus* in dogs working with deer. *Nauchno-Tekhnicheskii Byulleten, Sibirskoe Otdelenie Vaskhnl (Voprosy Veterinarii Na Krainen Severovostoke)* 27: 25-26.
90. Maravilla P, Thompson RCA, Palacios-Ruiz JA, Estcourt A, Ramirez-Solis E, Mondragon-De-La-Peña C, Moreno-Moller M, Cardenas-Mejia A, Mata-Miranda P, Aguirre-Alcantara MT,

- Bonilla-Rodriguez CB, Flisser A. (2004). *Echinococcus granulosus* cattle strain identification in an autochthonous case of cystic echinococcosis in Central Mexico. *Acta Tropica* 92: 231-236.
- 91.** McManus DP. (1981). A biochemical study of adult and cystic stages of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin from Kenya. *J Helminthol* 55: 21-27.
- 92.** McManus DP, Bryant C. (1986). Biochemistry and Physiology of *Echinococcus*. "The Biology of *Echinococcus* and Hydatid Disease" RCA Thompson (Editor). Allen&Unwin, London. Sayfa 114-142.
- 93.** McManus DP, Ding Z, Bowles J. (1994). A molecular genetic survey indicates the presence of a single, homogeneous strain of *Echinococcus granulosus* in North-Western China. *Acta Trop* 56: 7-14.
- 94.** McManus DP, Macpearson CNL. (1984). Strain characterization in the hydatid organism, *Echinococcus granulosus*: Current status and new perspectives. *Ann Trop Med Parasitol* 78: 193-198.
- 95.** McManus DP, Smyth JD. (1979). Isoelectric focusing of some enzymes from *Echinococcus granulosus* (horse and sheep strains) and *E. multilocularis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 259-265.
- 96.** McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. (2003). Echinococcosis. *The Lancet* 362: 1295-1304.
- 97.** Melcher U. (2003). SSCPs Erişim: (<http://Opbs.Okstate.Edu/~Melcher/Mg/Mgw1/Mg11129.Html>). Erişim tarihi: 13.04.2004.
- 98.** Merdivenci, A. (1976). Türkiye’de Veteriner Parazitoloji Tarihi. Hilal Matb. Koll. Sti. İstanbul. Sayfa: 265.
- 99.** Merdivenci A, Aydınlioğlu K. (1982). Hidatidoz (Hidatik Kist Hastalığı). İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Yayın No:97 Sayfa 318.
- 100.** Mimioğlu M. (1974). Evcil Gevişenlerde Hidatidoz. Türkiye’de Ekinokokkoz Problemi Sempozyumu, Erzurum. Sayfa 23-25.
- 101.** Nelson GS. (1982). Carrion-Feeding Cannibalistic Carnivores and Human Disease in Africa with Special Reference to Trichinosis and Hydatid Disease in Kenya. *Symposium of the Zoological of London* 50: 181- 198.
- 102.** Nelson GS, Rausch RL. (1963). *Echinococcus* infections in man and animals in Kenya. *Ann Trop Med Parasitol* 57: 136-149.
- 103.** Nikulina NA, Benediktov H, Garaev MM. (2003). *Echinococcus* genotyping by PCR-RFLP. *Med Parasitol* 2: 29-32.
- 104.** Olive M, Bean P. (1999). Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 37: 1661-1669.
- 105.** Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-879.
- 106.** Ortona E, Margutti P, Rigano R, Siracusano A. (1996). Genetic variability in Italian sheep isolates of *Echinococcus granulosus*. *Appl Parasitol* 3: 205-208.

107. Özer E, Özcan C, Aslan N, Kalender H, Angın M. (1996). Elazığ Et ve Balık Kurumunda atılan koyun karaciğerlerinde bakteriyel ve paraziter etkenlerle bunların oluşturduğu ekonomik kayıplar. Tr J of Vet Anim Sci 20:191-201.
108. Pandey VS. (1972). Observations on the morphology and biology of *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) of goat-dog origin. J Helminthol 46: 219-33.
109. Pawlowski Z, Mrozewicz B, Stefaniak J, Schantz P, Wilson M, Eckert J, Jacquier P, Haremski T, Nowosielski J And Zieta B. (1993). *Echinococcus granulosus* pig strain from Poland has low infectivity to humans. Am J Trop Med Hyg Suppl 49: 342–343.
110. Peters W. (1981). Technological Advances in Protozoal Taxonomy and Systematics. “Parasitological Topics” EU Canning (Editor). Society of Protozoologists. Sayfa 200-209.
111. Pezzella M, Gali C, Vullo V, Zennaro F, Della S and Sorice F. (1984). *Echinococcus granulosus* antigens: Comparative analysis of human, bovine and ovine hydatid fluids. Ann Trop Med Parasitol 78: 549-551.
112. Prasad BN. (1983). Studies on the present period of *Echinococcus granulosus* in dog. Hary Vet 22: 56-57.
113. Ralp D, McClelland M. (1998). Arbitrary Primed PCR Methods for Studying Bacterial Disease. “Methods in Molecular Medicine” P Woodform ve P Johnson (Editors). Humana Pres Inc, Totowa, Nj. Sayfa 60-75.
114. Rausch RL. (1953). The taxonomic value and variability of certain structures in the cestode genus *Echinococcus* (Rudolphi, 1801) and a review of recognized species. Thap Commem 2: 233-46.
115. Rausch RL. (1967). A consideration of intraspecific categories in the genus *Echinococcus Rudolphi*, 1801 (Cestoda: Taeniidae). J Parasitol 53: 484-491.
116. Rausch RL. (1986). Life-Cycle Pattern and Geographic Distrubution of *Echinococcus* Species.”The Biology of *Echinococcus* and Hydatid Disease” RCA Thompson (Editor). Allen&Unwin, London. Sayfa 44-80.
117. Rausch RL, Nelson GS. (1963). A review of the genus *Echinococcus Rudolphi*, 1801. Ann Trop Med Parasitol 57: 127-135.
118. Rausch RL, Wilson JF, McMahan BJ, O’Gorman MA. (1986). Consequences of continuonus mebendazole therapy in alveolar hydatid disease with a summary of a ten-year clinical trial. Ann Trop Med Parasitol 80: 403-419.
119. Reddy YA, Rao JR, Butchaiah G, Sharma B. (1998). Random amplified polymorphic DNA for the specific detection of the bubaline *Echinococcus granulosus* by hybridization assay. Vet Parasitol 79: 315-323.
120. Rickard MD, Lightowlers MW. (1986). Immunodiagnosis of Hydatid Disease. “The Biology of *Echinococcus* and Hydatid Disease” RCA Thompson (Editor). Allen&Unwin, London. Sayfa 217-249.

121. Rinaldi L, Maurelli MP, Veneziano V, Capuano F, Perugini AG, Cringoli S. (2008). The role of cattle in the epidemiology of *Echinococcus granulosus* in an endemic area of Southern Italy. *Parasitol Res* (In press).
122. Roving T, Dinkel A, Mackenstedt U. (2006). The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol Int* 55:187-191.
123. Rosenzvit MC, Canova SG, Kamenetzky L, Guarnera EA. (2001). *Echinococcus granulosus*: intraspecific genetic variation assessed by a DNA repetitive element. *Parasitol* 123: 381-388.
124. Rosenzvit MC, Zhang LH, Kamenetzky L, Canova SG, Guarnera EA, McManus DP. (1999). Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitol* 118: 523-530.
125. Safranov MM, Isakov SI. (1982). Subspecies and strains of *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis* in Yakutiya. *Nauchno-Tekhnicheskii Bulletin Sibirsko Otdelenie Vaskhnil (Infektsionnye I Invazionnye Bolezni Zhivotnykh Yakutii)* 9: 29-31.
126. Safranov MG, Isakov SI. (1984). *Echinococcus granulosus* and its varieties in Yakutia. *Byulleten Vsesoyuznogo Instituta Gel'mintologii Im K.I. Skrabina* 37: 58-59.
127. Saimot AG, Meulemans A, Hay JM, Mohler J, Manuel C, Coulaud JP. (1981). Etude pharmacocinétique du flubendazole au course de l'hydatidose humaine Á *E.granulosus*, résultats préliminaires. *Nouv Pres Med* 10: 3121-3124.
128. Sarkar G, Yoon HS, Sommer SS. (1992). Dideoxy fingerprinting: A rapid and efficient screen for the presence of mutations. *Genomics* 13: 441-443.
129. Schantz PP, Chai J, Craig PS, Eckert J, Jenkins DJ, Macpherson CNL, Thakur A. (1995). Epidemiology and Control. "Echinococcosis and Hydatid Disease" RCA Thompson and AJ Lymbery (Editors). Cab International, Wallingford, Oxon. Sayfa 233-331.
130. Schantz PM, Lord RD. (1972). *Echinococcus* in South America red fox (*Dusicyon culpaeous*) and the European hare (*Lepus europaeus*) in the province of Neuquén, Argentina. *Ann Trop Med Parasitol* 66: 479-485.
131. Schwabe CW. (1986). Current Status of Hydatid Disease: A Zoonosis of Increasing Importance. "The Biology of *Echinococcus* and Hydatid Disease" RCA Thomson (Editor). Allen & Unwin, London. Sayfa 81-113.
132. Scott JC, Stefaniak J, Pawlowski ZS, McManus DP. (1997). Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: Identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol* 114: 37-43.
133. Siles-Lucas M, Benito Mc, Cuesta-Bandera C. (1996). *Echinococcus granulosus*: Genomic and izoenzymatic study of spanish strains isolated from different intermediate hosts. *Vet Parasitol* 63: 273-282.
134. Siles-Lucas M, Felleisen R, Cuesta-Bandera C, Gottstein B, Eckert J. (1994). Comparative genetic analysis of Swiss and Spanish isolates of *Echinococcus granulosus* by southern hybridization and random amplified polymorphic DNA technique. *Appl Parasitol* 35: 107-117.

135. Smyth JD, Davies Z. (1974). In vitro culture of strobilar stage of *Echinococcus granulosus* (sheep strain): A review of basic problems and results. *Int J for Parasitol* 4: 631-644.
136. Snabel V, D'amelio S, Mathiopoulous K, Turcekova L, Dubinsky P. (2000). Molecular evidence for the presence of a G7 genotype of *Echinococcus granulosus* in Slovakia. *J Helminthol* 74: 177-181.
137. Soulsby EJJ. (1986). *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*, Baillier and Tindall. London.
138. Sunnucks P, Wilson ACC, Beheregaray LB, Zenger K, French J, Taylor AC. (2000). SSCP is not so difficult: The application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol* 9: 1699-1710.
139. Sweatman GK, Williams RJ. (1963). Comparative studies on the biology and morphology of *Echinococcus granulosus* from domestic livestock, moose and reindeer. *Parasitol* 53: 339-390.
140. Şimşek S, Köroğlu E. (2004). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) for immunodiagnosis of hydatid diseases in Sheep. *Acta Trop* 92:17-24.
141. Şimşek S, Köroğlu E, Dumanlı N, Aktaş M, Şaki CE, Altay K, Ütük AE. (2005). Seroprevalance of cattle hydatidosis in some countries of East Anatolian Region of Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 29: 1305-1310.
142. Şimşek S, Köroğlu E, Ütük AE, Altay K. (2005). Eosinofilik sığırlarda hidatidosis seropozitifliği. *T Parazit Derg* 29: 93-96.
143. Şimşek S, Ütük AE, Köroğlu E. (2006). Hidatik kist sıvısından antijen B (Agb)'nin kısmi purifikasyonu ve koyun hidatidosisinin tanısındaki etkinliği. *F Ü Sağ Bil Derg* 20: 337-340.
144. Tashani OA, Zhang LH, Boufana B, Jegi A, McManus DP. (2002). Epidemiology and strain characteristics of *Echinococcus granulosus* in the Benghazi Area of Eastern Libya. *Ann Trop Med Parasitol* 96: 369-381.
145. Taşan E. (1984). Elazığ kırsal yöre köpeklerinde helmintlerin yayılışı ve insan sağlığı yönünden önemi. *Doğa Bilim Derg* 8:160-167.
146. Taşçı S. (1990). Doğu Anadolu'da Tarımın Verimlilik Sorunları Sempozyumu, Van Milli Prodüktivite Merkezi Yayınları: 431.
147. Thakur AS, Eddi CS. (1982). Ciclo selvatico de la hidatidosis y su importancia zoonotica en los paises Latinoamericanos. *Gac Vet* 44: 539-543.
148. Thompson RCA. (1979). Biology and speciation of *Echinococcus granulosus*. *AVJ* 55: 93-98.
149. Thompson RCA. (1995). Biology and Systematics of *Echinococcus*. "Echinococcus and Hydatid Disease" RCA Thompson ve AJ Lymbery (Editors). Cab International, Wallingford. Sayfa 1-50.
150. Thompson RCA, Kumaratilake LM. (1982). Intraspecific variation in *Echinococcus granulosus*: The Australian situation and perspectives for the future. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 76: 13-16.

151. Thompson RCA, Kumaratilake LM. (1985). Comparative development of Australian strains of *Echinococcus granulosus* in dingoes (*Canis familiaris dingo*) and domestic dogs (*C.f.familiaris*), with further evidence for the origin of the Australian sylvatic strain. *Int J Parasit* 15: 535-542.
152. Thompson RCA, Lymbery AJ. (1988). The nature, extent and significance of variation within the genus *Echinococcus*. *Adv Parasitol* 27: 209-258.
153. Thompson RCA, Lymbery AJ. (1991). The epidemiological significance of biological variation in *Echinococcus*. *Arch Hydatid* 30: 195-200.
154. Thompson RCA, Lymbery AJ, Constantine CC. (1995). Variation in *Echinococcus*: towards a taxonomic revision of the genus. *Adv Parasitol* 35: 145-176.
155. Thompson RCA, McManus DP. (2002). Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol* 18: 452-457.
156. Thompson RCA, Smyth JD. (1975). Equine hydatidosis: a review of the current status in Great Britain and the results of an epidemiological survey. *Vet Parasitol* 1: 107-127.
157. Tınar R. (1983). İnsan ve hayvan sağlığı açısından hidatidoz. *UÜ Vet Fak Derg* 2: 85-90.
158. Torgerson PR, Carmona C, Bonifacino R. (2000). Estimating the economic effect of cystic echinococcosis: Uruguay, a developing country with upper-middle income. *Ann Trop Med Parasitol* 94: 703-713.
159. Torgerson PR, Dowling PM. (2001). Estimating the economic effect of cystic echinococcosis. Part 2: An endemic region in the United Kingdom, a wealthy, industrialized economy. *Ann Trop Med Parasitol* 95: 177-185.
160. Torgerson PR, Dowling PM, Abo-Shehadeh MN. (2001). Estimating the economic effect of cystic echinococcosis. Part 3: Jordan, a developing country with lower-middle income. *Ann Trop Med Parasitol* 95: 595-603.
161. Travis G. (1996). Step By Step SSCP. Erişim: (http://www.Uga.Edu/Srel/Dna_Lab/Sscp'96v2.Rtf). Erişim tarihi: 15.04.2004.
162. Turčeková L, Šnábel V, D'amelio S, Busi M, Dubinský P. (2003). Morphological and genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in the Slovak Republic. *Acta Tropica* 85: 223-229.
163. Ulutaş M. (1999). Trakya'da Kasaplık Hayvanlarda Hidatidozun Yaygınlığı. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Abd, İstanbul, Doktora Tezi.
164. Umur Ş, Aslantaş Ö. (1993). Kars belediye mezbahasında kesilen ruminantlarda hidatidozun yayılışı ve ekonomik önemi. *T Parazit Derg* 17: 27-34.
165. Ütük AE, Şimşek S, Köroğlu E. (2005). *Echinococcus* cinsinin moleküler genetik karakterizasyonu. *T Parazit Derg* 29: 171-176.
166. Ütük AE, Şimşek S, Köroğlu E. (2006). *Echinococcus granulosus*'un Koyun Suşunun (G1) RAPD-PCR ve DNA Dizi Analizi ile Tanısı. 3. Ulusal Hidatidoloji Kongresi. Sayfa 60.
167. Varcasia A, Canu S, Lightowlers MW, Scala A, Garippa G. (2006). Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* strains in Sardinia. *Parasitol Res* 98: 273-277.

168. Verster AJM. (1965). Review of *Echinococcus* species in South Africa. Onderstepoort J Vet Res 32: 7-118.
169. Verster AJM, Collins M. (1966). The incidence of hydatidosis in republic of South Africa. Onderstepoort. J Vet Res 33: 49-72.
170. Villalobos N, González LM, Morales J, Aluja AS, Jiménez MI, Blanco MA, Harrison LJS, Parkhouse RME, Gárate T. (2007). Molecular identification of *Echinococcus granulosus* genotypes (G1 and G7) isolates from pigs in Mexico. Vet Parasitol 26: 174-177.
171. Vogel H. (1957). Über den *Echinococcus multilocularis* suddeutschlands. I. Das bandwurmstadium von stämmen menschlicher und tierischer herkunft. Z Tropenmed Parasitol 8: 404-454.
172. Wachira TM, Bowles J, Zeyhle E, McManus DP. (1993). Molecular examination of the sympatry and distribution of sheep and camel strains of *Echinococcus granulosus* in Kenya. Am J Trop Med Hyg 48: 473-479.
173. Williams RJ, Sweatman GK. (1963). On the transmission, biology and morphology of *Echinococcus granulosus equinus*, a new subspecies of hydatid tapeworm in horses in Great Britain. Parasitol 53: 391-407.
174. Wilson JF, Diddams AC, Rausch RL. (1968). Cystic hydatid disease in Alaska: A review of 101 autochthonous cases of *Echinococcus granulosus* infection. Am Rev Respir Dis 98: 1-15.
175. Worbes H. (1992). Zum vorkommen von *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis* in thüringen. Ang Parasitol 33: 193-204.
176. Xiao N, Qiu J, Nakao M, Li T, Yang W, Chen X, Schantz PM, Craig PS, Ito A. (2005). *Echinococcus shiquicus* n. sp., A taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. Int J for Parasitol 35: 693-731.
177. Xue HC, Qiu LS, Zhu CW. (1993). RFLP analysis of DNA from *Echinococcus granulosus* collected from four provinces/autonomous region in China. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi 11: 201-203.
178. Yağcı A. (2001). Restriction Fragment Length Polymorphism ve Polimeraz Zincir Reaksiyon Bazlı Tiplendirme Yöntemleri. "Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji" R Durmaz (Editör) 2.Baskı, İnönü Üniv.Tıp Fak. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AbD, Malatya. Sayfa 149-160.
179. Yıldız K, Gurcan IS. (2006). Larval Rostellar Çengel Morfolojisi Kullanılarak *Echinococcus granulosus* Suş/Suşlarının Belirlenmesi. 3. Ulusal Hidatidoloji Kongresi. Sayfa 59.
180. Yıldız K, Tunçer Ç. (2005). Kırıkkale’de sığırlarda kist hidatik’in yayılışı. T Parazitoloj Derg 29: 247-250.
181. Yolaşmaz A, Turčeková L, Türk M, Reyhan E, Šnabel V, Dubinský P, Güneş K, Altıntaş N. (2004). Genetic Variation in *Echinococcus granulosus* from Turkey and Slovakia Demonstrated by Sequence and SSCP Analysis, XXıst International Congress of Hydatidology, Nairobi, Kenya.

- 182.** Zhang L, Eslami A, Hosseini H, McManus DP. (1998). Indication of the presence of two distinct strains of *Echinococcus granulosus* in Iran by mitochondrial DNA markers. Am J Trop Med Hyg 59: 171-174.
- 183.** Zhang L, Gasser RB, Zhu X, McManus DP. (1999). Screening for different genotypes of *Echinococcus granulosus* within China and Argentina by single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. Trans R Soc Trop Med Hyg 93: 329-334.

8. EKLER

Ek 1

LOCUS EF689726 426 bp DNA linear INV 16-JUL-2007
DEFINITION Echinococcus granulosus cytochrome oxidase subunit I (CO1) gene,
partial cds; mitochondrial.
ACCESSION EF689726
VERSION EF689726.1 GI:151547436

KEYWORDS .
SOURCE mitochondrion Echinococcus granulosus
ORGANISM Echinococcus granulosus
Eukaryota; Metazoa; Platyhelminthes; Cestoda; Eucestoda;
Cyclophyllidea; Taeniidae; Echinococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 426)
AUTHORS Simsek,S., Utuk,A.E. and Koroglu,E.
TITLE Molecular genetic characterization of Turkish isolates of
Echinococcus granulosus

JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 426)
AUTHORS Simsek,S., Utuk,A.E. and Koroglu,E.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (20-JUN-2007) Department of Parasitology Faculty of
Veterinary Medicine, Firat University, Rektörlük Kampusu, Elazığ
23119, Turkey

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..426
/organism="Echinococcus granulosus"
/organelle="mitochondrion"
/mol_type="genomic DNA"
/specific_host="cattle"
/db_xref="taxon:6210"
/country="Turkey: Erzurum province"
gene <1..424
/gene="CO1"
CDS <1..424
/gene="CO1"
/codon_start=2
/transl_table=9
/product="cytochrome oxidase subunit I"
/protein_id="ABS12462.1"
/db_xref="GI:151547437"

/translation="VLILPGFGIISHICLSISANFDVFGFYGLLFAMFSIVCLGSSVWGHMFTVGL
DVKTAVFFSSVTMIIGVPTGIKVFTWLYMLLNSSVNVSDPVLWWVVSFIVLFTFGGVTGIV
LSACVLDNILHDTWFFVAHFHYGPFL"

ORIGIN

```
1  ggtgttgatt ttgcctggat ttggtataat tagtcatatt tgtttgagta ttagtgctaa
61  ttttgatgtg ttggggttct atgggttggt gtttgctatg ttttctatag tgtgtttggg
121 tagcaggggt ttgggtcatc atatgtttac tgttggttg gatgtgaaga cggctgtttt
181 ttttagctct gttactatga ttataggggt tcctactggt ataaagggtt ttacttggtt
241 atatatgttg ttgaattcga gtgttaattg tagtgatccg gttttgtgat ggggtgtttc
301 ttttatagtg ttgtttacgt ttgggggagt tacgggtata gttttgtctg cttgtgtgtt
361 agataatatt ttgcatgata ctgggtttgt ggtgggtcat tttcattatg gtccctttct
421 ataaaa
```

Ek 2

LOCUS EF693891 422 bp DNA linear INV 18-JUL-2007

DEFINITION Echinococcus granulosus cytochrome oxidase subunit I (CO1) gene, partial cds; mitochondrial.

ACCESSION EF693891
VERSION EF693891.1 GI:151936674
KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion Echinococcus granulosus
ORGANISM Echinococcus granulosus Eukaryota; Metazoa; Platyhelminthes; Cestoda; Eucestoda; Cyclophyllidea; Taeniidae; Echinococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 422)
AUTHORS Utuk,A.E., Simsek,S. and Koroglu,E.
TITLE Molecular genetic characterization of Turkish isolates of Echinococcus granulosus
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 422)
AUTHORS Utuk,A.E., Simsek,S. and Koroglu,E.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (21-JUN-2007) Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Firat, Rektörlük Kampusu, Elazig 23119, Turkey

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..422
/organism="Echinococcus granulosus"
/organelle="mitochondrion"
/mol_type="genomic DNA"
/specific_host="cattle"
/db_xref="taxon:6210"
/country="Turkey: Malatya province"
gene <1..>422
/gene="CO1"
CDS <1..>422
/gene="CO1"
/codon_start=2
/transl_table=9
/product="cytochrome oxidase subunit I"
/protein_id="ABS18968.1"
/db_xref="GI:151936675"

/translation="VLILPGFGILSHICLSISANFDVFGFYGLLFAMFSIVCLGSSVWGHMFTVGL
DVKTAVFFSSVTMIIGVPTGIKVFTWLYMLLNSSVNVSDPVLWVVVSFIVLFTFGGVTGIV
LSACVLNNILHDTWVVAHFHYVLSL"

ORIGIN

```
1  cgtgttgatt ttgcctggat ttggtatact tagtcatatt tgtttgagta ttagtgctaa
61  ttttgatgtg tttgggttct atggggttgt gtttgctatg ttttctatag tgtgtttggg
121 tagcagggtt tggggtcac atagtgttac tgttgggttg gatgtgaaga cggctgtttt
181 ttttagctct gttactatga ttataggggt tcctactggg ataaagggtt ttacttgggt
241 atatatgttg ttgaattcga gtgttaatgt tagtgatccg gttttgtgat gggttgtttc
301 ttttatagtg ttgtttacgt ttgggggagt tacgggcata gttttgtctg cttgtgtgtt
361 aaataatatt ttgcatgata cttggtttgt ggtggctcat ttccattatg ttctttcttt
421 aa
//
```

Ek 3

LOCUS EF693892 423 bp DNA linear INV 18-JUL-2007

DEFINITION Echinococcus granulosus cytochrome oxidase subunit I (CO1) gene,
partial cds; mitochondrial.

ACCESSION EF693892

VERSION EF693892.1 GI:151936676

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion Echinococcus granulosus

ORGANISM Echinococcus granulosus Eukaryota; Metazoa; Platyhelminthes; Cestoda;
Eucestoda; Cyclophyllidea; Taeniidae; Echinococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 423)

AUTHORS Utuk,A.E., Simsek,S. and Koroglu,E.

TITLE Molecular genetic characterization of Turkish isolates of Echinococcus
granulosus

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 423)

AUTHORS Utuk,A.E., Simsek,S. and Koroglu,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (21-JUN-2007) Department of Parasitology, Faculty of Veterinary
Medicine, University of Firat, Rektörlük Kampusu, Elazığ 23119, Turkey

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..423

/organism="Echinococcus granulosus"

/organelle="mitochondrion"

/mol_type="genomic DNA"

/specific_host="cattle"

/db_xref="taxon:6210"

/country="Turkey: Elazığ province"

gene <1..>423

/gene="CO1"

CDS <1..>423

/gene="CO1"

/codon_start=2

/transl_table=9

/product="cytochrome oxidase subunit I"

/protein_id="ABS18969.1"

/db_xref="GI:151936677"

/translation="VLILPGFGIISHICLSISANFDVFGFYGLLFAMFSIVCLGSSVWGHMFTVGL
DVKTAVFFSSVTMIIGVPTGIKVFTWLYMLLNSSVNVSDPVLWWVVSFIVLFTFGGVTGIV
LSACVLNNILHDTWVFVAHFHYVLSL"

ORIGIN

```
1  cgtgttgatt ttgcctggat ttggattat tagtcatatt tgtttgagta ttagtgctaa
61  ttttgatgtg tttgggttct atgggttggt gtttgctatg ttttctatag tgtgtttggg
121 tagcagggtt tggggtcac atatgtttac tgttgggttg gatgtgaaga cggctgtttt
181 ttttagctct gttactatga ttataggggt tcctactggg ataaagggtt ttacttggtt
241 atatatgttg ttgaattcga gtgttaatgt tagtgatccg gttttgtgat ggggtgtttc
301 ttttatagtg ttgtttacgt ttgggggagt tacgggtata gttttgtctg cttgtgtgtt
361 aaataatatt ttgcatgata ctggtttgtt ggtggctcat ttccattatg ttctttcttt
421 aaa
```

//

Ek 4

LOCUS EU006774 425 bp DNA linear INV 30-JUL-2007

DEFINITION Echinococcus granulosus isolate Elazig-3 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial.

ACCESSION EU006774

VERSION EU006774.1 GI:153799863

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion Echinococcus granulosus

ORGANISM Echinococcus granulosus Eukaryota; Metazoa; Platyhelminthes; Cestoda; Eucestoda; Cyclophyllidea; Taeniidae; Echinococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 425)

AUTHORS Utuk,A.E., Simsek,S. and Koroglu,E.

TITLE Molecular genetic characterization of Turkish isolates of Echinococcus granulosus

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 425)

AUTHORS Utuk,A.E., Simsek,S. and Koroglu,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-JUN-2007) Department of Parasitology Faculty of Veterinary Medicine, University of Firat, Rektörlük Kampusu, Elazig 23119, Turkey

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..425

/organism="Echinococcus granulosus"

/organelle="mitochondrion"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="G1"

/isolate="Elazig-3"

/specific_host="goat"

/db_xref="taxon:6210"

/country="Turkey: Elazig province"

gene <1..>425

/gene="COI"

CDS <1..>425

/gene="COI"

/codon_start=2

/transl_table=9

/product="cytochrome oxidase subunit I"

/protein_id="ABS50562.1"

/db_xref="GI:153799864"

/translation="VLILPGFGIISHICLSISANFDAFGFYGLLFAMFSIVCLGSSVWGHMHMFTVGL
DVKTAVFFTSVTIYIGVSTGIKVFNWLYMLLNSSVNVSDPVLWWVVSFIVLFTFGGVTGIV
LSACVLDNILHDTWFWVAHFHMFPHYN"

ORIGIN

```
1  cgtgttgatt ttgcctggat ttggtataat tagtcatatt tgtttgagta ttagtgctaa
61  ttttgatcgc ttggggttct atgggttggt gtttgctatg ttttctatag tgtgtttggg
121 tagcagggtt tgggggtcatc atatgtttac tgttgggttg gatgtgaaga cggctgtttt
181 ttttacctct gttactatat atataggggt ctctactggt ataaagggtg ttaactgggt
241 atatatgttg ttgaattcga gtgttaatgt tagtgatccg gttttgtgat ggggtgtttc
301 ttttatagtg ttgtttacgt ttgggggagt tacgggtata gttttgtctg cttgtgtgtt
361 agataatatt ttgcatgata cttggtttgt ggtggctcat tttcatatgt ttcctttcta
421 taaaa
```

//

Ek 5

LOCUS EU006775 424 bp DNA linear INV 30-JUL-2007

DEFINITION Echinococcus granulosus isolate Van cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial.

ACCESSION EU006775

VERSION EU006775.1 GI:153799865

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion Echinococcus granulosus

ORGANISM Echinococcus granulosus Eukaryota; Metazoa; Platyhelminthes; Cestoda; Eucestoda; Cyclophyllidea; Taeniidae; Echinococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 424)

AUTHORS Utuk,A.E., Simsek,S. and Koroglu,E.

TITLE Molecular genetic characterization of Turkish isolates of Echinococcus granulosus

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 424)

AUTHORS Utuk,A.E., Simsek,S. and Koroglu,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-JUN-2007) Department of Parasitology Faculty of Veterinary Medicine, University of Firat, Rektorluk Kampusu, Elazig 23119, Turkey

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..424

/organism="Echinococcus granulosus"

/organelle="mitochondrion"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="G1"

/isolate="Van"

/specific_host="cattle"

/db_xref="taxon:6210"

/country="Turkey: Van province"

gene <1..>424

/gene="COI"

CDS <1..>424

/gene="COI"

/codon_start=2

/transl_table=9

/product="cytochrome oxidase subunit I"

/protein_id="ABS50563.1"

/db_xref="GI:153799866"

/translation="VLILPGFGILSHICLSISANFDVFGFYGLLFAMFSIVCLGSSVWGHMFTVGL
DVKTAVFFSSVTMIIGVPTGIKVFTWIYMLLNSSVNVSDPVLWWVVSFIVLFTFGGVTGIV
LSACVLNNILHDTWFVVAHFHYVSFYN"

ORIGIN

```
1  cgtgttgatt ttgcctggat ttggtatact tagtcatatt tgtttgagta ttagtgctaa
61  ttttgatgtg tttgggttct atggggttgt gtttgctatg ttttctatag tgtgtttggg
121 tagcaggggt tggggtcac atagtgttac tgttgggttg gatgtgaaga cggctgtttt
181 ttttagctct gttactatga ttataggggt tcctactggg ataaagggtt ttacttggat
241 atatatgttg ttgaattcga gtgttaatgt tagtgatccg gttttgtgat ggggtgtttc
301 ttttatagtg ttgtttacgt ttgggggagt tacgggtata gttttgtctg cttgtgtgtt
361 aaataatatt ttgcatgata cttggtttgt ggtggctcat tttcattatg tttctttcta
421 taaa
```

//

Ek 6

LOCUS EU006776 424 bp DNA linear INV 30-JUL-2007

DEFINITION Echinococcus granulosus isolate Malatya-1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial.

ACCESSION EU006776

VERSION EU006776.1 GI:153799867

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion Echinococcus granulosus

ORGANISM Echinococcus granulosus Eukaryota; Metazoa; Platyhelminthes; Cestoda; Eucestoda; Cyclophyllidea; Taeniidae; Echinococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 424)

AUTHORS Utuk,A.E., Simsek,S. and Koroglu,E.

TITLE Molecular genetic characterization of Turkish isolates of Echinococcus granulosus

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 424)

AUTHORS Utuk,A.E., Simsek,S. and Koroglu,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-JUN-2007) Department of Parasitology Faculty of Veterinary Medicine, University of Firat, Rektörlük Kampusu, Elazig 23119, Turkey

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..424

/organism="Echinococcus granulosus"

/organelle="mitochondrion"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="G1"

/isolate="Malatya-1"

/specific_host="sheep"

/db_xref="taxon:6210"

/country="Turkey: Malatya province"

gene <1..>424

/gene="COI"

CDS <1..>424

/gene="COI"

/codon_start=3

/transl_table=9

/product="cytochrome oxidase subunit I"

/protein_id="ABS50564.1"

/db_xref="GI:153799868"

/translation="WLILPGFGIFSHICLSISANFADFIFYGLLFAMFSIVCLGSSVWGHMFTVGL
DVKTAVFFSSVTMIIGVPTGIKVFTWLYMLLNSSVNVSDPVLWWVVSFIVLFTFGGVTGIV
LSACVLNNILHDTWVVAHFHYVLSL"

ORIGIN

```
1 ggtggttgat tttgcctgga tttggtatat ttagtcatat ttgtttgagt attagtgcta
61 attttgatgc gtttgggttc tatgggttgt tgtttgctat gttttctata gtgtgtttgg
121 gtagcagggt ttgggggtcat catatgttta ctggtgggtt ggatgtgaag acggctgttt
181 tttttagctc tgttactatg attatagggg ttcctactgg tataaagggtg tttacttggt
241 tatatatgtt gttgaattcg agtgtaatg ttagtgatcc ggttttgta tgggttggtt
301 cttttatagt gttgtttacg tttgggggag ttacgggtat agttttgtct gcttgtgtgt
361 taaataatat tttgcatgat acttggtttg tggtggtcga ttttcattat gttctttcct
421 taaa
```

//

Ek 7

LOCUS EU006777 426 bp DNA linear INV 30-JUL-2007

DEFINITION Echinococcus granulosus isolate Malatya-2 cytochrome oxidase subunit I-like (COI) gene, partial sequence; mitochondrial.

ACCESSION EU006777

VERSION EU006777.1 GI:153799869

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion Echinococcus granulosus

ORGANISM Echinococcus granulosus Eukaryota; Metazoa; Platyhelminthes; Cestoda; Eucestoda; Cyclophyllidea; Taeniidae; Echinococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 426)

AUTHORS Utuk,A.E., Simsek,S. and Koroglu,E.

TITLE Molecular genetic characterization of Turkish isolates of Echinococcus granulosus

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 426)

AUTHORS Utuk,A.E., Simsek,S. and Koroglu,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-JUN-2007) Department of Parasitology Faculty of Veterinary Medicine, University of Firat, Rektörlük Kampusu, Elazig 23119, Turkey

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..426

/organism="Echinococcus granulosus"

/organelle="mitochondrion"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="G1"

/isolate="Malatya-2"

/specific_host="sheep"

/db_xref="taxon:6210"

/country="Turkey: Malatya province"

gene <1..>426

/gene="COI"

misc_feature <1..>426

/gene="COI"

/note="similar to cytochrome oxidase subunit I"

ORIGIN

```
1  gggggggttg attttgcctg gatttggtat aattagtcac atttgtttga gtattagtgc
61  taattttgat gtgtttgggt tttatgggtt gttgtttgct atgttttcta tagtgtgttt
121  gggtagcagg gtttggggtc atcatatggt tactgttggg ttggatgtga agacggctgt
181  ttttttttagc tctgttacta tgattatagg ggttcctact ggtataaagg tgtttacttg
241  gttatatatg ttgttgaatt cgagtgttaa tgtagtgat ccgggtttgt gatgggttgt
301  ttcttttata gtgttggtta cgtttggggg agttacgggt atagttttgt ctgcttggtg
361  gttaaataat attttgcacg atacttgggt tgtggtggct cattttcatt atgttctttc
421  tttaaa
```

//

Ek 8

LOCUS EU006778 426 bp DNA linear INV 30-JUL-2007

DEFINITION Echinococcus granulosus isolate Malatya-3 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial.

ACCESSION EU006778

VERSION EU006778.1 GI:153799870

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion Echinococcus granulosus

ORGANISM Echinococcus granulosus Eukaryota; Metazoa; Platyhelminthes; Cestoda; Eucestoda; Cyclophyllidea; Taeniidae; Echinococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 426)

AUTHORS Utuk,A.E., Simsek,S. and Koroglu,E.

TITLE Molecular genetic characterization of Turkish isolates of Echinococcus granulosus

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 426)

AUTHORS Utuk,A.E., Simsek,S. and Koroglu,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-JUN-2007) Department of Parasitology Faculty of Veterinary Medicine, University of Firat, Rektörlük Kampusu, Elazig 23119, Turkey

FEATURES Location/Qualifiers

source
1..426
/organism="Echinococcus granulosus"
/organelle="mitochondrion"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="G1"
/isolate="Malatya-3"
/specific_host="sheep"
/db_xref="taxon:6210"
/country="Turkey: Malatya province"

gene
<1..>426
/gene="COI"

CDS
<1..>426
/gene="COI"
/codon_start=2
/transl_table=9
/product="cytochrome oxidase subunit I"
/protein_id="ABS50565.1"
/db_xref="GI:153799871"

/translation="VLILPGFGIISHICLSISANFDAFGFYGLLFAMFSIVCLGSSVWGHMHMFTVGL
DVKTAVFFSSVTMIIGVPTGIKVFTWLYMLLNSSVNVSDPVLWWVVSFIVLFTFGGVTGIV
LSACVLNNILHDTWVVAHFHYVSFLY"

ORIGIN

```
1  cgtgttgatt ttgcctggat ttgggtataat tagtcatatt tgtttgagta ttagtgctaa
61  ttttgatgcg ttgggttct atgggttggt gtttgctatg ttttctatag tgtgtttggg
121 tagtagggtt tggggtcac atatgtttac tgttgggttg gatgtgaaga cggctgtttt
181 ttttagctct gttactatga ttataggggt tcctactggt ataaagggtg ttacttggtt
241 atatatgttg ttgaattcga gtgttaatgt tagtgatccg gttttgtgat gggttgtttc
301 ttttatagtg ttgtttacgt ttgggggagt tacgggtata gttttgtctg cttgtgtgtt
361 aaataatatt ttgcatgata cttggtttgt ggtggctcat tttcattatg tttcttttct
421 atataa
```

//

Ek 9

LOCUS EU006780 427 bp DNA linear INV 30-JUL-2007

DEFINITION Echinococcus granulosus isolate Elazig-1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial.

ACCESSION EU006780

VERSION EU006780.1 GI:153799874

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion Echinococcus granulosus

ORGANISM Echinococcus granulosus Eukaryota; Metazoa; Platyhelminthes; Cestoda; Eucestoda; Cyclophyllidae; Taeniidae; Echinococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 427)

AUTHORS Utuk,A.E., Simsek,S. and Koroglu,E.

TITLE Molecular genetic characterization of Turkish isolates of Echinococcus granulosus

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 427)

AUTHORS Utuk,A.E., Simsek,S. and Koroglu,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-JUN-2007) Department of Parasitology Faculty of Veterinary Medicine, University of Firat, Rektörlük Kampusu, Elazig 23119, Turkey

FEATURES Location/Qualifiers

source
1..427
/organism="Echinococcus granulosus"
/organelle="mitochondrion"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="G1"
/isolate="Elazig-1"
/specific_host="goat"
/db_xref="taxon:6210"
/country="Turkey: Elazig province"

gene
<1..>427

CDS
<1..>427
/gene="COI"
/codon_start=2
/transl_table=9
/product="cytochrome oxidase subunit I"
/protein_id="ABS50567.1"
/db_xref="GI:153799875"

/translation="VLILPGFGIISHICLSISANFDAFGFYGLLFAMFSIVCLGSSVWGHMHMFTVGL
DVNTAVFFSSVTMIIGVPTGIKVFTWLYMLLNSSVNVSDPVLWWVVSFIVLFTFGGVTGIV
LSACVLDNILHDTWFFVAHFHMFLLIN"

ORIGIN

```
1 agtgttgatt ttgcctggat ttgggtattat tagtcatatt tgtttaagta ttagtgctaa
61 ttttgatgcg ttggggttct atgggttggt gtttgctatg ttttctatag tgtgtttggg
121 tagcaggggt tgggggtcatc atatgtttac tgttgggttg gatgtgaaaa cggctgtttt
181 ttttagctct gttactatga ttataggggt tcctactggt ataaagggtg ttacttggtt
241 atatatgttg ttgaattcga gtgttaatgt tagtgatccg gttttgtgat gggttgtttc
301 ttttatagtg ttgtttacgt ttgggggagt tacgggtata gttttgtctg cttgtgtgtt
361 agataatatt ttgcatgata cttgggtttgt ggtggctcat tttcatatgt ttctctttct
421 tataaaa
```

//

Ek 10

LOCUS EU006781 421 bp DNA linear INV 30-JUL-2007

DEFINITION Echinococcus granulosus isolate Elazig-2 cytochrome oxidase subunit I-like (COI) gene, partial sequence; mitochondrial.

ACCESSION EU006781

VERSION EU006781.1 GI:153799876

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion Echinococcus granulosus

ORGANISM Echinococcus granulosus Eukaryota; Metazoa; Platyhelminthes; Cestoda; Eucestoda; Cyclophyllidea; Taeniidae; Echinococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 421)

AUTHORS Utuk,A.E., Simsek,S. and Koroglu,E.

TITLE Molecular genetic characterization of Turkish isolates of Echinococcus granulosus

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 421)

AUTHORS Utuk,A.E., Simsek,S. and Koroglu,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-JUN-2007) Department of Parasitology Faculty of Veterinary Medicine, University of Firat, Rektörlük Kampusu, Elazig 23119, Turkey

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..421

/organism="Echinococcus granulosus"

/organelle="mitochondrion"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="G1"

/isolate="Elazig-2"

/specific_host="goat"

/db_xref="taxon:6210"

/country="Turkey: Elazig province"

gene <1..>421

/gene="COI"

misc_feature <1..>421

/gene="COI"

/note="similar to cytochrome oxidase subunit I"

ORIGIN

```
1  cgtgttgatt ttgcctggat ttggtattat tagtcatatt tgtttaagta ttagtgctaa
61  ttttgatgcg ttgggttctc atgggttggt gtttgctatg ttttctatag tgtggttggg
121 tagcaggggt tggggtcatc atatgtttac tgttgggttg gatgtgaaga cggctgtttt
181 ttttagctct gttactatga ttataggggt tcctactggg ataaagggtg ttacttggtt
241 atatatgttg ttgaattcga gtgttaatgt tagtgatccg gttttgtgat gggttgtttc
301 ttttatagtg ttgtttacgt ttgggggagt tacgggtata gttttgtctg cttgtgtggt
361 agataatatt ttgcatgata cttggtttgt ggtggctcat tttcatttgt tcctttttta
421 g
```

//

Ek 11

LOCUS EU006782 425 bp DNA linear INV 30-JUL-2007

DEFINITION Echinococcus granulosus isolate Elazig-4 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial.

ACCESSION EU006782

VERSION EU006782.1 GI:153799877

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion Echinococcus granulosus

ORGANISM Echinococcus granulosus Eukaryota; Metazoa; Platyhelminthes; Cestoda; Eucestoda; Cyclophyllidae; Taeniidae; Echinococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 425)

AUTHORS Utuk,A.E., Simsek,S. and Koroglu,E.

TITLE Molecular genetic characterization of Turkish isolates of Echinococcus granulosus

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 425)

AUTHORS Utuk,A.E., Simsek,S. and Koroglu,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-JUN-2007) Department of Parasitology Faculty of Veterinary Medicine, University of Firat, Rektörlük Kampusu, Elazig 23119, Turkey

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..425
/organism="Echinococcus granulosus"
/organelle="mitochondrion"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="G1"
/isolate="Elazig-4"
/specific_host="goat"
/db_xref="taxon:6210"
/country="Turkey: Elazig province"

gene <1..>425
/gene="COI"

CDS <1..>425
/gene="COI"
/codon_start=2
/transl_table=9
/product="cytochrome oxidase subunit I"
/protein_id="ABS50568.1"
/db_xref="GI:153799878"

**/translation="VLILPGFGIFSHICLSISANFDAFGFYGLLFAMFSIVCLGSSVWGHMFTVGL
DVKTAVFFSSVTMIIGVPTGIKVFTWLYMLLNSSVNVSDPVLWVVVSFIVLFTFGGVTGIV
LSACVLNNILHDTWVVAHFLWFLFYN"**

ORIGIN

```
1 cgtgttgatt ttgcctggat ttgggtat ttt tagtcatatt tgtttgagta ttagtgctaa
61 ttttgatgcg tttgggttct atgggttggt gtttgctatg ttttctatag tgtgtttggg
121 tagcagggtt tggggtcac atagttttac tgttgggttg gatgtgaaga cggctgtttt
181 ttttagctct gttactatga ttataggggt tcctactggt ataaagggtt ttacttggtt
241 atatatgttg ttgaattcga gtgttaatgt tagtgatccg gttttgtgat gggttgtttc
301 ttttatagtg ttgtttacgt ttgggggagt tacgggtata gttttgtctg cttgtgtgtt
361 aaataatatt ttgcatgata cttgggttgt ggtggctcat tttctttggt ttcttttcta
421 taaaa
```

//

9. ÖZGEÇMİŞ

Mersin ili Tarsus İlçesinde 02.10.1979 tarihinde doğdum. İlk, orta ve lise tahsilimi T.E.V Özel Tarsus Lisesi'nde tamamladım. 1997 yılında kazandığım Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni 2002 yılında birincilikle bitirdim. Eylül 2002 döneminde Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Programı Parazitoloji Anabilim Dalında doktora eğitimime başladım ve ertesi yıl aynı anabilim dalına Araştırma Görevlisi olarak atandım. Halen Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'na bağlı Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nün Parazitoloji ve Arı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı'nda Veteriner Hekim olarak görev yapmaktayım.