



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KİSTİK EKİNOKOKKOZİS'Lİ HASTALARDA SEROLOJİK  
SONUÇLARIN GENOTİP İLİŞKİSİNİN DİZİ ANALİZİ  
SONUÇLARI İLE KARŞILAŞTIRILARAK ARAŞTIRILMASI**

ÖZLEM TÜRKÜM  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. NURAY ALTINTAŞ

Prof. Dr. NAZMİYE ALTINTAŞ

MANİSA

2018





TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÖZLEM TÜRKÜM  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. NURAY ALTINTAŞ

Prof. Dr. NAZMİYE ALTINTAŞ

TEZ SINAV JÜRİSİ

PROF. DR. ARLAN SAKARYA

PROF. DR. AYŞEGÜL ÜNVER

MANİSA

2018

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilemeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışım olmadığını beyan ederim.

Özlem TÜRKÜM

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince, bilgi, deneyim ve yardımlarını esirgemeyen Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Nuray ALTINTAŞ' a,

Bilgi ve deneyimlerinden istifade ettiğim, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi İkinci Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Nazmiye ALTINTAŞ' a,

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mehmet KORKMAZ' a,

Hasta temini konusunda yardımcı olan tüm hekim ve akademisyenlere,

Eğitim hayatımın bu zorlu döneminde her türlü maddi ve manevi desteği sağlayayan ve her koşulda yanımda duran sevgili eşime ve aileme

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özlem TÜRKÜM

# İÇİNDEKİLER

<b>BEYAN</b> .....	<b>i</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>v</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. ÖZET</b> .....	<b>1</b>
<b>2.ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>3.GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....	<b>3</b>
<b>4.GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>7</b>
4.1.Tarihçe.....	7
4.2.Parazitin Genel Tanımı.....	8
4.2.1.Yumurta .....	10
4.2.2. Metasestod (Larva) form .....	10
4.2.3. Biyolojik döngü .....	12
4.3. <i>Echinococcus granulosus</i> ' un Suşları.....	14
4.3.1. Evcil koyun suşu (G1) .....	14
4.3.2. Tazmanya koyun suşu (G2) .....	15
4.3.3. Manda suşu (G3).....	15
4.3.4. At suşu (G4).....	16
4.3.5. Sığır suşu (G5) .....	16
4.3.6. Deve suşu (G6) .....	16
4.3.7. Domuz suşu (G7).....	17
4.4. Epidemiyoloji.....	18
4.4.1. Kişi özellikleri.....	19
4.4.2. Kistik Ekinokokkozis'in bulaşma yolları .....	20
4.4.3. <i>E. granulosus</i> 'un yaygınlığı.....	20

4.5. Ekinokokkozis'in Kliniği.....	22
4.5.1. Klinik belirtiler .....	22
4.5.3. Kistik ekinokokkozis tanısı.....	23
4.5.4.Kist hidatikte tedavi .....	30
4.5.5. Korunma ve kontrol .....	33
4.6. <i>Echinococcus granulosus</i> Suşlarının Genotiplendirilmesi.....	33
4.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): .....	36
4.6.2. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) .....	37
4.6.3. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PZR: .....	38
4.6.4. PZR-Single Stranded Conformation Polimorphism (PZR-SSCP) analizi:38	
4.6.5. Dideoxy Fingerprinting (ddF): .....	38
4.6.6. DNA Baz Dizi Analizi (Sequencing): .....	39
<b>5.GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>41</b>
5.1.Serolojik Çalışmalar İçin Gereç.....	41
5.2. Yöntem.....	43
5.2.1. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Testinin Uygulanması 43	
5.2.2. Moleküler Yöntemler.....	49
<b>6. BULGULAR.....</b>	<b>65</b>
6.1. MOLEKÜLER BULGULAR.....	66
6.1.1. Mitokondrial CO1 ve NAD1 Genlerinin PZR Bulguları.....	66
6.1.2. Mitokondrial CO1 ve NAD1 genlerinin çift yönlü DNA dizi analizi bulguları .....	68
6.1.3. Ribozomal ITS-1 gen bölgesi PZR-RFLP bulguları.....	71
6.2. Serolojik Bulgular.....	73
<b>7. TARTIŞMA .....</b>	<b>77</b>
<b>8. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>82</b>
<b>9.KAYNAKLAR .....</b>	<b>83</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>89</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: <i>Echinococcus granulosus</i> yumurtası. ....	10
Şekil 2: Metasestod (Larva) form .....	12
Şekil 3: <i>Echinococcus granulosus</i> 'un hayat döngüsü.....	14
Şekil 4: Kistik ekinokokkozisin Dünyadaki yaygınlığı (Eryıldız 2010).....	21
Şekil 5: Kist tiplerinin ultrasonografik görüntüleri .....	26
Şekil 6: Akciğerdeki kistin X-Ray görüntüsü .....	27
Şekil 7: Mitokondriyal Cytochrome C Oxidase Subunit 1 (COI) Geni .....	34
Şekil 8: NADH Dehydrogenase Subunit 1 (Nad1) Geni .....	35
Şekil 9: Ribozomal internal transcribed spacer (ITS1) Geni .....	36
Şekil 10: ELISA Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeleri:.....	45
Şekil 11: Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Araç ve Gereçler .....	50
Şekil 12: ExoSAP-IT Reaksiyonu.....	62
Şekil 13: : CO1 genine ait ileri ve geri yönlü olarak dizileme işlemi sonrası elde edilen dizilerin allignment analizi. ....	68
Şekil 14: CO1 genine ait ileri ve geri yönlü olarak elektroferogram görüntüsü. ....	69
Şekil 15: NAD1 genine ait ileri ve geri yönlü olarak dizileme işlemi sonrası elde edilen dizilerin allignment analizi. ....	69
Şekil 16: : NAD1 genine ait ileri ve geri yönlü olarak elektroferogram görüntüsü... 70	
Şekil 17: : Allignment analizi sonrası elde edilen dizilerin BLAST görüntüsü.....	70



## RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Kist sıvısındaki protoskoleksler ( $\times 40$ ) (Orijinal).....	12
Resim 2: Protoskolekslerin ışık mikroskopunda görünümü (X40) Orijinal .....	41
Resim 3: İki farklı koyun antijeni ile IgG ve IgE ELISA deneme sonuçları. (B: Blank, N: negatif control, +, ++, +++: Düşük, ara ve yüksek pozitif hastalar, K1: Birinci Koyun antijeni, K2: İkinci koyun antijeni).....	48
Resim 4: Germinatif membrandan DNA izolasyon işlemi .....	54
Resim 5: Germinatif membrandan izole edilen DNA 'nın PCR master mixi.....	57
Resim 6: <i>Echinococcus granulosus</i> 'un hastalardaki mitokondrial CO1 geninin PZR ile amplifiye edilmesi sonucu oluşan 446 baz çifti (bç) uzunluğundaki bantlar. M: Marker, 1,2,3,4,5; İnsan izolatu, N: Negatif Kontrol (Distile Su).....	66
Resim 7: <i>Echinococcus granulosus</i> 'un hastalardaki mitokondrial CO1 geninin PZR ile amplifiye edilmesi sonucu oluşan 446 baz çifti (bç) uzunluğundaki bantlar. M: Marker, 1,2,3,4,5,6; İnsan izolatu N: Negatif Kontrol (Distile Su).....	67
Resim 8: <i>Echinococcus granulosus</i> 'un insan izolatlarının mitokondrial NAD1 geninin PZR ile amplifiye edilmesiyle oluşan 378 baz çifti (bç) uzunluğundaki bantlar. M: Marker, 1,2,3,4,5; İnsan izolatu N: Negatif Kontrol (Distile Su).....	67
Resim 9: <i>Echinococcus granulosus</i> 'un koyun, sığır ve insan izolatlarının ribozomal ITS-1 gen bölgesinin PZR ile amplifiye edilmesi sonucu oluşan bantların görünümü. M: Marker, 1; Pozitif Kontrol, 2; Negatif Kontrol (Distile Su), 3; İnsan İzolatu, 4; Koyun İzolatu, 5; Sığır İzolatu .....	71
Resim 10: <i>Echinococcus granulosus</i> 'un insan izolatlarının ribozomal ITS-1 gen bölgesinin RsaI enzimi ile kesilmesi sonucu oluşan bantların görünümü. M; Marker, 1; Pozitif Kontrol, 2; Negatif Kontrol 4; İnsan izolatu. ....	72
Resim 11: <i>Echinococcus granulosus</i> 'un koyun, sığır ve insan izolatlarının ribozomal ITS-1 gen bölgesinin MspI enzimi ile kesilmesi sonucu oluşan bantların görünümü. M; Marker, 1; Pozitif Kontrol, 2; Negatif Kontrol (Master mix içerisinde PZR ürünü yok, restriksiyon enzimi var), 3; Koyun İzolatu, 4; İnsan İzolatu, 5; Sığır İzolatu. ....	72
Resim 12: <i>Echinococcus granulosus</i> 'un koyun, sığır ve insan izolatlarının ribozomal ITS-1 gen bölgesinin CfoI enzimi ile kesilmesi sonucu oluşan bantların görünümü. M; Marker, 1; Pozitif Kontrol, 2; Negatif Kontrol (Master mix içerisinde PZR ürünü yok, restriksiyon enzimi var), 3; Koyun İzolatu, 4; İnsan İzolatu, 5; Sığır İzolatu. ....	73
Resim 13: 30. dakikada 450 nm'de okunan IgG ALP plağı .....	74
Resim 14: 60. dakikada 450 nm'de okunan IgG ALP ELISA plağı .....	75
Resim 15: Bir saat çalışma sonunda IgG ALP ELISA plakları .....	76

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: <i>Echinococcus</i> türlerinin karakterizasyonu .....	9
Tablo 2: <i>Echinococcus granulosus</i> 'un tiplendirilmesi için PZR Analizi ve DNA Dizileme işleminde kullanılan oligonükleotid primerler. ....	56
Tablo 3:Kist materyallerinin alındığı hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı.....	65
Tablo 4: 30. dakikada 450 nm'de okunan IgG ALP hasta değerleri. Neg: Negatif kontrol, Blank: boş çukur, +: düşük pozitif serum, ++: yüksek pozitif serum.....	74
Tablo 5: 60. dakikada 450 nm'de okunan IgG ALP hasta değerleri. Neg: Negatif kontrol, Blank: boş çukur, +: düşük pozitif serum, ++: yüksek pozitif serum.....	75

## KISALTMALAR

<b>KE</b>	Kistik Ekinokokkozis
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>RNA</b>	Ribonükleik Asit
<b>PZR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>CO1</b>	Sitokrom C Oksidaz Altünite 1
<b>NAD1</b>	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Dehidrogenaz Alt Ünite 1
<b>ITS-1</b>	Ribozomal ITS-1 Gen Bölgesi
<b>PZR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RFLP</b>	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
<b>AE</b>	Alveolar Ekinokokkozis
<b>qPZR</b>	Gerçek zamanlı (Real Time) PZR
<b>RAPD</b>	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
<b>SSCP</b>	Tek İplikli Konformasyon Polimorfizm
<b>PZR- SSCP</b>	PZR-Tek zincir Konformasyon Polimorfizmi
<b>US</b>	Ultrasonografi
<b>BT</b>	Bilgisayarlı Tomografi
<b>MR</b>	Manyetik Rezonans
<b>ERCP</b>	Endoskopik Retrograt Kolajiopankreatikografi
<b>MRCP- MR</b>	MR-Kolanjiografi
<b>IHA</b>	Indirect Hemaglütinasyon Antikor Testi
<b>IFA</b>	Indirect Fluoresan Antikor testi
<b>ID</b>	Immüdifüzyon

<b>IE</b>	Immunelektroforez
<b>RLB</b>	Reverse Line Blotting
<b>RT-PZR</b>	Reverse Transkriptaz PZR
<b>NaCl</b>	Sodyum Klorür
<b>TBE</b>	Tris-Borik Asit-EDTA
<b>PBS</b>	Fosfat-Tamponlu Tuz
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>Exo</b>	Eksonükleaz I
<b>SAP</b>	Shrimp Alkalın Fosfotaz

**Tezin Başlığı: Kistik Ekinokokkozis’li Hastalarda Serolojik Sonuçların Genotip İlişkisinin Dizi Analizi Sonuçları ile Karşılaştırılarak Araştırılması**

**Öğrencinin Adı: Özlem TÜRKÜM**

**Danışmanı: Doç. Dr. Nuray ALTINTAŞ**

**Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji**

## **1. ÖZET**

**Amaç:** Kistik ekinokokkoziste (KE) tedavi protokolünün planlanabilmesi için tanının erken dönemde, güvenilir şekilde konulması gerekmektedir. KE tanısında, günümüzde bilinen bütün serolojik tanı yöntemlerinden faydalanılmaktadır. Nükleer, mitokondriyel çalışmalar sonucunda *E. granulosus*’un başlangıçta 10 genotipi (G1-G10) tanımlanmıştır. Son moleküler çalışmalarla bazı türler aynı başlık altında toplanmıştır. Hastalığın gelişiminde suşun virulansı, parazitin genotipi önemlidir. Çalışmamızda ELISA yöntemiyle elde edilen spesifik antikor titreleriyle dizi analizi sonuçları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi ve Ege Üniversitesi Hastanesinde KE tanısıyla opere edilmiş veya Puncture Aspiration Injection Respiration (PAIR) işlemine tabi tutulmuş hastalardan alınan serum örnekleri, ayrıca kist sıvısındaki protoskoleksler, kist membranları toplanmıştır. DNA İzolasyonu, Elektroforez, PCR ve Sekans Analizi yapılmış, aynı hastaların serumları IgG yönünden seropozitiflik durumu Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle belirlenmiştir.

**Bulgular:** Çalışmada serolojik ve moleküler bulgular benzer bulunmuştur.

**Sonuçlar:** Serolojik ve moleküler sonuçlar karşılaştırılmış ve tüm hastalardaki etkenin *Echinococcus granulosus sensu stricto* G1/G3 olduğu anlaşılmıştır. Çalışmamız, genotipler ile klinik sonuçlar arasındaki ilişkiyi serolojik araştırması açısından özgün bir nitelik taşımaktadır.

**Anahtar sözcükler:** Kistik ekinokokkozis, seroloji, sekans analizi, ELISA, PCR

**Thesis Title: Investigation of Genotype Relation of Serological Results in Patients with Cystic Echinococcosis Compared to Sequence Analysis Results**

**Student's Name: Özlem TÜRKÜM**

**Advisor: Assoc. Dr. Nuray ALTINTAŞ**

**Department: Medical Biology**

## **2.ABSTRACT**

**Objectives:** To be able to plan a cystic echinococcosis (CE) treatment protocol, the diagnosis must be made early and reliable. In the case of KE, all serological diagnostic methods known today are utilized. At the end of the nuclear, mitochondrial studies, 10 genotypes (G1-G10) of *E. granulosus* were initially identified. Some species have been grouped under the same title with the last molecular studies. Suvan virulence, parasite genotype is important in the development of the disease. In our study, it was aimed to evaluate the relationship between specific antibody titers obtained by ELISA and sequence analysis results.

**Materials and Methods:** Serum specimens obtained from patients who were treated with KE in Manisa Celal Bayar University Hospital of Hafsa Sultan and Ege University Hospital or who were subjected to Puncture Aspiration Injection Respiration (PAIR) treatment, as well as protozoa and cyst membranes of cyst fluid were collected. DNA Isolation, Electrophoresis, PCR and Sequence Analysis were performed. Seropositivity of IgG sera of the same patients was determined by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method.

**Findings:** Serological and molecular findings were similar in the study.

**Results:** Serological and molecular outcomes were compared and it was found that *Echinococcus granulosus sensu stricto* G1 / G3 was the causative agent in all patients. Our study is unique in terms of a serological survey of genotypes and clinical outcomes.

**Key words:** Echinococcosis, serology, sequence analysis, ELISA, PCR

### 3.GİRİŞ ve AMAÇ

Ekinokokkozis, *Echinococcus* türlerince oluşturulan zoonotik bir enfeksiyondur (Altıntaş ve Doğanay 2008). Ara konaklarda *Echinococcus granulosus* larvalarının neden olduğu hastalık “kistik ekinokokkozis (cystic echinococcosis, KE)”, *Echinococcus multilocularis* larvalarının neden olduğu hastalık “alveolar ekinokokkozis (alveolar echinococcosis, AE)”, *Echinococcus vogeli* ve *Echinococcus oligarthrus* larvalarının neden olduğu hastalık da “polikistik ekinokokkozis (polycystic echinococcosis)” olarak isimlendirilmektedir. Kistik ekinokokkozis, tarım ve hayvancılığın yaygın bir geçim kaynağı olduğu, buna karşın çevre sağlığı ve koruyucu hekimlik önlemlerinin yetersiz kaldığı tüm toplumlarda görülen önemli bir paraziter hastalıktır (Altıntaş ve Doğanay 2008).

Türkiye’deki insanlarda KE olgularına tüm bölgelerde rastlanırken, AE olgularına özellikle Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde daha sıklıkla rastlanmaktadır (Altıntaş 2008). Genel olarak *Echinococcus* türlerinin kesin konakları et oburlar, ara konakları ise insan da dahil olmak üzere memelilerdir. Bazı kaynaklarda insan, bu hastalık için rastlantısal ara konak olarak değerlendirilmektedir. Bu hastalıkların epidemiyolojisinde eti yenen hayvanlardan olan koyun ve sığırlar önemli bir yer tutmaktadır (Çelik 2006). Türkiye’de sığırlarda kistik ekinokokoz prevalansı (%14,2-%54,7) oldukça yüksektir (Şimşek ve ark. 2010).

Ara konak olan evcil hayvanlarda özellikle kesim sonrası enfekte karaciğerlerin imhası sonucu büyük ekonomik kayıplar oluşmaktadır (Gündoğdu ve Arslan 2005). Ülkemiz hem KE hem de AE için endemik olarak tanımlanmaktadır. Yalnızca İç Anadolu Bölgesinde yer alan 13 ilde 2001-2005 yılları arasında 2348’i erkek, 2998’i kadın olmak üzere toplam 5346 olguya KE tanısı konmuştur (Yılmaz ve Babür 2007).

*Echinococcus granulosus* köpeklerin, bazen de kurt ve çakal gibi köpekgillerin ince bağırsaklarında yaşar. Larva şekli ise başta koyun olmak üzere sığır, at, domuz, geyik, deve ve insanların çeşitli organ ve dokularına yerleşir (Özdemir 2005).

Kist hidatik hastalığının bulaşmasında köpekler önemli bir faktördür. Diğer yandan hayvan kesimlerinin hijyensiz ve bilinçsiz yapılması, hastalıklı organların tüketilmesi ve genel hijyen kurallarına uyulmaması hastalığın yayılmasında rolü olan diğer etmenlerdir. İnsanlarda KE prevalansı, koyun, sığır gibi besi hayvanlarındaki prevalansla yakından ilişkilidir. Buna ek olarak parazit genotipi de prevalansı etkilemektedir (Çelik 2006). Hastalığın çoğu kez sinsi seyretmesi; tanı yöntemlerinin zor ve pahalı olması, standart ve etkili tedavi yöntemlerinin bulunamaması, ülke koşulları nedeniyle hastalık kaynaklarının devam etmesi, gelişmekte olan ülkelerde prevalans ve insidans çalışmalarının yetersiz olması ve kontrol programlarının uygulamadaki zorluğuna bağlıdır (Özdemir 2005).

İnsan KE'inde tanı koydurucu spesifik klinik bulguların olmaması, hastalığın tanısında klinik bulgulardan çok laboratuvar bulgularından yararlanılmasına neden olmuştur. KE tanısı günümüzde radyolojik tanı yöntemleri ile konulmaya çalışılmaktadır. Fakat kistin tümör, apse, basit kist gibi diğer yer kaplayan olgularla ayırıcı tanısının yapılabilmesi ve operasyon sonrası nükslerin daha sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilmesi için ön tanının, mutlaka serolojik tanı yöntemleriyle desteklenmesi gerekmektedir.

Serolojik testlerin, enfeksiyonlu kişilerin serumundaki spesifik antikorları tespit etme kapasitesinin (sensitivite) ve KE hastalığı olanları diğer parazitik ve klinik hastalığı olanlardan ayırma kapasitesinin (spesifite); kullanılan antijenin cinsi ve hazırlanma şekli, değişik pozitiflik kriterleri, kistin canlılığı ve lokalizasyonu, parazitin suşu gibi birçok sebebe bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Cerrahi olarak kanıtlanmış KE'li insan serumlarında ELISA testi ile yapılan çalışmalarda sensitivitenin %90-100, spesifisitenin ise %76-97 olarak saptandığı bildirilmiştir (Yolasığmaz A, Altıntaş Nuray 2004).

Ayrıca parazitin genotipinin belirlenmesi hastalığın gelişiminin seyri bakımından son derece önemlidir. Kuru ve ark. (2013) Aydın yöresindeki köpeklerde



yaptıkları *E.granulosus* taramasında moleküler yöntemler sonucunda G1 suşuna rastlamışlardır.

Ütük (2008)' ün yaptığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve sekans analizleri sonucunda 313 kist örneğinin (koyun, keçi ve sığır) G1 suşu ile enfekte olduğu görülmüştür. Yıldız ve ark.(2010)'nın Kırıkkale mezbahasından alınan 24 koyun kistinde yaptığı moleküler çalışmada da örneklerin tamamının G1 suşu içerdiği bildirilmiştir. Yine Ütük ve Pişkin (2010)'in melez bir dağ keçisinin akciğer, karaciğer, dalak ve beyin dokusunda yaptıkları moleküler çalışmada etkin suşun G1 olduğu raporlanmıştır.

Ütük ve ark.(2012)'nin Kilis bölgesinde 19 koyundan elde ettiği 28 kist materyalinin moleküler analizinde enfeksiyon etkeninin G1 suşu olduğu belirtilmiştir. Ergin ve ark. (2010)'nın Türkiye'nin altı bölgesinden toplanan 46 hastada yaptığı moleküler çalışma sonucunda hastalık sebebinin G1 suşu olduğu belirtilmiştir.

Türkiye'nin batı bölgesinde, 22 *Echinococcus granulosus* izolatının (12 koyun, 10 insan) mitokondrial COX1 ve NAD1 genleri DNA dizileme yöntemiyle incelenmiş ve 17 izolatta G1 suşu, bir koyun izolatında G3 suşu ve başka bir koyun izolatında G1/G3 suşu bulunmuştur. İki koyun ve bir insan izolatında ise ilk defa G7 suşu tespit edilmiştir (Šnábel ve ark. 2009).

Trakya bölgesinde insan ve hayvanlardan alınan 58 örnekte (42 insan, 13 sığır, 3 koyun) yapılan moleküler çalışmalar sonucunda; G1 suşunun insan, koyun, keçi, sığır, deve, su aygırı ve köpekleri; G3 suşunun insan, koyun ve sığırları; G7 suşunun insan ve koyunları; G6 suşunun ise sadece insanları enfekte ettiği belirtilmiştir (Eryıldız ve ark. 2012).

Türkiye'de *E.granulosus'* un farklı izolatlarını genotiplendirmek amacıyla (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR) RAPD-PZR, (Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriction Fragment Length Polimorphism) PZR-RFLP, (Single Stranded Conformation Polimorphism) SSCP ve DNA dizileme gibi moleküler teknikler kullanılmıştır. Sığır, koyun, muflon koyunu, keçi, melez dağ keçisi, deve, köpek ve insanlar üzerinde yürütülen çalışmalar sonucunda ülkemizde G1, G1/G3,

G3, G6, G7 suşları tespit edilmiştir (Şimşek ve ark. 2010; Ütük 2011; Eryıldız ve ark. 2012; Altıntaş Nuray 2013; Eroğlu ve ark. 2016; Gökpınar ve ark. 2017).

G7 suşunun G1 ile karşılaştırıldığında daha hızlı gelişebilmesi göz önünde bulundurulursa, gerek insanlarda hastalığın seyrinde gerekse kontrol programı oluşturulması çalışmalarında büyük önem arz etmektedir.

Bu nedenle çalışmamızın amacı; KE'li hastalardan elde edilmiş olan serum örneklerine hidatik kist sıvısı antijeninin kullanılacağı ELISA yöntemi uygulanarak spesifik antikorların saptanması, elde edilecek dizi analizi verileri ile de *Echinococ* türünün belirlenmesi ve böylece bu hastalardaki spesifik immün yanıtın *Echinococ* türü ile ilişkisinin araştırılmasıdır.

## 4.GENEL BİLGİLER

### 4.1.TARİHÇE

*Echinococcus*'ların erişkin formları ve özellikle de larva evreleri hakkındaki ilk bilgiler çok eski zamanlara dayanmaktadır (Çelik 2006).

Hippocrat (MÖ 460-347) sığır ve domuzda KE'nin varlığını bildirmiş, insan karaciğerinde saptadığı KE'i, su dolu kese anlamındaki "Jecur aqua repletum" diye tanımlamıştır. Aristoteles (MÖ 384-322), KE'in karaciğer ve akciğerde yıkım yaptığına dikkat çekmiştir. Galenos (MÖ 131-201), sığırların karaciğerlerinde çok kez gördüğü hidatik keseleri insanda da gördüğünü bildirmiştir. Tyson (1691), koyun leşlerinde gördüğü hidatik kistleri tarif etmiştir. Goeze (1782), kistlerin içindeki skolekslerden bahsetmiş, Siebold (1853) ise *Echinococcus granulosus*'un yaşam döngüsünü deneysel olarak kanıtlamıştır. *Echinococcus multilocularis*'in tür tayini, *E. granulosus*'un tanımlanmasından çok sonra Rausch (1954) tarafından parazitin saptanması ve Vogel (1957) tarafından tilkilerle kemirgenler arasında süregelen vahşi yaşam döngüsünün anlaşılmasından sonra yapılabilmektedir. *Echinococcus vogeli*, Tatche ve Sousa (1966), *Echinococcus oligarthrus* ise, Rausch ve D'Alessandra (1978) tarafından isimlendirilmişlerdir. 1920-1960 yılları arasında en az 10 farklı tür önerisi yapılmış, ancak daha sonra bunların çoğunun geçersiz ya da birbirinin sinonimi olduğu anlaşılmıştır (Altıntaş 2004; Çelik 2006; Altıntaş 2008).

### ***Echinococcus* cinsinin sınıflandırılması:**

Alem: Platyhelminthes

Sınıf: Cestoda

Alt sınıf: Eucestoda

Takım: Cyclopyllidea

Aile: Taeniidae (Ludwig,1886)

Cinsi: *Echinococcus* (Rudolphi,1801)

*Echinococcus*'un bugün için kabul edilen dört türü mevcuttur. Bunlar:

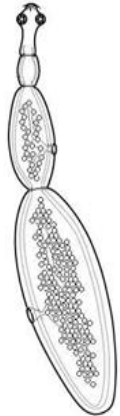
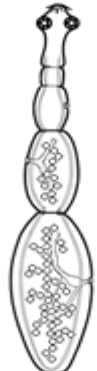
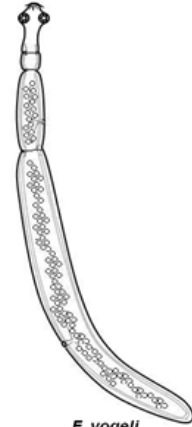

1. *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786)
2. *Echinococcus vogeli* (Leukart,1863)
3. *Echinococcus multilocularis* (Diesing,1863)
4. *Echinococcus oligarthus* (Raush ve Berntein, 1972) (Altıntaş 2004; Çelik 2006; Altıntaş 2008).

### **4.2.PARAZİTİN GENEL TANIMI**

Sestod sınıfına giren helmintlerin vücutları uzun, yassı ve halkalara ayrılmıştır. *Echinococcus* türlerinin boyları iki ile sekiz mm arasında değişir. Vücutları baş, boyun ve halkalar olmak üzere üç kısımdan oluşur. Skoleks denilen baş kısımlarında dört adet çekmen ve rostellumları üzerinde sayıları değişen çengeller bulunur. Gövdede sayısı 2-6 arasında değişen iki sıra halka bulunur. Strobila, boyundan itibaren oluşan halkaların tümüne verilen isimdir. Proglottid ise tek bir halkaya denir. Boyundan sonra oluşan ilk halka genç halka, daha sonra olgun halka oluşur. Son halka gebe halkadır. Gebe halkada 200-800 adet yumurta bulunmaktadır. Yumurtalar 30-40 mikrometre çapında, yuvarlak veya ovaldir. İçlerinde altı çengelli embriyo (onkosfer) bulunmaktadır. Onkosferi embriyofor denen birkaç katlı kılıf sarmaktadır.

Metasestod, çimlenme kapsüllerini oluşturan, germinal tabakadan oluşmuş kese biçimindeki bir yapıdır. Protoskoleksler, çimlenme kapsüllerinin iç duvarlarından veya germinal tabakadan gelişirler (Özdemir 2005; Çelik 2006; Yılmaz 2007; Altıntaş 2008).

**Tablo 1: *Echinococcus* türlerinin karakterizasyonu**

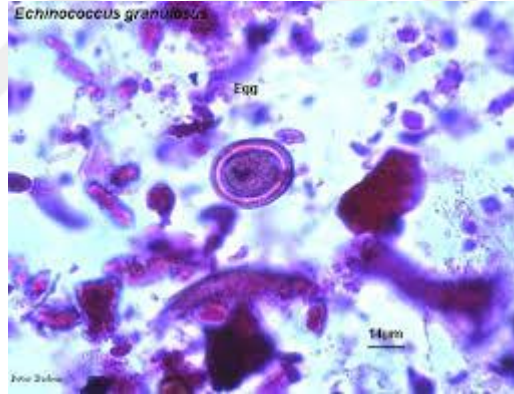
Özellikler	<i>Echinococcus granulosus</i>	<i>Echinococcus multilocularis</i>	<i>Echinococcus vogeli</i>	<i>Echinococcus oligarthrus</i>
<b>Boyut</b>	Erişkini 2-7 mm, nadiren 11 mm	Erişkini 1,2-4,5 mm	Erişkini 3,9-5,5 mm	Erişkini 2,2-2,9 mm
<b>Çengel Sayısı</b>	34-38	14-34	28-36	26-40
<b>Büyük Çengel</b>	25-49 µm	24,9-34 µm	49-57 µm	43-60 µm
<b>Küçük Çengel</b>	17-31 µm	20,4-31 µm	30-47 µm	28-45 µm
<b>Erişkin canlı</b>				
	<i>E. granulosus</i>	<i>E. multilocularis</i>	<i>E. vogeli</i>	<i>E. oligarthrus</i>

Hermafrodit olan erişkin parazitler, son konakların bağırsak mukozasına oldukça sıkı bir şekilde tutunarak yaşamlarını burada sürdürürler. Parazitin cinsel 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 (Altıntaş 2004; Sırmalı 2005).

#### 4.2.1.Yumurta

*Echinococcus* yumurtaları yuvarlak ya da hafif oval şekilli olup, 30-40 µm çapındadır. İçlerinde altı çengelli embriyo (onkosfer) bulunmaktadır. Onkosferi embriyofor denen birkaç katlı kılıf sarmaktadır. Bu zar oldukça kalın olup, yumurtaya ışınal çizgili bir görünüm vermektedir. Kabuk olarak da adlandırılan embriyofor keratin benzeri bir proteinden oluşan, geçirgen olmayan ve embriyoyu dış koşullardan koruyan en önemli tabakadır. Yumurtalar ışık mikroskobu ile köpekteki *Multiceps* ve *Taenia* yumurtalarından kesin olarak ayırt edilememektedir (Özdemir 2005; Ütük 2005; Erdinç 2010).



Şekil 1: *Echinococcus granulosus* yumurtası.

<http://www.angelfire.com/rock3/vetoben/hastaliklar.html> (Erişim tarihi: 26.06.2018)

#### 4.2.2. Metasestod (Larva) Form

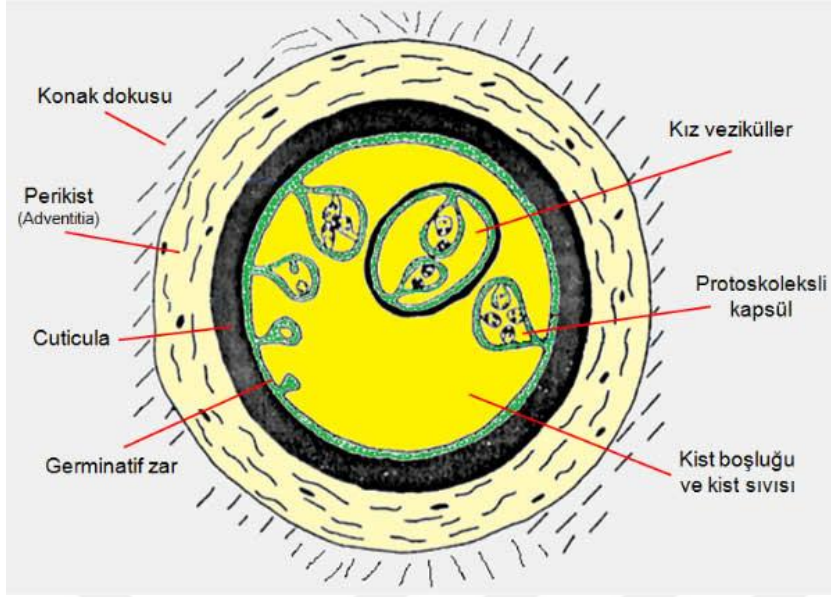
Metasestod, çimlenme kapsüllerini oluşturan, germinal tabakadan oluşmuş kese biçimindeki bir yapıdır. Protoskoleksler, çimlenme kapsüllerinin iç duvarlarından veya germinal tabakadan gelişirler. KE'e sebep olan metasestod, içi "kaya suyu" da

denen kist sıvısıyla dolu uniloküler bir küre biçimindedir. Bu kesenin duvarı dışta kütiküler (laminar), içte germinal olmak üzere iki farklı tabakadan oluşur. Ayrıca vücudun bu kiste karşı gösterdiği reaksiyon sonucu, en dışta kisti çevreleyen konağa ait bir fibröz adventisyal tabaka (perikist-fibröz kapsül) bulunur. Bazen kist koparak değişik ebatlarda kistler oluşturabilmektedir. İnsanda ise çok büyük kistler gelişebilir ve kistler içinde yavru veziküller görülebilmektedir.

Sonuç olarak bu larva tipi:

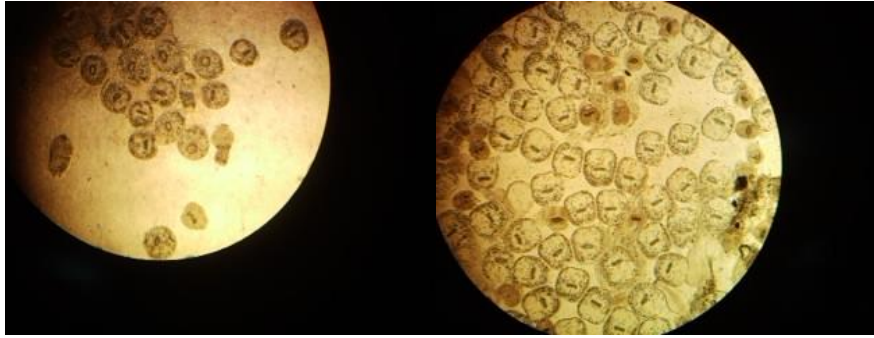
1. Dışta kütiküler tabaka,
2. İçte germinal tabaka,
3. Germinal tabakaya bağlantılı skoleksler
4. Germinal tabakadan kopmuş serbest yüzen skoleksler (protoskoleksler),
5. Germinal tabakaya bağlantılı üreyici kapsüller,
6. Germinal tabakadan kopmuş serbest yüzen üreyici kapsüller,
7. Serbest üreyici kapsüllerin gelişmesi sonucu meydana gelen kız keseler ve
8. Kist sıvısından ibarettir.

Yaşlı (eski) kistlerin içerisinde kız keseler, serbest protoskoleksler, üreme kapsülleri kist sıvısında bir arada bulunur ve “hidatid kumu” olarak adlandırılır. Renksiz, kokusuz ve yüksek oranda antijenik özelliktedir. Hidatik sıvıya “kaya suyu” da denilmekte olup pH’sı 7,2 -7,4 arasında ve hafif baziktir. Hidatik kist sıvısı parazitin oluşturduğu steril bir sıvıdır (Özdemir 2005; Çelik 2006; Altıntaş 2008).



Şekil 2: Metasestod (Larva) form

<http://www.drahmetdobrucali.com/wp-content/uploads/hidatik2.jpg> (Erişim tarihi: 10.12.2017)



Resim 1: Kist sıvısındaki protoskoleksler (×40) (Orijinal)

#### 4.2.3. Biyolojik Döngü

*E. granulosus*'un gelişiminde ormansal (silvatic) ve kırsal (pastoral) olmak üzere iki biyolojik döngü vardır:

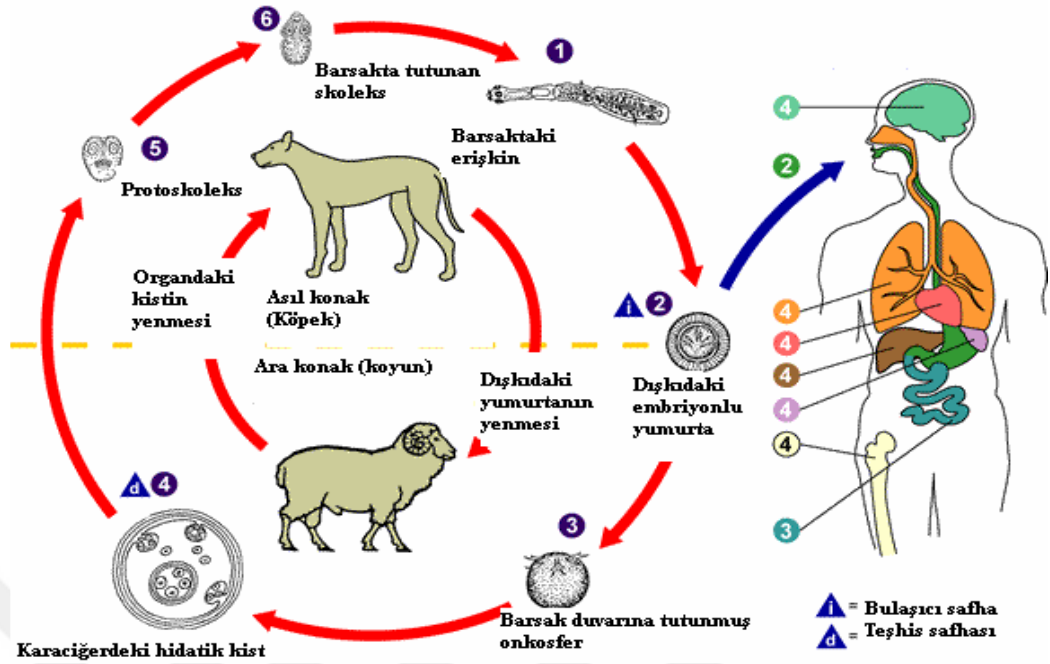


**Ormansal döngü:** kurt, çakal, tilki gibi yabani karnivorlar ile geyik, karaca gibi yabani ruminantlar arasında gerçekleşir. *E. granulosus*'un orijinal formunu temsil ettiği düşünülen bu silvatik forma evcil ruminantlarda seyrek rastlanır. Bu formdaki insan enfeksiyonları çoğunlukla akciğerde lokalize olmaktadır.

**Kırsal döngü:** Köpek ile başta koyun olmak üzere keçi, sığır, domuz, at gibi çeşitli evcil hayvanlar ve insanlar arasında görülmektedir. Bu kırsal popülasyon arasında önemli farklılıklar olduğu kaydedilmiştir (Altıntaş 2008).

*Echinococcus* türleri yaşam döngülerini tamamlayabilmek için iki memeli konağa ihtiyaç duyarlar. *E.granulosus*'un son konağı köpek veya köpekgiller, ara konağı ise koyun, sığır gibi otçul hayvanlar ve insanlardır. Ara konak olabilen bir çok memeli türüne enfeksiyon, yumurtaların ağız yoluyla alınmasıyla geçer. Yumurtalar şeritten koparak ayrılan halkayla veya halkanın daha bağırsakta iken parçalanmasıyla köpek vücudundan dışarı çıkar. Bu embriyonlu yumurtaları alan ara konakların mide ve ince bağırsaklarındaki enzimlerin etkisi ile açılarak embriyon serbest hale geçer.

Safra, ince bağırsak duvarına tutunan onkosferin etkinlik kazanmasına yardım eder. Daha sonra çengellerin hareketi ile embriyon sindirim sisteminin duvarını delerek kan damarları yoluyla karaciğere taşınır. Bir kısmı burada kalırken diğerleri akciğerlere, burada da tutunamayanlar böbreklere, dalağa, kaslara, beyine veya diğer organlara gidebilirler. Arakonak içinde yumurtadan çıkan “embriyo” ya da “onkosfer” yerleştiği organ üzerinde skoleksini kaybeder ve bir torba haline geçerek büyümeye başlar. Büyüme çok yavaş olup 40 günde 1 mm civarındadır. (Özdemir 2005; Gündoğdu 2005).



Şekil 3: *Echinococcus granulosus*'un hayat döngüsü

<https://etarim.net/hayvansal-uretim/kurbanliklarda-ki-bu-hastaliga-dikkat.html> (Erişim tarihi: 09.11.2015)

### 4.3. *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*' UN SUŞLARI

#### 4.3.1. 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. G1 genotipi, dünya çapında insan kistik ekinokokkozisinin büyük çoğunluğundan sorumludur (%88,44). (Alvarez ve ark 2014).

Dünyanın çeşitli bölgelerinden elde edilen örneklerin morfolojik, biyolojik ve moleküler tekniklerle incelenmesi sonucunda Avrupa ve komşu ülkelerindeki koyun suşunun aynı olduğu belirtilmiştir (Özdemir 2005). Son yapılan çalışmalarda bu suş

*E. granulosus sensu stricto* türü altına dahil edilmiştir (Eryıldız ve ark. 2012; Kınkar ve ark 2016; Gökpinar ve ark. 2017; İto ve ark. 2017).

#### **4.3.2. 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 göstermektedir (Ütük 2008). En son yapılan taksonomik çalışmalarda ise bu tür *E. granulosus sensu stricto* türü altına dahil edilmiştir (Eryıldız ve ark. 2012; Gökpinar ve ark. 2017; İto ve ark. 2017).

#### **4.3.3. 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 iki segmente sahip olmasıdır (Ahmadi 2002; Ütük 2008). Araştırmacıların günümüze dayanan genetik çalışmalarında bu tür de G1 ve G2 türünde olduğu gibi *E. granulosus sensu stricto* türüne dahil edilmiştir (Eryıldız ve ark. 2012; Gökpinar ve ark. 2017; İto ve ark. 2017).

#### 4.3.4. At Suşu (G4)

At suşunun morfolojisi, biyolojisi, fizyolojisi, biyokimyası, metabolizması, moleküler biyolojisi, konak spesifitesi ve epidemiyolojisi detaylıca çalışılmış ve diğer suşlarla karşılaştırılmıştır. Günümüzde at suşunun Avrupa, Ortadoğu, Güney Afrika, Yeni Zelanda ve Amerika'da bulunduğu bilinmektedir. Bu suşun son konağı köpeklerdir. Ancak kızıl tilkilerin de hastalığın yayılmasında rolünün olabileceği iddia edilmektedir. Ara konak spektrumu oldukça dar olup, yalnızca tek tırnaklılar ile sınırlıdır. Günümüze kadar insanları enfekte eden at suşuna rastlanmamıştır (Alvarez ve ark 2014). Atlarda metasestodların en çok yerleştiği organ karaciğerdir (Ütük 2008). Bu tür, son çalışmalarla *Echinococcus equinus* olarak isimlendirilmiştir (Eryıldız ve ark. 2012; Gökpınar ve ark. 2017; İto ve ark. 2017).

#### 4.3.5. Sığır Suşu (G5)

Rausch 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 farklı bir tür olarak adlandırılması yönünde öneriler dikkate alınmış ve taksonomik çalışmalar sonunda bu şekilde adlandırılmıştır. (Eryıldız ve ark. 2012; Gökpınar ve ark. 2017; İto ve ark. 2017).

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 (Ütük 2008).

#### 4.3.6. 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 çengellerinin 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 (Ütük 2008). Yapılan taksonomik düzenlemeler ile bu tür, *Echinococcus canadensis* (G6, G7, G8 ve G10) türüne dahil edilmiştir (Eryıldız ve ark. 2012; Gökpınar ve ark. 2017; İto ve ark. 2017).

#### 4.3.7. 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 desteklenmiştir. 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 (Ütük 2008). Bu tür, günümüzde *Echinococcus canadensis* (G6, G7, G8 ve G10) türüne dahil edilmiştir (Eryıldız ve ark. 2012; Gökpınar ve ark. 2017; İto ve ark. 2017). *Echinococcus canadensis* içinde yer alan G7 suşunun dünya üzerindeki yaygınlığının *E.granulosus sensu stricto*’ya kıyasla nispeten sınırlı olduğu, daha çok Orta ve Doğu Avrupa’da yaygın olduğu anlaşılmıştır. Domuz suşu olarak da bilinen G7’nin insanı enfekte eden en yaygın ikinci suş olduğu belirlenmiştir (Gökpınar ve ark 2017). G7 genotipinin, Doğu Avrupa ülkelerinde parazitin domuzlarla bulaştığı ve kistik ekinokokkozis vakalarının %3.73’ünden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Alvarez ve ark 2014).

*E.granulosus* içindeki genetik varyasyona ilişkin bilgiler kullanılarak parazite ait mitokondriyal cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) geninin 366 bp bölgesi ile NADH dehidrogenase subunit 1 (nad1) geninin 471 bp bölgesindeki farklılıklar temel alınarak başlangıçta yedi farklı genotip belirlenmiştir. Son yıllarda yapılan

çalışmalarla *E.granulosus*'un G1-G10 arasında genotipi tanımlanmış ve beş ana tür altında toplanmıştır. Bunlar: *E. granulosus sensu stricto* (G1, G2 ve G3), *Echinococcus equinus* (G4), *Echinococcus ortleppi* (G5), *Echinococcus canadensis* (G6, G7, G8 ve G10) ve *Echinococcus felidis*'dir (İto ve ark. 2017; Ahn ve ark 2017).

#### 4.4. EPİDEMİYOLOJİ

Kistik ekinokokkozis, dünyanın birçok ülkesinde özellikle koyun ve sığır yetiştiren ülkelerde yaygın olan ve insan toplulukları için önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturan paraziter hastalıktır. Bu enfeksiyonun yüksek prevalansı ülkelerin yetiştirdikleri koyun-keçi sürülerinin çokluğuna bağlıdır. Ayrıca bu yüksek prevalansta insan-köpek arasındaki zincir de oldukça önemlidir (Özdemir 2005, Sırmalı 2005). KE'nin en sık yerleşim yeri karaciğerdir (%60-70). Burada tutunamazsa akciğerlere (%20-25) geçer, ardından sistemik dolaşıma katılarak herhangi bir organa ulaşabilir (%10). Yerleştiği organda hidatik kist oluşturur. Akciğerde sıklıkla sağda ve alt loblarda yerleşir. Akciğerlere ulaşma hematogen, lenfatik, transdiyafragmatik ve nadiren inhaler yolla olabilir.

Dünyanın pek çok bölgesinde farklı ara ve son konaklarda *E.granulosus*'un genotiplendirilmesine ilişkin çalışmalar mevcuttur. Türkiye'nin de yer aldığı Akdeniz havzasında ara konaklarda G1-G3 genotipi yaygın olarak görülmektedir. Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinde değişik arakonaklardan elde edilen *E.granulosus* izolatlarının moleküler yöntemlerle genotiplendirilmesine ilişkin çalışmalarda koyun, yabani koyun (muflon), sığır, keçi, deve, manda ve ata G1-G3, katırda G4 (18), insanda ise G1-G3 ve G7 suşu tespit edilmiştir. (Gökpmar ve ark. 2017). Ülkemizde her bölgede bulunabilmektedir. Prevalansın 100 000'de 50, insidansın ise 100 000'de iki civarında olduğu tahmin edilmektedir (Altıntaş 2004; Yıldız ve ark.2010).

Hastalığın epidemiyolojik yönden incelenmesinde şu özellikler önemlidir;

#### 4.4.1. Kişi Özellikleri

**a) Yaş:** Kistik ekinokokkozis, her yaşta görülebilmekle birlikte esas olarak erişkin yaş grubunun hastalığı olarak bilinmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda kistik ekinokokkozisli hastaların yaşları üç ile 70 arasında değişmekle birlikte, vakaların çoğunun 20-44 yaşları arasında olduğu belirtilmiştir (Eroğlu ve ark. 2016; Khachatryan 2017).

**b) Cinsiyet:** Kistik ekinokokkozis, hem erkek hem de kadında görülebilen bir hastalıktır. Kadınlarda daha sık görülür (Yılmaz ve Babür 2007; Eroğlu ve ark. 2016; Khachatryan 2017).

**c) Meslek:** Kistik ekinokokkozis hayvanların ve insanların ortak hastalığı olduğu için ve hastalığın kaynağı hayvanlar olduğu için hayvancılıkla ilgili işlerde çalışanlarda daha sık görülmektedir.

**d) Etnik grup:** Köpek beslemenin yaygın olduğu yerlerde Kistik ekinokokkozis prevalansının yüksek olduğu bilinmektedir. Çoğu müslüman ülkelerde Kistik ekinokokkozis yaygındır çünkü kontrolsüz hayvan kesimi (kurban, adak) yaygındır. Bu kesimlerde hayvanların iç organları belli bir denetimden geçirilmeksizin ortama bırakılabilmekte ve dolayısıyla parazitin yaşam döngüsüne katkıda bulunmaktadır.

**e) Eğitim, sosyo-ekonomik düzey:** Kist hidatik hastalığı daha çok düşük sosyo-ekonomik düzeydeki ve eğitimi az olan toplumlarda görülmektedir. Bu özellik kişilerin meslekleri ile ilgili olabileceğı gibi, hastalığa karşı koruyucu önlemlerin yeterince alınmaması sonucu da olabilir.

#### 4.4.2. Kistik Ekinokokkozis'in Bulaşma Yolları

*E. granulosus*'ta köpek son konaktır. Son konakta erişkin şerit sayısı fazladır. Her gün bir şerit halkası dışkı ile atılmakta olup, her halkanın 400-1000 yumurta içerdiği kabul edilmektedir. Yumurtalar nemli ortamda bir yıl kadar canlı kalmaktadır. Yumurtalar ara konakta geliştiklerinde kist sayısı ve kistlerdeki protoskoleks sayısı fazladır. Bu ise son konakta parazit sayısının fazla olmasını sağlar (Özdemir 2005).

Çevre koşulları da bulaşma sıklığını belirler. Yörelere ve ülkeler arasında kontrolsüz hayvan besleme ve kesim yapma faaliyetlerinin enfeksiyonu yaymada önemli rolü vardır. Mezbahalarda, hayvan kesimlerinin koşullara uygun yapılması ve sakatatların köpeklere atılmaması gerekmektedir. Evlerin bahçelerinde kesilen kurbanlarda da bu durum aynıdır. Bunun için derin çukurlar açılmalıdır ve özellikle kistli organlar uygun yöntemlerle gömülmelidir (Özdemir 2005; Çelik 2006; ).

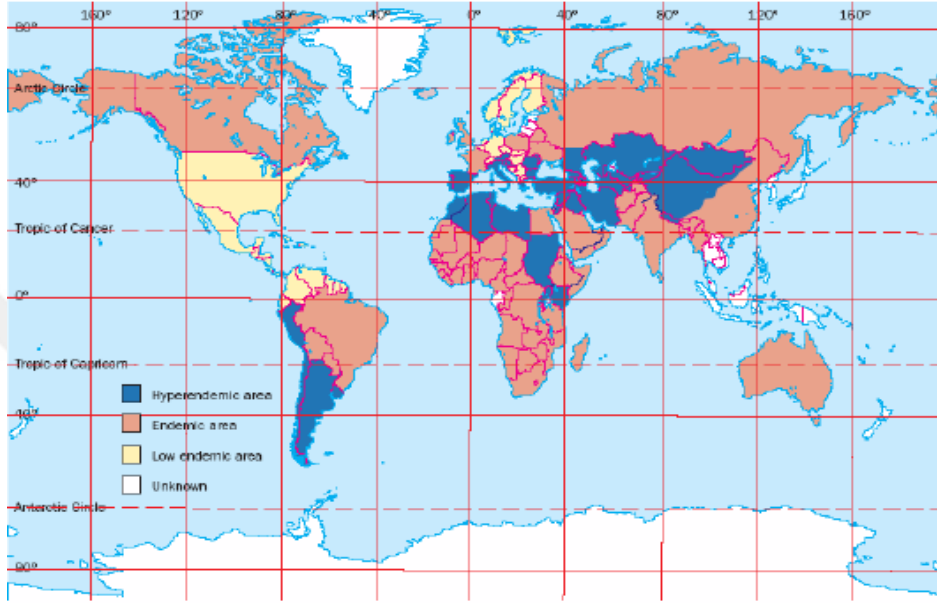
#### 4.4.3. *E. granulosus*'un Yaygınlığı

Dünyada:

Parazit prevalansının en yüksek olduğu bölgeler Avrasya, Afrika, Avustralya ve Güney Amerika'nın bazı bölgeleridir. Enfeksiyonun endemik olarak görüldüğü bölgelerin yanında sporadik olarak da saptanabildiği, Grönland ve İzlanda'da ise parazite hiç rastlanmadığı bildirilmiştir. 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 (Özdemir 2005; Çelik 2006).



Şekil 4: Kistik ekinokokkozisin Dünyadaki yaygınlığı (Eryıldız 2010).

Türkiye’de:

Hidatik kist hastalığı prevalansı Türkiye’nin çeşitli bölgelerinde farklılıklar göstermektedir. Bu durum kırsal-kentsel dağılımın farklılığından kaynaklanmaktadır. Kırsal bölgedeki mevcut çevre koşulları parazitin yaşam döngüsünü tamamlayıcı özelliklere sahip olduğu için bu bölgelerdeki hastalığın yaygınlığı daha fazladır (Özdemir 2005; Çelik 2006).

Ülkemizde KE’e, veteriner kontrolünde olmayan sokak köpeklerinin yaygınlığı ve gerekli önlemlerin alınmaması nedeniyle oldukça sık rastlanmakta, verilerin büyük çoğunluğu hastane kayıtlarına dayanmaktadır. KE, ülkemizin birçok bölgesinde görülmesine karşın, AE soğuk iklimli ve çok yüksek yerleşimli doğu bölgelerimizle sınırlı kalmaktadır (Çelik 2006).

Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1987 ve 1994 arasında, hastanelerde 21303 KE vakası bulunmuştur. Yıllık ortalama ise 2663 olarak tespit edilmiştir. Yaklaşık 61 milyon nüfusta, ortalama yıllık insidans 100 000'de 4,4'tür. Yapılan bir çalışmada ise Türkiye'de 2001-2005 yılları arasında toplam 14789 KE olgusu bildirilmiştir (Eryıldız 2010).

## 4.5. EKİNOKOKKOZİS'İN KLİNİĞİ

### 4.5.1. Klinik Belirtiler

Kistik ekinokokkozisin çok geniş olmayan klinik bulgu ve belirtileri vardır. Klinik tablo çok farklı olabildiği gibi her yaşta ve her oranda görülebilmektedir. İyi huylu veya ağır bir hastalık olabilir ya da kronik, subakut veya bazen acil tedavi gerektirebilir. Endemik olmayan bölgelerde çok zayıf klinik şüphe uyandırır. Bunların doğruluğu ancak görüntüleme teknikleri ve seroloji ile onaylanır (Özdemir 2005).

İnsanlarda kistin başlıca yerleşim yerleri karaciğer (%66) ve akciğerdir (%22). Kistlerin daha az görüldüğü doku ve organlar ise kemik (%2), böbrek (%3), beyin (%1), kalp, dalak, kas ve tiroid (%6) olarak sıralanmaktadır. Kist oluşumunun başlangıç döneminde kistler genellikle sessiz seyretmekte ve 5 cm çapa ulaşincaya kadar herhangi bir belirti vermemektedir. Ayrıca yaş, immun sistemin durumu, konağa ait diğer hastalıklar ve parazit süşuna bağlı olarak patolojik seyrin değişebildiği gösterilmiştir (Çelik 2006; Khachatryan 2017).

KE'de kist yapısı genelde unilokülerdir. Nadiren multiveziküler de olabilir. Uniloküler form büyüdükçe içinde çok sayıda kız veziküller oluşturur. Kistler basınca bağlı olarak üst abdominal bölgede ağrı, hepatomegali, safra salgısında azalma, bilier siroz, Budd-Chiari Sendromu, portal hipertansiyon ve asiditeye yol açabilir. Akciğerde yerleşim gösteren olgularda kronik öksürük, balgam, dispne, göğüs ağrısı, hemoptizi görülebilir. Kist enfekte olursa akciğer absesi gelişir. Klinik muayene tek başına yeterli değildir. Eğer bazı olgularda karaciğer büyümesi ve

eozinofili saptanmışsa “tipik” bir hastalık özelliği yoktur. Böyle hastalar genelde 30-50 yaşlarında, endemik bölgelerde yaşayan veya o bölgeden gelen, nispeten genel sağlık durumu iyi fakat kronik abdominal ağrı, huzursuzluk ya da pulmoner distressi olan kişilerdir (Özdemir 2005; Çelik 2006; Ahmadi 2006).

Hastalık çoğu kez asemptomatik seyreder. Semptomlar çoğunlukla kistin yerleşimi veya büyüklüğüne bağlıdır. En tanısal semptom kist sıvısı veya membranlarının dışarı atılmasıdır. Bu, kistin delindiği anlamına gelir. Perforasyon sonrası hastanın genel durumu bozulabilir (Erdinç 2010).

#### **4.5.3. Kistik Ekinokokkozis Tanısı**

Günümüzde KE'nin tanısında radyolojik ve serolojik yöntemler kullanılmaktadır. KE'li olguların yaklaşık %65'inin bulgu vermemesi nedeniyle genellikle başka hastalıklar araştırılırken tesadüfen saptandığı ve özellikle erken tanı konulmadığında hayati organlara yaptığı doku hasarı ve komplikasyonlarla ciddi sağlık sorunları oluşturarak hastaların %1-2'sinin ölümüne yol açtığı bildirilmektedir (Ertabaklar 2012).

Khachatryan, 2017'de yaptığı epidemiyolojik araştırmada 10 ayrı yaş grubunda 1470 hasta incelemiş ve bunlarda morbidite/mortalite oranlarını göstermiştir. Çalışma sonuçlarına göre; hastalığın en çok 50-59 yaş grubunda ortaya çıktığı daha sonra sıklığın 60-69 yaş ve 11-16 yaşları arasındaki kişilerde görüldüğü belirtilmiştir. Hastalığın 11-16 yaş grubunda ise en hızlı ilerlediği belirtilmiştir. Bu durum hastalığın yedi yaş altında nadir görüldüğünü düşündürmüştür. Çalışmada yer alan en küçük çocuk ise üç yaşındadır. Beş hastada (%26,3 ) parazitik kistin spontan rüptürü sonucu ölüm tespit edilmiştir. Bu hastalardan ikisinde kist içeriğinin karın boşluğuna dökülmesi nedeniyle anafilaktik şok gelişmiştir. Üç hastada ise peritonit, plörezis ve kalp zarı iltihabı gibi septik komplikasyonlar tespit edilmiştir. Örneğin 15 yaşındaki bir kadın hasta yemek sırasında aniden bilincini kaybetmiş ve hastaneye giderken hayatını kaybetmiştir. Yapılan otopside hastanın sağ akciğerinde dev bir rüptüre kist saptanmıştır.

Hastalardan beşi kist sıvısından enfeksiyon kaparak ölmüştür. Dokuz yaşındaki bir hasta karaciğer yetmezliğinden hayatını kaybetmiştir. Ani ölümlerin diğer nedenleri kalp lezyonlarıdır (Khachatryan 2017). Çalışma KE’de erken tanı ve zamanında hastaneye yatışın ölüm vakalarının azlatılmasında çok önemli olduğunu göstermiştir. Ayrıca semptomların iyi ayırt edilmesi ve hastalık hakkında yeterli bilgilendirmenin yapılması da ölüm vakalarının önüne geçilmesinde önemli rol oynamaktadır.

Kistik ekinokokkozis tanısında ;

- Epidemiyolojik veriler
- Klinik belirtiler
- Görüntüleme yöntemleri
- Direkt tanı yöntemleri
- Serolojik yöntemler
- Moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır (Yılmaz 2007).

#### **4.5.3.1. Görüntüleme yöntemleri**

##### **4.5.3.1.1.Ultrasonografi (USG)**

Günümüzde KE, USG sırasında ortaya çıkmaktadır. Fakat USG’nin çok üretken bir teknik olmadığı ve sonucun kullanıcıya, alete ve hastaya bağlı olduğu, ayrıca KE’in ayırıcı tanısında teknik yetersizlikleri bulunduğu gerçektir (Özdemir 2005; Çelik 2006).

1970’lerin sonlarında USG’nin ortaya çıkışı ile karaciğer kistlerinin saptanması ve nadir non-parazitik kistlerden (retansiyon kistleri, proliferatif lezyonlar ve konjenital lezyonlar) ve malign, inflamatuvar dejeneratif ve travmatik psödökistlerden ayırıcı tanısı biraz daha kolaylaşmıştır. Günümüze kadar KE’in USG görüntüsü ile ilgili farklı sınıflandırmalar yapılmıştır, fakat genel bir fikir birliği vardır (Özdemir 2005; Çelik 2006).

**Uniloküler kistik lezyon (CL) :** Uniform anekoik kist içeriği mevcuttur. Kist duvarı görölmez ve kesin bir şekilde sınırlanmamıştır. Ayırıcı tanı yoktur (Özdemir 2005; Ahmadi 2006).

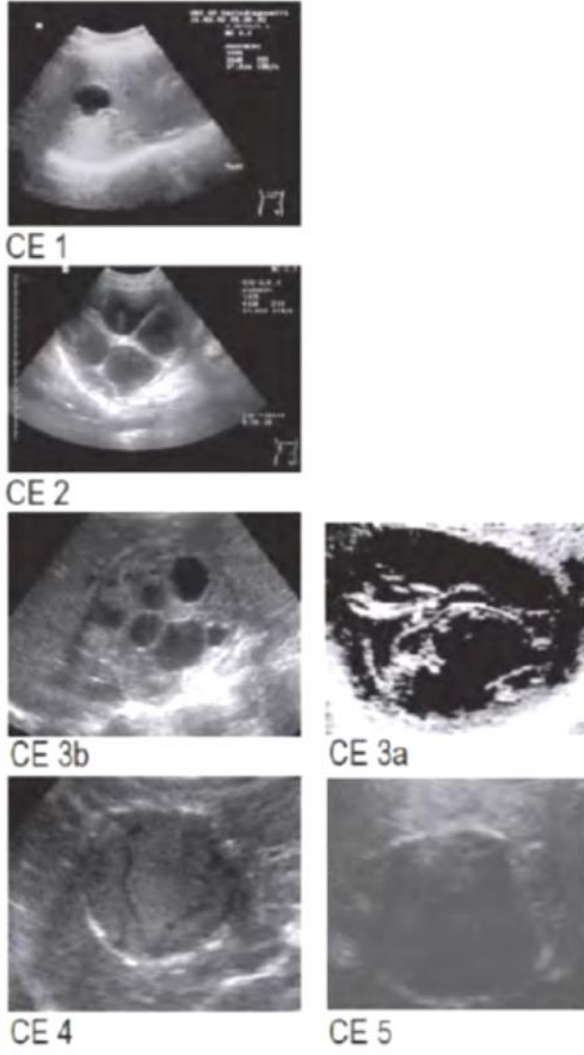
**Tip CE1:** Uniform anekoik kist içeriği olan uniloküler kist vardır. Kist duvarı görölür. Yuvarlak ya da ovaldir. Aktiftir. USG patognomiktir (Özdemir 2005).

**Tip CE2:** Multiveziküler, multiseptalı kist vardır. Multiseptalardan ve kız keselerden dolayı tekerlek benzeri veya bal peteği görünümündedir. Kist duvarı görölür. Yuvarlak ya da ovaldir. Aktiftir. USG patognomiktir (Özdemir 2005).

**Tip CE3:** Kız kistler içerebilen uniloküler kist vardır. Kist içi basıncın azalmasından dolayı yuvarlaklık azalmıştır. USG patognomiktir (Ahmadi 2002; Özdemir 2005).

**Tip CE4:** Heterojenik hipoeoik ya da hiperekoik değişiklik vardır. Kız vezikül yoktur. Dejenere membrandan dolayı yün görünümü olabilir. İnaktiftir. Çoğunda protoskoleks yoktur. Patognomik değildir (Ahmadi 2002; Özdemir 2005).

**Tip CE5:** Kist kalın kalsifiye duvarla karakterizedir. Koni şeklinde bir gölge vardır. Kalsifikasyon tam ya da kısmi olabilir (Özdemir 2005).



**Şekil 5: Kist tiplerinin ultrasonografik görüntüleri**

(Meeting Of The Who Informal Working Group On Echinococcosis (WHO-IWGE)  
Who Headquarters, Geneva, Switzerland 15–16 December 2016)

#### **4.5.3.1.2. Bilgisayarlı tomografi (BT)**

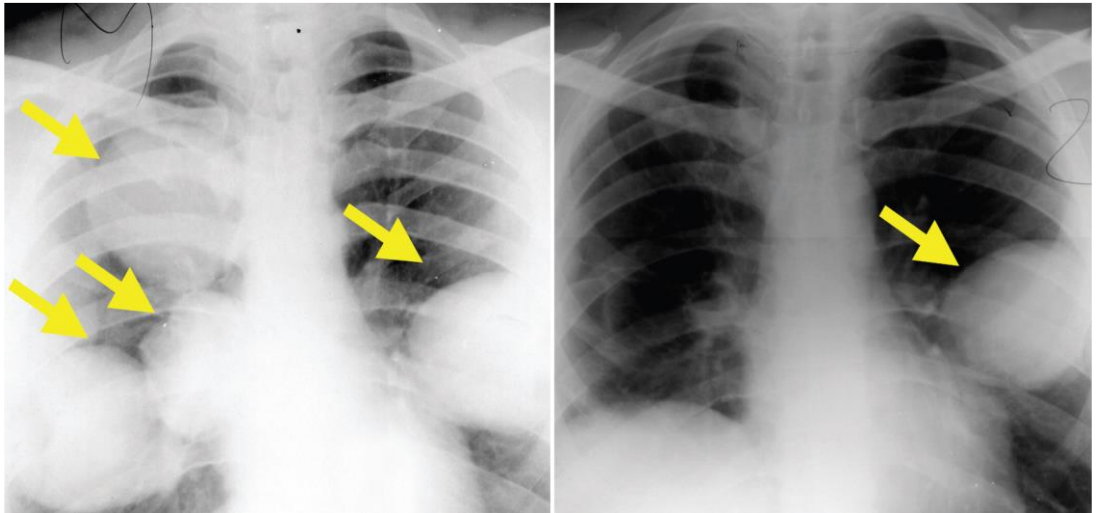
1970'lerin sonlarından beri KE'in tanısında kullanılmaktadır. Bilgisayarlı tomografi; herhangi bir organı izleme olanağını sunması, daha küçük kistleri saptaması, boyutlarını ölçmesi, kisti kesin lokalize edebilmesi ve parazitik kist oluşumlarını parazitik olmayanlardan daha kolay ayırt edilebilmesi özellikleri nedeniyle USG'ye oranla daha üstündür. Ancak BT yüksek maliyeti nedeniyle bazı endemik ülkelerde kısıtlı kullanılmaktadır (Özdemir 2005; Altıntaş 1999)

#### 4.5.3.1.3. Manyetik rezonans (MR)

Ameliyat sonrası residüel lezyonların, nükslerin ve ekstrahepatik infeksiyonların değerlendirilmesinde iyi bir görüntüleme yöntemidir. Bu olgular dışında kullanımı oldukça azdır. BT veya USG'den daha üstün olmadığı bildirilmektedir. Rutinde kullanılan MR görüntüleme sekansları ile tip 1 hidatik kistlerin basit kistlerden yeterli derecede ayırt edilemeyeceği belirtilmiştir (Çelik 2006; Oruç 2010).

#### 4.5.3.1.4. X-ray muayeneleri

Akciğer KE'inde ve sporadik olarak herhangi bir yerdeki kalsifiye lezyonları belirlemede önemli bir yöntemdir. Anjiyografi, intravenöz veya perkütan kolanjiografinin, günümüzde yerini endoskopik retrograd kolanjiopankreatografi (ERCP)'ye bıraktığı düşünülmektedir (Çelik 2006).



Şekil 6: Akciğerdeki kistin X-Ray görüntüsü

<http://www.solunum.org.tr/solunum2009/poster/html/EP-158.html> (Erişim tarihi: 08.12.2017)

#### 4.5.3.2.Serolojik yöntemler

**4.5.3.2.1. Casoni deri testi:** İlk kez 1912 yılında Casoni tarafından kullanılan Casoni deri testinde derinin içine insan veya hayvan kökenli steril kist sıvısı verilmektedir. Her ne kadar bazı araştırmacılar kist hidatik olgularının %85-95 'inde Casoni testini pozitif bulduklarını bildirseler de bu intradermal test olgularının %56-65'inde pozitif çıkmaktadır. Akciğer kistlerinde ise Casoni pozitifliği %50 civarındadır. Bununla beraber Casoni test sonuçlarının değeri düşüktür. Çünkü testte kullanılan antijenin yüksek azot ve protein konsantrasyonuna sahip oluşu ve kan grubu maddeleri açısından zenginliği nedeniyle %30-40'a varan yalancı pozitiflik ile karşılaşmaktadır. WHO'nun önerisiyle uzun yıllardır kullanılmamaktadır (Erdoğan 2010).

**4.5.3.2.2. Kompleman birleşmesi:** (Weinberg testi) İlk kez 1906 yılında Ghedini tarafından kullanılmıştır. Bağışık serumdaki antikor, ekinokok antijeninin varlığında komplemanı bağlamaktadır. Weinberg testi tüm kist hidatik olgularının %62'sinde, akciğer kistli olguların ancak %32-38 'inde pozitif çıkmaktadır. Weinberg testinde antijenin standardize edilmesinde bazı problemler vardır. Hidatik kist sıvısındaki bazı bileşikler doğrudan kompleman aktivasyonuna yol açtığından yanlış pozitiflik sıktır. Testin özgüllüğü %77-78 düzeyindedir (Altıntaş 1999).

**4.5.3.2.3. Lâteks aglütinasyon testi:** İlk kez 1960 yılında kullanılan bu testte ekinokok antijenleri ile kaplanmış lâteks partikülleri kullanılmaktadır. Hasta serumu ile karşılaşan lâteks partikülleri on dakikada çökmektedir. Test daha çok pratikliği nedeniyle seroepidemiolojik çalışmalar için kullanılmıştır. Testin duyarlılığı %83, özgüllüğü ise %94'dür (Altıntaş 1999).

**4.5.3.2.4. İndirekt hemaglütinasyon testi (IHA):** Testte tannik asitle duyarlılaştırılmış eritrositlerin yüzey gerilimlerinin değişmesi sonucu antijen tutma özelliklerinden yararlanılmaktadır. Antijen ile kaplı koyun eritrositleri hasta



serumuyla karşılaştınca çökmektedir. IHA ilk kez 1957 'de Garabedian ve arkadaşları tarafından kullanılmış, 16 hasta olgunun 13 'ünde (%81) pozitif bulunmuştur. Testin duyarlılığı genellikle %80-94 arasında değişmekle beraber %54, %56 veya %65 gibi düşük duyarlılık oranı bulunan çalışmalar da mevcuttur. Bununla beraber testin özgüllüğü %92-100 arasında değişmektedir (Altıntaş 1999).

**4.5.3.2.5. İndirekt immünofluoresan test (IFAT):** Fluorescein izosiyanat, fluorescein izotiyosiyanat veya Rodamin B200 gibi fluoresans verici maddelerle işaretlenmiş antikor, antijen ile bağlanınca fluoresan mikroskop altında görülebilir hale gelmektedir. Pozitif preparatlar sarı-yeşil fluoresans vermektedir. Kist hidatik tanısında IFAT 'ı ilk kez 1964 yılında Azevedo ve Rombert kullanmıştır. Testin duyarlılığı %90-98, özgüllüğü %95-98 civarındadır (Altıntaş 1999).

**4.5.3.2.6. ELISA:** ELISA testinde polistren plaklara emdirilmiş antijen molekülleri ve antiimmünoglobulin eklenmiş renksiz enzimin bulunduğu ortama hasta serumu dökülür. Serumda antikor varsa antijen-antikor-anti-immünoglobulin kompleksi oluşur ve enzim kromojen madde bağlı substrat ile birleşir. Test spektrofotometre ile değerlendirildiğinde absorbans ölçümleri baz alınır ve belli bir eşik değer (cut-off) üstü pozitif olarak kabul edilir. ELISA sonucu çıplak gözle değerlendirilebilir (Altıntaş 1999; Köksal 2004).

**4.5.3.2.7. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE):** Bu teknikle mikroorganizma protein ekstraktlarının molekül ağırlıklarına göre migrasyonel ayırtırmaya tabi tutularak fraksiyone edilmeleri sağlanır. Bu yöntem bir yandan antijenik profillerin tespitine imkân sağlarken, diğer yandan fraksiyonların nitroselüloz asetat membrana kopyalanarak immobilize edilmeleri ve bu fraksiyonlara karşı hasta serumunda oluşmuş antikorların tespitine de imkân vermiştir.

**4.5.3.2.8. Ko-aglütinasyon:** Serumda ekinokok antijeninin olup olmadığını gösteren bir testtir. Testte IgG'nin Fc kısmını, taşıdığı A proteini ile bağlayabilen *Staphylococcus aureus Cowan I* suşu kullanılır. Tavşanlar işlenmemiş kist sıvısı ile immünize edildikten sonra serumları alınır ve anti-ekinokok antikorları içeren hiperimmün serum üretilmiş olur. Mueller- Hinton agarda üretilen *S. aureus Cowan I* suşu formalin veya ısıyla öldürülüp hiperimmün seruma maruz bırakılır. Bu seruma eşit miktarda hasta serumu dökülünce mikroskopta bakterilerin küme küme yığıldıkları görülür. Test ucuz ve kullanılan materyal ısıya dayanıklıdır. Testin duyarlılığı %95, özgüllüğü %84'dür (Çelik 2006).

#### **4.5.4.Kist Hidatikte Tedavi**

Tedavi; cerrahi tedavi, Perkütan Aspirasyon İnjektasyon Reaspirasyon (PAIR) ve medikal tedavi olmak üzere üç şekilde yapılabilir. Bazı durumlarda bu tedaviler kombine şekilde de uygulanabilir. Antihelmintik tedavinin, 7 mm çaptan küçük, izole kistler için minimal adventisyel tabakanın olması durumunda etkili olduğu bildirilmektedir. Komplike, yavru kistleri olan veya kalsifiye, kalın adventisyel tabakalı kistlerde ise ilaçla tedavinin daha az etkili olduğu görülmektedir (Çelik 2006).

Hastalığın kontrolü açısından önemli noktalardan bir tanesi metasestodlara karşı etkin kemoterapotiklerin geliştirilmesidir. Ancak metasestodlara karşı etkin kemoterapotiklerin bulunmaması nedeniyle en radikal tedavi kistlerin cerrahi müdahale ile uzaklaştırılmasıdır (Ahmadi 2006).

#### **4.5.4.1. Cerrahi tedavi**

İnsanda KE için esas olarak cerrahi tedavi (drenaj, kistektomi veya karaciğer rezeksiyonu) birinci seçenektir. Özellikle rüptür ve süper enfeksiyon gelişen kist hidatikte kesin tedaviye gitmede ilk tercihtir. Operasyon esnasında mortalite %3-5 dir. Cerrahinin başarısının; kistin sayısı, büyüklüğü, organ yerleşimi, kistlerin

durumu ve hastanın genel durumuna bağılı olarak değiştiği bildirilmektedir (Çelik 2006; Oruç 2010).

#### **4.5.4.2. Perkütan, Aspirasyon, İnjesiyon, Reaspirasyon (PAIR)**

PAIR, Perkütan, Aspirasyon, İnjesiyon, Reaspirasyon kelimelerinin baş harflerinden oluşmaktadır. İlk olarak 1983 yılında uygulanmaya başlanmıştır. Kiste perkütan yolla girilip aspire edildikten sonra skolisidal ajanların verilip tekrar aspire edilmesi işlemidir. Skolisidal ajan olarak değişik ajanlar (hipertonik salin, ethanol, polidocanol) kullanılabilir. İşlemin kanama, diğer dokulara mekanik hasar, iltihap, kist sıvısının sızmasına bağılı allerjik reaksiyon ve anafilaktik şok, yayılıma bağılı sekonder ekinokokkozis, bilier fistül (ani kistik dekompresyona bağılı) gibi riskleri vardır (Köksal 2004).

#### **4.5.4.3. İlaçla tedavi**

Ameliyatın mümkün olmadığı durumlarda kemoterapi tek seçenektir. Bunlar omurga, pelvis gibi hayati organlar ile birkaç organda birden fazla sayıda kisti bulunan hastaları kapsamakta ve uzun süreli kullanımı gerekli kılabilir. Kist hidatik hastalığının tedavisinde Mebendazol, albendazol, flubendazol, thiobendazol, cambendazol gibi ilaçlar kullanılmaktadır. Bu grupta bulunan mebendazol ve albendazol'un etkisi diğer ilaçlara göre daha güçlüdür ve günümüzde kullanılan ilaçlar bunlardır. (Özdemir 2005, Altıntaş ve Doğanay 2009).

Eğer kistler kemikte yerleşmiş ise kemoterapi daha az etkili olmaktadır. Bugüne kadar 2000'nin üzerinde KE'li hasta tedavi edilmiştir. Kemoterapiye başladıktan itibaren 12 aylık bir süre içinde takibi yapılan hastalarda; %10-30 oranda kist tamamen kaybolmuş (şifa), %50-70 oranda kist dejenere olmuş ve/veya kist küçülmüş, %20-30 oranda ise kistte morfolojik bir değişiklik gözlenmemiş, tedavi edilememiştir. Kemoterapi genç hastalarda yaşlı hastalara oranla daha etkilidir. Aynı zamanda ince laminar tabakası nedeniyle küçük kistlere veya sekonder kistlere de kalın duvarlı kistlerden daha fazla etki etmektedir. Bu nedendir ki, kemoterapideki

problem yalnızca ilacın etkisine karşı metasetodun duyarlı olması değil, asıl önemli olan ilacın parazitin içinde planlanan kısma ulaşılabilirliğini geliştirmektir. Ancak ilaç tedavisinin bugünkü durumu ile cerrahi ve perkütan tedaviye seçenek olması pek olağan görülmemekte ve sınırlı hastalarda kullanılması gerekmektedir. Kemoterapi hastanın tedaviye yanıtına, klinik gelişimine, kistteki görünür hasara ve meydana gelebilecek karşıt reaksiyonlara bağlı olarak bireysel olmalıdır. Çünkü benzimidazole türevlerinin sıçanlarda teratojenik, insanlarda ise hepatotoksik ve genotoksik etkileri olabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır. WHO'nun 2001 yılında yayınlamış olduğu kılavuz kitaba göre 2000'in üzerinde hastanın tedavisinde kullanılmış olan iki benzimidazol türevi;

- Albendazole (ABZ) (Eskazole<sup>®</sup>, Zentel<sup>®</sup>; 400 mg tablet ve %4 süspansiyon, Smith Kline Beecham, İngiltere)
- Mebendazole (MBZ) (Vermox<sup>®</sup>; 500 mg tablet, Janssen Pharmaceutica, Belçika)'dür.

WHO tarafından önerilen oral kullanım şekli;

- Albendazole: 10–15 mg/kg/gün, ikiye bölünerek verilmesi. Erişkinlerde; 800 mg/gün iki kez 400 mg doz olup, 1 ay uygulandıktan sonra 14 gün ara verilmelidir. Tek yada multipl kistli hastalarda gerekiyorsa 3 yada 6 aylık bir süre kullanılması önerilmektedir. Ancak Çin'de yapılan çalışmalarda 3-6 ay hatta 2 yıla yakın bir süre sürekli tedavi uygulandığı ve yan etkilerde de bir artış gözlenmediği bildirilmiştir. Son yapılan karşılaştırmalı çalışmalar bu tedavi şeklinin mebendazole ile tedaviden daha etkili olduğunu göstermiştir.
- Mebendazole: 40-50 mg/kg/gün, üç bölünerek verilmesi. 3-6 ay süre ile uygulanması önerilmektedir. Hayvan deneylerinde *Echinococcus* metasetodlarına karşı MBZ'un etkinliğinin serum ilaç konsantrasyonu ve tedavi süresi ile doğrudan etkili olduğu gösterilmiştir. İnsanda ise MBZ ve ABZ'un serum ilaç düzeylerinin kişiden kişiye değiştiği ve oral doz ile ilacın etkisinin değişken olduğu görülmüştür. Yağlı yiyecekler yenildiğinde ilacın bağırsaklardan emilinde artış olduğu bildirilmiştir.

Praziquantel (PZQ) (Biltricide® , Bayer, Almanya), KE hastalarında benzimidazole'ler ile birlikte kullanılması önerilen bir heterosiklik pyrazinoisoquinoline derivativesidir. PZQ iyi tolere edilen, daha az toksik ve ABZ'den daha iyi abzorbe edilmektedir. Ameliyat esnasındaki sızıntıları önlemede PZQ kullanımı önerilmektedir. Hastaya operasyondan bir ay önce ABZ (10 mg/kg/gün) ve PZQ (25 mg/kg/gün) birlikte verildiğinde, ABZ'in yalnız verilmesine oranla cansız protoskolekslerin görülmesinde artış olduğu gözlenmiştir. Ancak yine de daha fazla çalışma yapılması gerekliliği vardır. (Altıntaş ve Doğanay 2009).

#### 4.5.5. Korunma ve Kontrol

Kistik ekinokokkozise karşı korunmada yalnız devletçe örgütlenilmiş, iyi planlanmış, sistemli, bilgili ve sürekli bir uygulamayla başarılı bir sonuç alınabilir. Bu koruma üç yönde yapılır:

- 1) İnsan ve evcil hayvanlara bulaşmayı önlemek,
- 2) İnsan ve evcil kesim hayvanları için bulaşım kaynağı olan köpeklerden bulaşmasını önlemek,
- 3) *Echinococcus granulosus*'un tamamen yok edilmesi (eradikasyon) (Özdemir 2005).

Kist hidatik sadece sağlık sorunu olarak kalmayıp, sağlıkla beraber milli ekonomiyi de olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle de sosyo-ekonomik bir sorun olarak ele alınmalı ve gerekli çözüm yolları üzerinde durulmalıdır (Özdemir 2005).

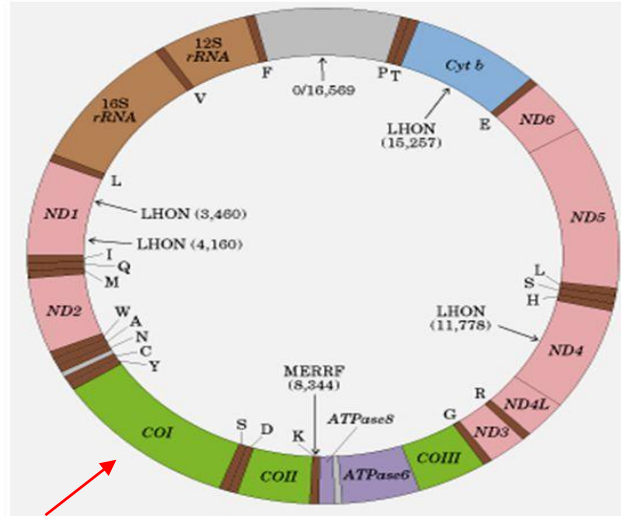
#### 4.6. *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS* SUŞLARININ GENOTİPLENDİRİLMESİ

*Echinococcus granulosus* suşlarının genotiplendirilmesi için yapılan moleküler epidemiyolojik çalışmalarda; PZR, PZR-RFLP, PZR-SSCP, RAPD-PZR, RT-PZR (QPZR), Nested PZR, Multipleks PZR, Reverse Transkriptaz PZR (RT-PZR)

Southern Blot, DNA Dizileme ve ddF (Dideoksi parmakizi) gibi birçok teknik kullanılmıştır. Yapılan mitokondrial COI ve NAD1 sekans çalışmalarına göre *Echinococcus granulosus*'un 10 farklı genetik tipi (G1-G10) tanımlanmıştır. Günümüzde ise bu genotiplerin bazıları aynı suş altında toplanmış ve beş suş belirlenmiştir (Eryıldız ve ark. 2012; Gökpınar ve ark. 2017; Ahn ve ark 2017).

### Mitokondriyal Cytochrome C Oxidase Subunit 1 (COI) Geni

Sitokrom c oksidaz, oksijenin suya indirgenmesini katalize eden solunum zincirinin bileşenidir. Alt birimler 1-3, enzim kompleksinin fonksiyonel çekirdeğini oluşturur. CO I, enzimin katalitik alt birimidir. Bu genin 366 bp'lık kısmı çeşitli moleküler yöntemlerle çalışılarak suş tayini yapılmaktadır.



Şekil 7: Mitokondriyal Cytochrome C Oxidase Subunit 1 (COI) Gen

([https://www.google.com.tr/search?q=Mitokondriyal+Cytochrome+C+Oxidase+Subunit+1+\(COI\)+Geni&rlz=1C1ASUT\\_enTR738TR738&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiKkZP42LDdAhWJL1AKHfbXDdoQ\\_AUICigB&biw=1366&bih=662#imgrc=NXqZG8hmF7tyvM:](https://www.google.com.tr/search?q=Mitokondriyal+Cytochrome+C+Oxidase+Subunit+1+(COI)+Geni&rlz=1C1ASUT_enTR738TR738&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiKkZP42LDdAhWJL1AKHfbXDdoQ_AUICigB&biw=1366&bih=662#imgrc=NXqZG8hmF7tyvM:)) (Erişim tarihi 10.09.2018)

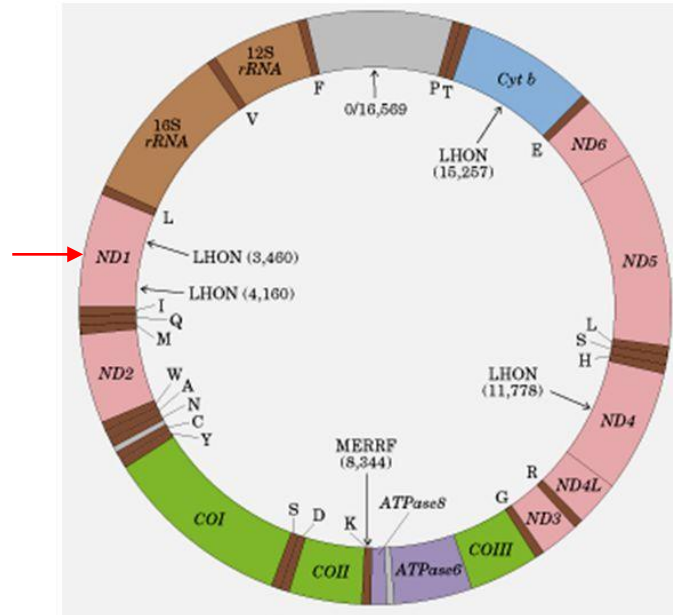
### NADH Dehydrogenase Subunit 1 (Nad1) Geni

MT-ND1 geni, NADH dehidrojenaz 1 adı verilen bir protein yapmak için talimatlar sağlar. Bu protein, mitokondride aktif olan kompleks I olarak bilinen

büyük bir enzim kompleksinin bir parçasıdır. Kompleks I, oksidatif fosforilasyon için gerekli olan birkaç enzim komplekslerinden biridir. Mitokondri içinde, bu kompleksler iç mitokondriyal membran denilen sıkı bir şekilde katlanmış, özel bir zar içine gömülüdür. Oksidatif fosforilasyon sırasında, mitokondriyal enzim kompleksleri ATP üretimini aktive eden kimyasal reaksiyonlar gerçekleştirir. Spesifik olarak, elektron adı verilen negatif yüklü parçacıkların adım adım transferi yoluyla iç mitokondriyal membranın her iki tarafında eşit olmayan bir elektrik yükü yaratırlar. Elektrik yükündeki bu fark ATP üretimi için enerji sağlar.

Kompleks I, elektron taşıma işleminin ilk aşamasından, NADH denilen bir molekülden elektronların “ubiquinone” denilen başka bir moleküle aktarılmasından sorumludur. Elektronlar daha sonra ATP'nin oluşumu için enerji sağlamak üzere diğer birkaç enzim kompleksinden ubikinondan geçirilir.

NADH dehidrogenase subunit 1 (nad1) geninin 471 bp bölgesindeki farklılıklar temel alınarak 7 farklı *Echinococcus* genotipi belirlenmiştir.

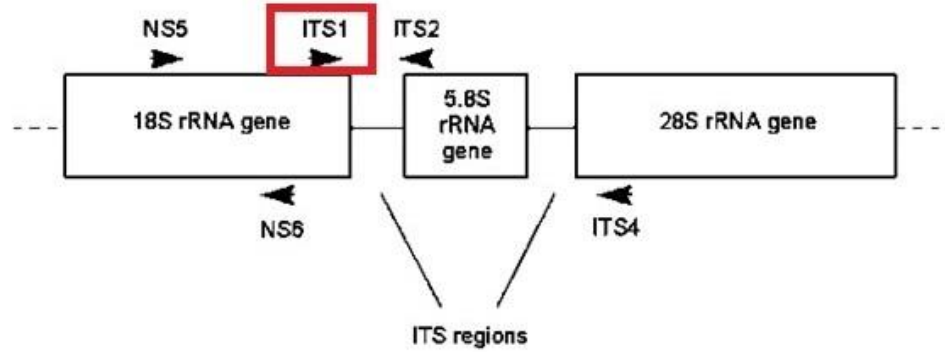


**Şekil 8: NADH Dehidrogenase Subunit 1 (Nad1) Geni**

([https://www.google.com.tr/search?q=Mitokondriyal+Cytochrome+C+Oxidase+Subunit+1+\(COI\)+Geni&rlz=1C1ASUT\\_enTR738TR738&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiKkZP42LDdAhWJL1AKHfbXDdoQ\\_AUICigB&biw=1366&bih=662#imgrc=NXqZG8hmF7tyvM:](https://www.google.com.tr/search?q=Mitokondriyal+Cytochrome+C+Oxidase+Subunit+1+(COI)+Geni&rlz=1C1ASUT_enTR738TR738&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiKkZP42LDdAhWJL1AKHfbXDdoQ_AUICigB&biw=1366&bih=662#imgrc=NXqZG8hmF7tyvM:)) ((Erişim tarihi 10.09.2018)

## Ribozomal Internal Transcribed Spacer (ITS1) Geni

Genomik DNA üzerinde rRNA'lar ardışık sıralı tekrarlar şeklinde olup tür içi seviyelerinde ileri derecede korunmuş gen bölgelerini oluşturmaktadır. Bu rRNA gen bölgelerine komşu olarak bulunan, özellikle 18S ve 5.8S arasındaki ITS1 ile 5.8S ve 28S arasındaki ITS2 gen dizileri rRNA gen bölgelerine oranla daha fazla nükleotid baz değişimi göstermektedir. ITS bölgelerinin yüksek oranda varyasyon göstermeleri taksonlar arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde, cinsler arasında ve tür seviyesinde taksonomik sorunların çözülmesinde tercih edilmesine nedendir. Ayrıca, bu moleküler markörler genoma bağlı olduklarından güvenilirler, tekrarlanabilir ve laboratuvarlar arasında standardize edilebilirler, genomda birden fazla bölgeyi belirleme imkanına sahiptirler ve çevre koşullarından etkilenmezler.



Şekil 9: Ribozomal internal transcribed spacer (ITS1) Geni

<http://www.fao.org/docrep/005/X4946E/x4946e0k.htm> (Erişim tarihi: 22.05.2018)

**4.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR):** Tekniğin prensibi, izole edilen veya patolojik materyalde bulunan hedef genetik materyallerin (DNA, RNA), spesifik kısa zincirli oligonükleotid primerler yardımı ile, enzimatik olarak çoğaltmaktır. Reaksiyon; denaturasyon, primerlerin bağlanması (annealing) ve amplifikasyon (extension) olmak üzere üç aşamada gerçekleşmektedir. PZR'ın amplifikasyon aşamasının 25-30 kez tekrarlanması sonucu, hedef DNA'nın milyonlarca kopyası oluşmaktadır. Amplifikasyon aşamasından sonra elde edilen



ürünler, agaroz jel veya poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrıştırılmakta, ethidium bromide ile boyanarak veya Southern blot analizi ile görünür hale getirilebilmektedir (Ahmadi 2006).

Altıntaş ve ark.'nın Manisa'daki 18 sığır üzerinde yaptıkları PZR çalışmaları sonucu etkin suşun *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1-G3 kompleksi) olduğu anlaşılmıştır.

Türkiye, İspanya, İtalya, Romanya, Yunanistan, Arnavutluk ve Finlandiya'dan toplanan 250 insan örneğinde yapılan mitokondrial PZR çalışmalarında G1 suşu tespit edilmiştir (Kınkar ve ark 2016).

İsfahan'dan toplanan 50 cerrahi hastasının örneklerinde yapılan PZR çalışmalarında elde edilen bilgilere göre 50 hastadan 43 'ünün G1, üçünün G3, dördünün G6 olduğu raporlanmıştır (Jafari ve ark 2017).

Tahran'da 138 örnekte yapılan başka bir PZR çalışmasının sonuçlarına göre örneklerin %89'u G1, %9,4'ü G3 ve yalnızca bir örneğin (%1,6) G6 suşu ile enfekte olduğu kaydedilmiştir (Nikmanesh ve ark 2017).

**4.6.2. 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. Restriksiyon endonükleazlar ise DNA'daki özel çift iplikli dizileri tanıyan ve DNA'yı tanıma bölgesinden veya ona yakın yerden kesen 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 bantlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) adı verilmektedir (Eryıldız 2010).

Adana'nın Çukurova bölgesinden alınan 50 koyun ve 20 insan izolatında PZR-RFLP çalışması sonucu tüm örneklerin (%100) G1 suşu olduğu gösterilmiştir (Eroğlu ve ark 2016).

Trakya bölgesinde yapılan genotiplendirme çalışmalarında PZR-RFLP yöntemi kullanılmış ve 58 örnek ( 42 insan, 12 sığır ve 3 koyun) incelenmiştir. Sonuçta 47

örnekte G1, 10 örnekte G2 ve bir örnekte G3 suşu saptanmıştır (Eryıldız C, Şakru N, 2012).

**4.6.3. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PZR:** Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA – polimeraz zincir reaksiyonu, “random amplification of polymorphic DNA – polymerase chain reaction” (RAPD-PZR); nükleotid dizilimi rastgele seçilmiş tek bir primer kullanılarak DNA’nın çoğaltılması temeline dayanan bir polimorfizm inceleme yöntemidir. Kullanılan primerler genellikle 9-10 bazlık kısa primerler olup G-C bakımından zengindir. Bu teknikte primerlerin bağlanma ısısı 40-50°C’ye düşürülmüştür (Ütük ve ark. 2005).

İspanya’da insan, koyun, sığır, keçi, domuz, yaban domuzu ve atlardan elde edilen izolatlar ile yapılan bir çalışmada bu yöntem ile G1, G4 ve G7 suşları tespit edilmiştir (Eryıldız 2010).

**4.6.4. PZR-Single Stranded Conformation Polimorphism (PZR-SSCP) analizi:** Polimeraz zincir reaksiyonu - tek sarmal konformasyon polimorfizmi, “polymerase chain reaction - single stranded conformation polymorphism” (PZR-SSCP); PZR ile çoğaltılmış çift iplikli DNA’nın ısıtma ile tek zincir haline dönüştürülüp, bu tek zincir DNA molekülünün nötral poliakrilamid jeldeki hareketinin incelenmesi temeline dayanır (Orita 1989; Leung 2008).

Single Stranded Conformation Polimorphism (SSCP); sekans farklılığı gösteren DNA örneklerinin belirlenmesinde kullanılan ucuz, kolay, duyarlı ve güvenilir bir yöntemdir. Tekniğin en büyük avantajı çok sayıda PZR örneğinin eş zamanlı olarak incelenmesine olanak sağlamasıdır (Ütük 2010).

Trakya bölgesinden alınan örneklerde genotiplendirme çalışmaları için PCR-SSCP yöntemi kullanılmış ve 58 örnek ( 42 insan, 12 sığır ve 3 koyun) incelenmiştir. Çalışma sonucunda 47 örneğin G1, 10 örneğin G2 ve bir örneğin de G3 ile enfekte olduğu saptanmıştır (Eryıldız C, Şakru N. 2012).

**4.6.5. 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 yöntemdir. Bu teknik, Sanger sekanslama ve SSCP tekniklerinin bir kombinasyonudur (Ütük ve ark. 2005).

**4.6.6. 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 (Ütük ve ark. 2005).

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. Ortaya çıkan farklı uzunlukta DNA parçaları poliakrilamid jelde elektroforeze tabi tutulmaktadır (Ütük ve ark. 2005).

*Echinococcus granulosus*'un genotip tayininde DNA dizi analizini kullanan Türkiye'de çeşitli illerden İstanbul'a kesim amacıyla getirilen hayvanlardan elde ettikleri izolatların G1/G3 kompleksi olduğunu bulmuşlardır (Vural ve ark. 2008).

Dizi analizi ve PZR-RFLP'nin birlikte kullanıldığı bir çalışmada ise, Türkiye'de doğu ve güney doğu illerinden toplanan 17 izolatta dizi analizi uygulanmış, tamamı G1 suşu olarak belirlenmiştir (Ütük 2008).

Türkiye'nin batı bölgesinden (İzmir, Menemen-İzmir, Manisa, Denizli ve Uşak) alınan koyun karaciğer örneklerinde yapılan sekans çalışmalarında en baskın türün G1-G3 *Echinococcus granulosus sensu stricto* olduğunu göstermiştir (Snabel ve ark 2009).

Türkiye'de o zamana kadar sığırlar üzerinde yapılmış en kapsamlı çalışma olan başka bir araştırmada 220 sığır karaciğeri kullanılmıştır. Örnekler üzerinde yapılan sekans çalışmaları sonucu 147 örneğin G1/G3 kompleksi, 28'inin ise G1 suşu olduğu görülmüştür. Ayrıca aynı çalışmada G3 türünün en çok sığırların akciğerinden kökenlendiği de vurgulanmıştır (Şimsek ve ark 2010).

Türkiye'de o tarihe kadar atlar üzerinde yapılan ilk çalışma özelliği taşıyan özgün bir moleküler araştırmada ise 2008'de otopsi gerçekleştirilen bir atın karaciğerinin hayvan müzesinden elde edilmesi ve sekanslanması ile bazı veriler

kaydedilmiştir. Verilere göre söz konusu olan suşun G1/G3 kompleksi olduğu ortaya çıkmıştır (Ütük ve Şimşek 2013).

Kırıkkale’de kesilen sığırlarda yaptıkları sekans çalışması sonucu mit Cox1 bölgesi sekanslanmıştır ve sonuçta etkin suşun G1-G3 kompleksi olduğu ortaya konmuştur (Gökpınar ve ark 2017).

Tahran’da 138 örnekte yaptığı Sekans çalışmalarında örneklerin %89’u G1, %9,4’ü G3 ve yalnızca bir örneğin (%1,6) G6 suşu ile enfekte olduğu gösterilmiştir (Nikmanesh ve ark 2017).

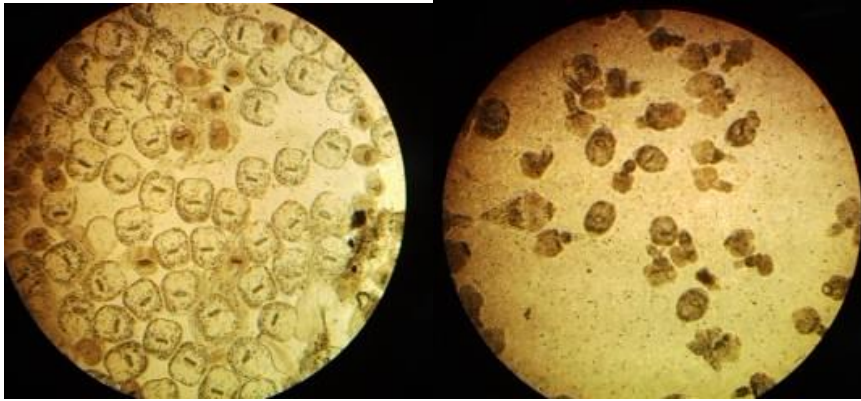
Polonya’da altı örnekte (2 domuz, 3 insan ve 1 koyun) cox1 gen bölgesi sekanslanmıştır. Çalışma sonucunda insanlardaki etken suş G7, koyundaki suş G1’dir ve bu çalışma ile Polonya’daki ilk G7 suşu kaydedilmiştir (Salamatin ve ark 2017).

## 5.GEREÇ ve YÖNTEM

### 5.1.SEROLOJİK ÇALIŞMALAR İÇİN GEREÇ

#### Hasta örneklerinin toplanması:

Çalışmamız, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi ve İzmir Ege Üniversitesi Hastanesi başta olmak üzere bu illerdeki hastanelerde kist hidatik tanısı almış ve opere edilmiş veya PAIR işlemine tabi tutulmuş 33 hastayı kapsamaktadır. Hidatik kistler, 10 hastadan PAIR yöntemi ile 23 hastadan kistektomi cerrahisi ile alınmıştır. USG, BT, MR ve X-Ray görüntüleme yöntemleriyle kisti belirlenmiş ve ameliyatına karar verilmiş ya da PAIR işlemine alınmış hastalardan 5 cc düz kan alınmış, serumu santrifüj edildikten sonra ayrılarak ELISA testinde kullanılmak üzere -20 °C’de saklanmıştır.



**Resim 2: Protoskolekslerin ışık mikroskobunda görünümü (X40) Orijinal**

## **Antijen hazırlanması**

### **Kist sıvısı elde etme:**

-İzmir ve Manisa mezbahalarından, Tansaş kesimhanelerinden ve Gaziantep ve Van'dan istenen fertil koyun ve sığır karaciğerleri laboratuvara getirildi.

-Kalsifiye olmadığı belirlenen kistlerden enjektör yardımıyla kist sıvıları çekildi.

-Steril olduğu anlaşılan koyunların kist sıvıları çalışma dışı bırakıldı.

-Fertil olan koyun kist sıvıları çalışmaya alındı.

-Protoskolekslerin ve diğer partiküllerin çökmesi için 30 dakika bekletildi.

-5000 devir/dak.' da 10 dakika santrifüj edilip, üstteki sıvı alınarak -20 °C de çalışma aşamasına dek saklandı.

### **Nanodrop ile protein konsantrasyonunun ölçülmesi (Bradford yöntemi)**

-Protein konsantrasyonunu ölçmek için dibi yuvarlak IHA plağı kullanıldı.

-Bovine Serum Albumin (BSA) içeren standart, uygun miktarda sulandırıldı (125 µl, 250 µl, 500 µl, 1000 µl).

-Plağın A1 kuyucuğuna 70 µl standart ve 30 µl distile su konuldu.

-A2-A3 ve A4 kuyucuğuna da 50'şer µl distile su konuldu.

- İlk kuyucuktan itibaren sona doğru 50'şer µl aktarılarak dilüsyon tamamlandı.

-Konsantrasyonu ölçülmek istenen örnekler uygun oranda sulandırıldı (1/10 µl, 1/100 µl, 1/1000 µl).

-Plağa 1/10 µl dilüsyondan 8 µl alınıp üzerine 2 µl dye reagent (Bradford) eklendi.

-Bu işlemler tüm antijen dilüsyonları için tekrarlandı.

-Buna ek olarak 8 µl distile su ve 2 µl dye reagent "Blank" olarak plağa eklendi.

## 5.2. YÖNTEM

### 5.2.1. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Testinin Uygulanması

#### ELISA Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeleri:



a) Hassas terazi



b) Vorteks



c) Isıtıcı



d) Çalkalayıcı



e) pH metre



f) Santrifüj



g) Spektrofotometre



h) Plak yıkama cihazı



j) Balon joje ve dereceli silindirler



k) Cam beherler





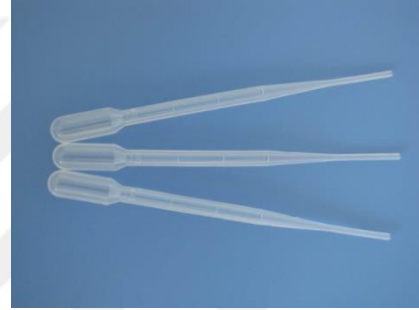
**l) Pipetler**



**m) Çoklu pipet**



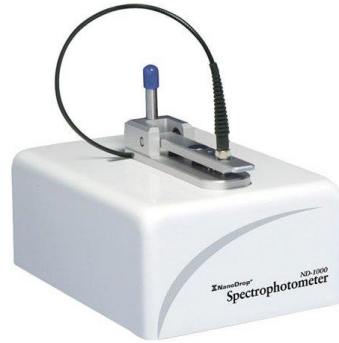
**n) ELISA plağı**



**o) Pastör pipet**



**p) Pipet uçları**



**r) Nanodrop**

**Şekil 10: ELISA Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeleri**

### **Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar:**

#### **PBS (Phosphate buffer saline pH: 7,2) :**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,67gr

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,57gr

NaCl 8,5gr

-Son hacim dH<sub>2</sub>O ile 1lt'ye tamamlanarak, pH 7,2'ye ayarlanmıştır.

#### **%5'lik Kazein**

dH<sub>2</sub>O 50 ml

NaOH 1 gr

Kazein 12,5 gr

HCl 6,25 ml

-Son hacim 250 ml' ye tamamlanıp, pH 7,0-7,5'e ayarlandı.

-Tüplere ayrılıp kullanılmak üzere -20 °C' ye kaldırıldı.

#### **Kazein Buffer (CK-KB)**

-%5 lik kazein -20°C' den çıkarılıp çözdürüldü.

-5 ml kazein 50 ml ye PBS ile tamamlanarak hazırlandı.

#### **DEAB (Dietanolamin Buffer)**

Dietanolamin 50 ml

dH<sub>2</sub>O 400 ml

MgCl<sub>2</sub> 0,05 gr

-Son hacim dH<sub>2</sub>O ile 500 ml'ye tamamlanıp, pH HCl ile 9,8'e getirilip +4 °C'de saklandı.

## Testin Uygulanışı

### ➤ Plakların Kaplanması;

-Testin uygulanması için bir gün önceden, konsantrasyonu belirlenen antijen PBS ile sulandırılarak ELISA plakları kaplandı.

### ➤ Serum Sulandırımı;

-5 ml PBS+100 µl antijen (bir plak için) şeklinde ayarlandı.

-Yapılan dilüsyondan 100'er µl alınıp plaklardaki kuyucuklara paylaştırıldı.

-Bir gece +4<sup>0</sup>C'de inkübasyona bırakıldı.

-Ertesi gün plaktaki antijen boşaltılıp patpatlandı.

-Negatif (-), düşük pozitif (+), ara pozitif (++) ve yüksek pozitif (+++) hastalar belirlendi.

-Plaktaki bir sıra çukurda herhangi bir pipetaj hatasını belirleyebilmek için "BLANK" olarak bırakıldı.

-Uygun serum dilüsyonları yapıldı.

- IgG için 1/640 µl dilüsyon uygulandı.

- Dilüe edilen hasta serumları plaklara 100'er µl olacak şekilde aktarıldı.

-1 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

-IgG konjuge dilüsyonu hazırlandı.

-Konjuge dilüsyonu 1/5000 µl olacak şekilde ayarlandı.

### ➤ Konjuge sulandırımı;

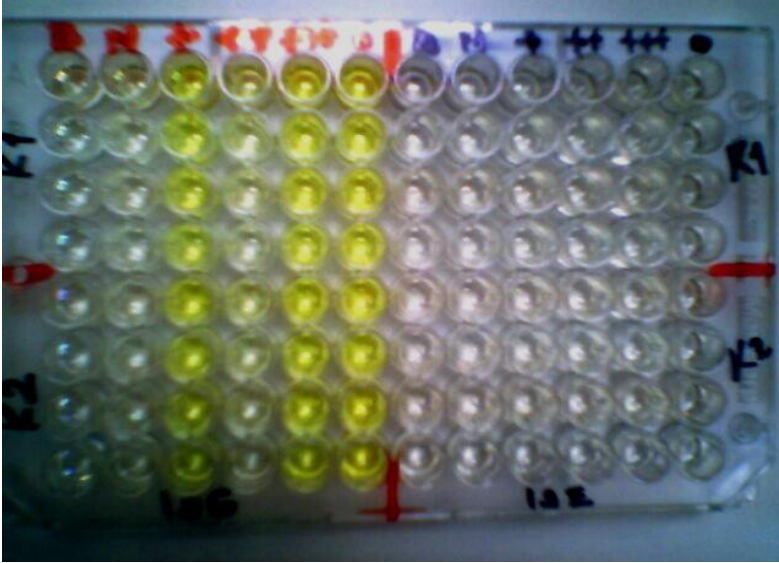
-12.5 ml KB+ 2,5 µl konjuge (IgG ALP) (1 plak için) yıkama cihazında 3 kez PBS ile yıkama yapıldı.

-İnkübasyon sonrası hazırlanan dilüe konjuge her çukara 100'er µl olacak şekilde aktarıldı.

- Çalkalayıcıda bir saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun sonunda üç kez yıkama yapıldı.
- Substrat hazırlandı ve her çukara yine 100'er µl olacak şekilde aktarıldı.

➤ **Substrat sulandırımı;**

- 11 ml DEAB+0,011gr PnPP (1 plak için) plaklar renklenme reaksiyonu için çalkalayıcıya kondu. Işık almasını önlemek için üzeri kapatıldı.
- 20 dakika sonra ELISA okuma cihazında 450 nm' de okundu.
- Sonuçlar Excel sayfası şeklinde kayıtları.
- Cihazdaki hasta sonuçları; negatif ve pozitif serumları ile cihazın cut-off değerleri dikkate alınarak yorumlandı.



**Resim 3: İki farklı koyun antijeni ile IgG ve IgE ELISA deneme sonuçları. (B: Blank, N: negatif control, +, ++, +++: Düşük, ara ve yüksek pozitif hastalar, K1: Birinci Koyun antijeni, K2: İkinci koyun antijeni)**

## 5.2.2. Moleküler Yöntemler

### Materyal elde etme:

Çalışmamızda yer alan ve kist hidatik ameliyatı olan hastaların kistlerinin sıvısı, uzman hekimler tarafından cerrahi yöntem veya PAIR işlemiyle alınmış ve MCBÜ Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Laboratuvarına teslim edilmiştir. Kist sıvıları içerisindeki protoskoleksler ışık mikroskopunda incelenmiş ve üç kez steril PBS ile yıkanarak uygun şekilde eppendorflara alınarak  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' ye kaldırılmıştır.

Kistin etrafındaki germinal membran da moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere steril eppendorflara alınmıştır. Her hastanın kişisel bilgileri, numunenin alınış tarihi ve kaç tüp örnek olduğu kayıt altına alınmıştır.

### 5.2.2.1.Kullanılan araç ve gereçler

1)



2)



3)



4)



5)



6)



7)



8)



9)



10)



11)



12)



13)



14)



15)



**Şekil 11: Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Araç ve Gereçler**

**Cihazlar ve Markaları**

1)Buzdolabı - VESTEL

2) -20°C Derin Dondurucu - WHIRLPOOL

3)Laminar Flow Kabin - NÜVE

- 4) Fully Autoclavable Pipettes, with adjustable volume - BOECO
- 5) Vortex mixer V1 plus - BOECO
- 6) Mikrodalga fırın - BEKO
- 7) Dry Block Thermostat - TDB-100 -BOECO
- 8) Thermal cyclers - TC-PRO- BOECO
- 9) Güç Kaynağı - THERMO Spektrofotometre -PERKIN ELMER Lamda Bio
- 10) Yatay Elektroforez - CSL
- 11) Jel Görüntüleme Sistemi - SYNGENE
- 12) Hassas Terazi - PRECISA
- 13) Masa Üstü Mikrosantrifüj - NÜVE
- 14) Genetic Analyzer - ABI PRISM 310
- 15) Spektrofotometre - NanoDrop ND-

#### **5.2.2.2. DNA ekstraksiyonu**

##### **Protoskoleksten DNA ekstraksiyonu**

###### **Hazırlık aşaması:**

Ekstraksiyon işlemi öncesi daha önce hastalardan elde edilen ve  $-20^{\circ}\text{C}$ ' de saklanan protoskoleks örnekleri oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletilerek erimesi sağlandı. Eriyen tüp içeriği homojen bir hal alması için düşük hızda vortekslendi. Tüp içerisinden 1ml solüsyon pipetle çekilip  $1\text{ mm}^3$  hacimdeki protoskoleks sayısını belirlemek amacıyla Thoma lamında sayım yapıldı. Sayım işleminde ortalama bir değere ulaşmak için üç kez tekrarlandı. Ortalama 200 protoskoleks içerecek şekilde sıvı alınıp DNA ekstraksiyonuna başlandı.

DNA ekstraksiyon işleminde RTA Dokudan DNA İzolasyon Kiti protokolü uygulandı.

## RTA Dokudan DNA İzolasyon Protokolü Kiti İçeriği

<b>Sağlanan Malzeme</b>	<b>50 test</b>
Proteinaz K*	40 mg
Solüsyon DL	22 ml
Solüsyon B	27,5 ml
Solüsyon W1*	38ml
Solüsyon W2*	57 ml
Solüsyon E	22 ml
Spin Kolonlar	100
Toplama Tüpleri (2 ml)	300
Toplama Tüpleri (1,5 ml)	100

### **\*Proteinaz K ve yıkama solüsyonlarını hazırlamak için;**

Proteinaz K (5 mg) + 1 ml dH<sub>2</sub>O (x2)

Solüsyon W1 (38 ml) + 38 ml Etanol (%96–100)

Solüsyon W2 (57 ml) + 19 ml Etanol (%96–100) eklendi.

### **DNA Ekstraksiyon Protokolü**

• Protoskoleks örneklerinden, ortalama 200 protoskoleks bulunduracak şekilde sıvı alınarak nükleaz içermeyen mikrosantrifüj tüpü içerisine aktarıldı. Üzerine 20 µl Proteinaz K ve 200 µl Solüsyon DL ilave edildi (30 mg germinal membran alınarak işlem uygulandı.).

• Mikrosantrifüj tüpleri vorteks yapılarak sıvının tamamen karışması sağlandı ve 56 °C’de 2 saat ısı bloğunda inkübasyona bırakıldı ve her 10 dakikada vorteks işlemi



tekrarlandı. (Germinal membranlar 1 gece veya doku tamamen sindirilip hiç parça kalmayınca kadar inkübe edildi).

- 250 µl Solüsyon B eklenerek 20 sn vurum vortekslendi.
- Tüpler kısa santrifüj sonrası her 3 dk'da bir vortekslenerek 65 °C'de 15 dk inkübasyona bırakıldı.
- 200 µl %96'lık etanol eklenip 20 sn vurum vorteks yapıldı.
- Kısa santrifüj sonrası karışım, toplama tüpünün içerisine yerleştirilmiş spin kolona aktarıldı ve 10 000 g de bir dk santrifüj yapıldı.
- Sıvı içeren alttaki tüp atıldı ve spin kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- 700 µl Solüsyon W1 eklendi ve 10 000 g de bir dk santrifüj yapıldı. Sıvı içeren alttaki tüp atıldı ve spin kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- 700 µl Solüsyon W2 eklendi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve spin kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi.
- 14.000 rpm de 30 sn santrifüj yapıldı.
- Toplama tüpü atılarak spin kolon steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- 200 µl daha önceden 70 °C'ye ısıtılmış Solüsyon E eklenerek oda ısısında üç dk inkübe edildi.
- 14 000 rpm de bir dk santrifüj yapıldı.

Spin kolon atıldı ve mikrosantrifüj tüpü içerisindeki DNA örnekleri PZR işleminde kullanılmaya dek -20 °C'ye kaldırıldı.

### **Germinal membrandan DNA ekstraksiyonu**

Protoskoleks içermeyen yani steril kiste sahip olan hastalardan kistektomi yöntemiyle çıkarılan ve çalışılmak üzere -20°C'ye kaldırılan germinal membranlar oda sıcaklığında bekletilerek çözünmesi sağlandı. Örnekler steril PBS ile yıkanarak ekstraksiyona uygun hale getirildi.

Ekstraksiyon için yeterli miktardaki membran parçaları steril cam besiyerinde lanset ile oldukça küçük parçalar haline getirildikten sonra ekstraksiyon aşamasına geçildi.

Germinal membrandan DNA ekstraksiyonu, protoskolekten DNA izolasyonunda olduğu gibi RTA Dokudan DNA İzolasyon Kiti protokolü uygulanarak yapıldı.



**Resim 4: Germinatif membrandan DNA izolasyon işlemi**

### **Ekstraksiyon sonrası DNA miktarının belirlenmesi**

DNA ekstraksiyonundan sonra mikrosantrifüj tüpleri içerisine alınan örneklerin DNA miktarı 260/280 nm dalga boylarında spektrofotometre (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer) ile ng/µl olarak belirlendi.

### **Kimyasallar ve Kitler**

- RTA DNA İzolasyon Kiti - RTA LABORATUVARLARI
- Hotstart Taq DNA Polymerase - FERMENTAS
- Etidium bromide (10 mg/ml) - GML
- Agarose - BIOMAX
- 100 bp Marker - SİGMA
- 10X TBE Buffer - DR. ZEYDANLI
- TE Buffer - MULTİCELL

- Amplitaq Gold Master Mix – GML
- Restriksiyon Enzim - FERMENTAS
- 6X DNA Loading Dye - FERMENTAS
- NAD1, CO1 ve ITS-1 Primerleri - GML
- Absolute Ethanol - MERCK
- GC Enhancer - GML
- Molecular Grade Water - AMBION
- Distile Su - GML
- ExoSap-IT - GML
- Sephadex G-50 - Sigma
- BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 Kit - Applied Biosystems
- 5x Sequencing Buffer - Applied Biosystems
- SeqPOP6 Polimer - Applied Biosystems
- 10 x Running Buffer (with EDTA) - Applied Biosystems
- Parafilm

### **Plastik Malzemeler**

- 0,1-10 µl Filtreli pipet ucu - CORNING
- 1-100 µl Filtreli pipet ucu - CORNING
- 100-1000 µl Filtreli pipet ucu - CORNING
- 0,2 ml PCR tüpü - CORNING
- 0,2 ml PCR tüpü için rack - DR. ZEYDANLI
- 0,5 ml Ependorf tüpü - CORNING
- 1,5-2 ml Santrifüj tüpü - CORNING
- 1,5-2 ml Santrifüj tüpü için rack - LP ITALIANA
- 10 cc Enjektör - GENJECT

- 20 cc Enjektör - GENJECT
- 15 ml Falkon tüp - CORNING
- 50 ml Falkon tüp - CORNING
- Receiver Kolon (20 µm por çaplı) - MACHAREY NAGEL
- ABI Prism 310 Genetic Analyzer Cihazına uygun 0,5 ml örnek yükleme tüpü – APPLIED BIOSYSTEMS
- ABI Prism 310 Genetic Analyzer Cihazına uygun 0,5 ml örnek yükleme tüpü için Septa - APPLIED BIOSYSTEMS
- ABI Prism 310 Genetic Analyzer Cihazına uygun kapiller 5-47 cm X 50 µm – APPLIED BIOSYSTEMS

### Oligonükleotid Primerler

**Tablo 2: *Echinococcus granulosus*'un tiplendirilmesi için PZR Analizi ve DNA Dizileme işleminde kullanılan oligonükleotid primerler**

Primer	Gen Bölgesi	Nükleotid Dizisi	Kaynak
<b>MS1</b>	NAD1	CGTAGGTATGTTGGTTTGTGTTGGT	Sharbatkhori ve ark. 2009
<b>MS2</b>	NAD1	CCATAATCAAATGGCGTACGAT	Sharbatkhori ve ark. 2009
<b>JB3</b>	CO1	TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT	Utuk ve ark. 2008
<b>JB4.5</b>	CO1	TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG	Utuk ve ark. 2008
<b>BD1</b>	ITS-1	GTCGTAACAAGGTTTCCGTA	Bowless ve ark. 1993
<b>4S</b>	ITS-1	TCTAGATGCGTTCGAA(G/A)TGTCGATG	Bowless ve ark. 1993

Tüm primerler µl'de 10 pmol olacak şekilde TE solüsyonu ile dilue edildi.

### 5.2.2.3.PZR içeriği

-Polimeraz zincir reaksiyonunda, içeriğinde MgCl<sub>2</sub>, dNTP mix, Hot Start Taq DNA Polimeraz ve PZR buffer bulunan Amplitaq Gold Master Mix, GC Enhancer, primerler, Molecular grade su ve kalıp DNA kullanıldı.

-Çalışılacak tüm gen bölgeleri için ayrı ayrı PZR bileşenlerinin miktarı ve PZR sıcaklığı optimizasyonu yapıldı.

-Her bir örnek için PZR bileşenleri aşağıda yazılan hacimlerde alınarak 0,2 ml'lik PZR tüplerine dağıtıldı.

-Tüplerin her birine toplam hacim 25 µl olacak şekilde kalıp DNA eklenerek tüpler Thermal cycler cihazına yerleştirildi

-Aşağıdaki protokoller uygulandı.

-Elde edilen PZR ürünleri kullanılıncaya dek -20 °C'ye kaldırıldı.



Resim 5: Germinatif membrandan izole edilen DNA' nın PCR master mixi

NAD1 Geni için PZR Bileşenleri	Miktarı
Amplitaq Gold Master Mix	12,5 µl
İleri Primer (MS1)	1 µl
Geri Primer (MS2)	1 µl
dH <sub>2</sub> O	5 µl

GC Enhancer	3 µl
Kalıp DNA	2,5 µl

#### **NAD1 Geni için PZR Programı**

İlk denatürasyon	95 °C	10 dk	
Denatürasyon	95 °C	30 sn	} 35 Döngü
Bağlanma	51 °C	30 sn	
Uzama	72 °C	40 sn	
Son Uzama	72 °C	10 dk	

#### **CO1 Geni için PZR Bileşenleri**

#### **Miktarı**

Amplitaq Gold Master Mix	12,5 µl
İleri Primer (JB3)	1 µl
Geri Primer (JB4.5)	1 µl
dH <sub>2</sub> O	2,5 µl
GC Enhancer	4 µl
Hotstart Taq DNA Polimeraz	1 µl
Kalıp DNA	3 µl

#### **CO1 Geni için PZR Programı**

İlk denatürasyon	95 °C	10 dk	
Denatürasyon	95 °C	50 sn	} 35 Döngü
Bağlanma	47 °C	50 sn	
Uzama	72 °C	50 sn	
Son Uzama	72 °C	10 dk	

<b>ITS-1 Geni için PZR Bileşenleri</b>	<b>Miktarı</b>
Amplitaq Gold Master Mix	12,5 µl
İleri Primer (BD1)	1 µl
Geri Primer (4S)	1 µl
dH <sub>2</sub> O	5 µl
Hotstart Taq DNA Polimeraz	1,5 µl
Kalıp DNA	4 µl

#### **ITS-1 Geni için PZR Programı**

İlk denatürasyon	95 °C	10 dk	} 40 Döngü
Denatürasyon	95 °C	1dk	
Bağlanma	59 °C	1 dk	
Uzama	72 °C	1.50 dk	
Son Uzama	72 °C	10 dk	

#### **5.2.2.4. Jel elektroforezi**

##### **Jelin hazırlanması ve PZR ürünlerinin jele yüklenmesi**

Jel elektroforezi için,

- 1,5 gr agaroz hassas terazide tartılarak 100 ml 1xTBE tamponu içerisine eklendi.

- Karışım mikrodalga fırında kaynatılarak agarozun çözünmesi sağlandı.

-Jelin sıcaklığı 60 °C'ye düşünce 5 µl Etidium bromide eklendi.

-Jel, elektroforez tankına döküldü.

-Jel tankı tarafları takılarak donması için oda ısısında bırakıldı.

-Taraklar çıkarıldıktan sonra 1XTBE ile doldurmuş elektroforez tankı içerisine alınan jel üzerindeki kuyucuklara, her örnek için 1 µl loading dye ve 5 µl DNA örneği içeren karışım yüklendi.

- Elektroforez işlemi 100 Voltta yapıldı.

- Image Analiz Sisteminde bantların varlığı incelendi.

-Bantların moleküler ağırlığını belirlemek amacıyla 100 bp'lık marker kullanıldı.

-Tüm PZR uygulamalarında pozitif kontrol olarak daha önce morfolojik, serolojik ve moleküler olarak *Echinococcus granulosus* olduğu belirlenen parazit DNA'sı kullanıldı. Negatif kontrol olarak ise steril distile su kullanıldı.

### **Ribozomal ITS-1 gen bölgesi RFLP analizi (PZR-RFLP)**

Elektroforez işlemi sonrası jel üzerinde niteleyici olarak tespit edilen ribozomal ITS-1 gen bölgesi PZR ürünlerinin, RsaI (Fermentas), MspI (Fermentas), CfoI (Fermentas) ve AluI (Fermentas) restriksiyon enzimleri ile ayrı ayrı kesim işlemi yapıldı.

- Kesim işlemini gerçekleştirmek amacıyla 10 µl PZR ürünü, 2 µl 10X FastDigest Green Buffer, 1 µl restriksiyon enzimi ve 17 µl nükleaz içermeyen steril distile su kullanıldı.

- Tüm enzimler için 37 °C'de 8 dk inkübasyon işlemi uygulandı.

- İnkübasyon işlemi sonrası her tüpten 10 µl alınarak %2'lik Etidium bromide ile boyanmış jele aktarıldı ve elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

- Elektroforez işlemi 100 voltta 1 saat süreyle yapıldı.

- Jel ardından UV görüntüleme sistemine aktarılarak bant profilleri incelendi.

-Bantların moleküler ağırlığını belirlemek amacıyla 6 µl 100 bp'lık marker kullanıldı.



### 5.2.2.5. DNA dizileme

PZR sonrası jel elektroforezinde yürütülen, mitokondrial *sitokrom c oksidaz* alt ünite 1 (CO1) geninin ~450 baz çifti, nikotinamid adenin dinükleotit dehidrogenaz alt ünite 1 (NAD1) geninin ise ~400 baz çiftinde bant verdikleri gözlemlendi.

- PZR ürünleri ExoSAP-IT ile pürifiye edildi ve ardından cycle sequencing işlemi yapıldı.

- Cycle sequencing işlemi sonrası oluşan ampliconlar sephadex ile pürifiye edildi ve ABI prism 310 Genetic Analyzer cihazına yüklendi.

- Cihaz fırınının sıcaklığı 50 °C'ye getirildi ve cihazın kapillerine SeqPOP 6 polimeri dolduruldu.

- Örnekler kapiller içerisinde 15 voltta yürütüldü.

-İleri ve geri primerler ile çift yönlü dizilenen tüm örneklerin eşleştirme (alignment) işlemleri SeqScape V2.6 programı ile yapıldı.

- Eşleştirme sonrası elde edilen her örneğin çift zincirli DNA dizileri BLAST search'le ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) Genbank'taki verilerle karşılaştırıldı.

### ExoSAP-IT pürifikasyonu

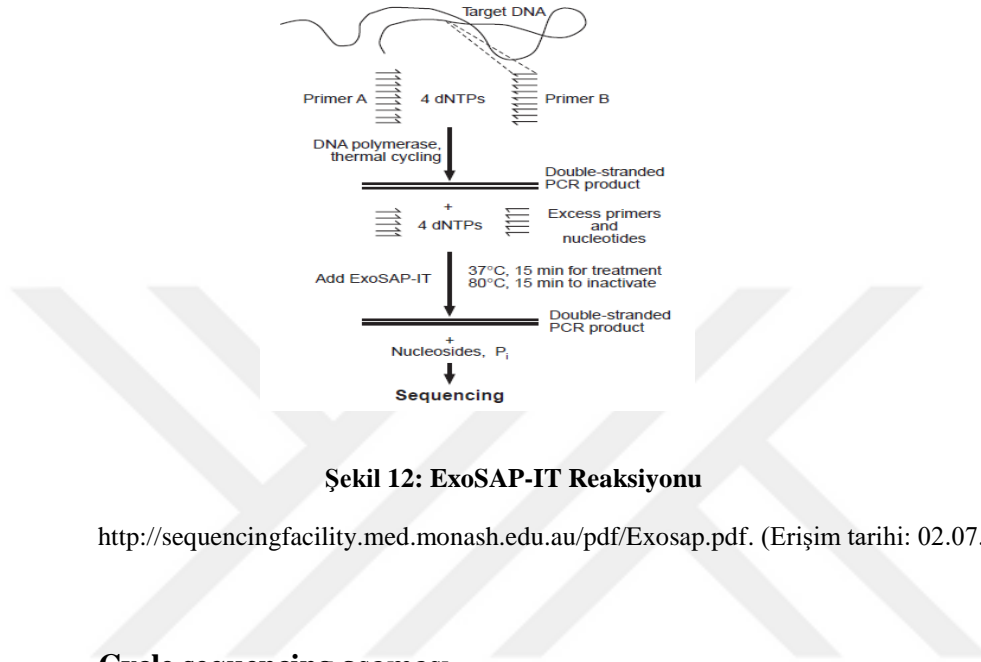
-PZR sonrası elde edilen ürünlerden 5 µl alınarak 0,2 ml PZR tüpüne aktarıldı. Üzerine 2,5 µl ExoSAP-IT eklendi.

-Jel görüntüsünde kirlilik bulunması halinde ExoSAP-IT miktarı 3 µl'ye çıkarıldı.

-Tüpler Thermal cycler'a yerleştirildi ve aşağıdaki ExoSAP-IT protokolü uygulandı.

## ExoSAP-IT programı

Exo ve SAP Enzimlerinin Aktivasyonu	37 °C	30 dk
Exo ve SAP Enzimlerinin İnaktivasyonu	80 °C	15 dk



Şekil 12: ExoSAP-IT Reaksiyonu

<http://sequencingfacility.med.monash.edu.au/pdf/Exosap.pdf>. (Erişim tarihi: 02.07.2018)

## Cycle sequencing aşaması

Cycle sequencing aşamasında 0,2 ml PZR tübüne, içeriğinde dNTP, ddNTP ve Hot Start Taq DNA Polimeraz bulunan, Big Dye Terminator v3.1, PZR reaksiyonunda kullanılan ileri ve geri primerlerden bir tanesi, dH<sub>2</sub>O, 5X sequencing buffer ve ExoSAP-IT ile pürifiye edilmiş PZR ürünü konuldu.

-Tüpler, Thermal cycler'a yerleştirildi.

-Cycle sequencing protokolü uygulandı.

-Elde edilen cycle sequencing ürünleri pürifiye etmek amacıyla sephadex kolonlara aktarıldı.

<b>Cycle sequencing bileşenleri</b>	<b>Miktarı</b>
BigDye Terminator v3.1	2 µl
İleri Primer veya Geri Primer	2 µl
dH <sub>2</sub> O	2 µl
5x sequencing buffer	2 µl
ExoSAP-IT ile pürifiye edilmiş PZR Ürünü	2 µl

### **Cycle sequencing programı**

İlk denatürasyon	96 °C	10 dk	} 25 Döngü
Denatürasyon	96 °C	10 sn	
Bağlanma	49 °C	5 sn	
Uzama	60 °C	4dk	

### **Sephadex hazırlanışı ve spin kolon pürifikasyonu**

- 1 gr Sephadex hassas terazide tartılarak 50 ml'lik falkon tüpü içerisine konuldu.
- Üzerine 14 ml distile su eklendi. 5 dk vortekslenerek iyice çözünmesi sağlandı ve +4 °C'ye kaldırıldı.
- 10 dk da bir +4 °C'den alınarak 2 dk vortekslendi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.
- Her bir örnek için spin kolonlara 700 µl Sephadex çözeltisi eklendi.
- Spin kolonlar 2000 g de 2 dk santrifüj edildi. Toplama tüpündeki su döküldü.
- Cycle Sequencing ürünleri 10 µl'lik bir pipet ucu ile sephadex kolonların ortasına gelecek şekilde kolonlara aktarıldı.
- Sephadex kolonlar en ufak bir basınç ile zarar görebilecekleri için bu aşama çok dikkatli yapıldı.

- 2000 g' de 2 dk santrifüj edildi. Toplama tübünde kalan ve sephadex kolon ile pürifiye edilmiş olan cycle sequencing ürünleri 0,5 ml'lik örnek tüplerine aktarıldı.

### **Örneklerin ABI prism 310 genetic analyzer cihazına yüklenmesi**

- Sephadex pürifikasyonu sonrası tüm örnekler 0,5 ml örnek tüplerine aktarıldı ve tüplerin ağzı dikkatli bir şekilde septa ile kapatıldı.

- Tüpler ABI prism 310 Genetic Analyzer cihazının trayine, her örnek ileri ve geri olmak üzere 2 tüp içerecek şekilde yerleştirildi.

- Kapiller SeqPOP 6 polimer ile dolduruldu ve CCD kamera ve lazer test edildi.

-Oluşturulan injection list cihaza tanıtılarak tüm örnekler 15 voltta 40 dk yürütüldü.

- Dizileme işlemi boyunca oluşan tüm pikler gözle kontrol edildi.

- Dizileme işlemi bittikten sonra Sequencing Analyse programında tüm örnekler pikleri açısından tek tek tekrar kontrol edildi ve SeqScape V2.6 programı açılarak ileri ve geri yönde dizilenmiş örneklerin eşleştirilme işlemi yapıldı.

## 6. BULGULAR

Çalışmamız, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi ve İzmir Ege Üniversitesi Hastanesi başta olmak üzere bu illerdeki hastanelerde kist hidatik tanısı almış ve opere edilmiş veya PAIR işlemine tabi tutulmuş 33 hastayı kapsamaktadır. 50 hastanın kist örneği, fertil ya da steril olduğu aspirasyon ile hazırlanan preparatların ışık mikroskopunda incelenmesi ile saptanmıştır. PAIR işlemi sırasında 50 hastanın 17'si nin KE hastası olmadığı, basit ya da dejenere kist olduğu görülmüştür. Bu nedenle söz konusu 17 hasta serolojik ve moleküler açıdan incelemeye alınamamıştır. Diğer 33 hastadan elde edilen protoskoleksler moleküler çalışmada, serum örnekleri ise serolojik çalışmada kullanılmıştır. Her iki çalışmanın sonuçları suş tayini için karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Parazitin kuluçka dönemi veri olarak önemli olduğundan ( Khachatryan 2017) çalışmamızda hasta yaşları 5- 63 yaş aralığı olarak saptanmıştır. Kist materyallerinin alındığı hastaların yaş aralıkları ve cinsiyetleri Tablo 3'de gösterilmiştir. Köpek beslemenin epidemiyolojik açıdan önem taşıdığı göz önünde bulundurularak (Öge ve ark 2017) hasta anketlerinde bu kriter de dikkate alınmıştır. Buna göre 33 hastadan 17 sinin geçmişte ya da hastalık geçirdiği dönemde köpek beslediği saptanmıştır. Bu kriter yüksek pozitiflik saptanan hastaların değerlendirilmesinde de göz önünde bulundurulmuştur (Öge ve ark. 2017).

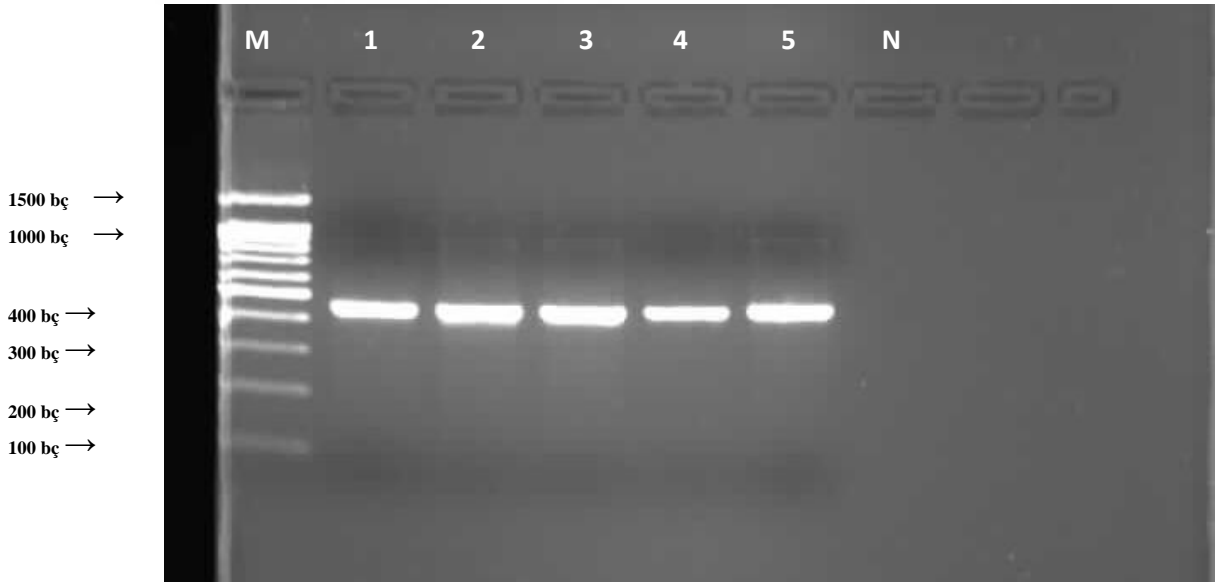
**Tablo 3:Kist materyallerinin alındığı hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı**

Hastanın Yaşı	Erkek	Kadın	<b>Toplam</b>
0-12	4	2	6
13-20	2	3	5
21-35	5	2	7
36 ve üzeri	11	4	15
<b>Toplam</b>	22	11	33

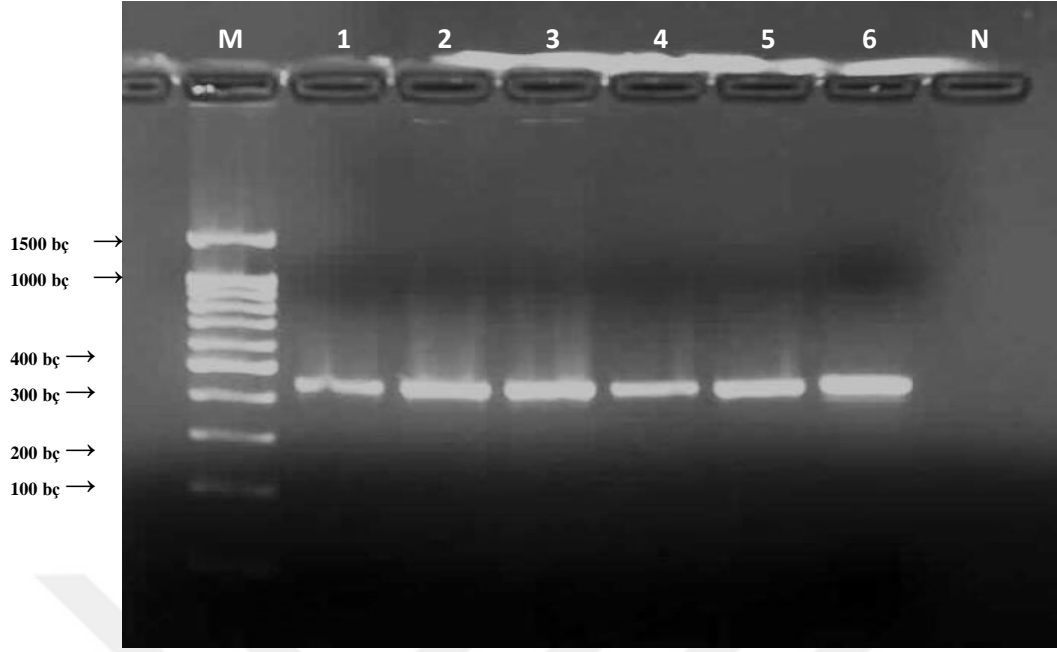
## 6.1. MOLEKÜLER BULGULAR

### 6.1.1. Mitokondrial CO1 ve NAD1 Genlerinin PZR Bulguları

Çalışmamızda protoskoleks ve germinal membranlardan izole edilen DNA'ların, parazitin mitokondrial CO1 genini amplifiye eden JB3 ve JB4.5, NAD1 genini amplifiye eden MS1 ve MS2 primerleri ile PZR işlemi sonucunda CO1 geni için 446 baz çifti, NAD1 geni için 378 baz çifti büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir (Resim 6-7-8). Tüm amplikonlar jel üzerinde elektroforez ile yürütüldüklerinde tek bir bant vermişlerdir. Bu sonuç, yapılan PZR işleminin özgünlüğünü ve işlem öncesinde veya sonrasında çalışılacak örneklerde herhangi bir kontaminasyonun olmadığını göstermiştir. PZR ürünlerine ait jel görüntüleri Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki Moleküler Biyoloji laboratuvarındaki UV jel görüntüleme sistemi (SYNGENE-ABD) kullanılarak fotoğraflanmıştır.



**Resim 6: *Echinococcus granulosus*'un hastalardaki mitokondrial CO1 geninin PZR ile amplifiye edilmesi sonucu oluşan 446 baz çifti (bp) uzunluğundaki bantlar. M: Marker, 1,2,3,4,5; İnsan izolati, N: Negatif Kontrol (Distile Su).**



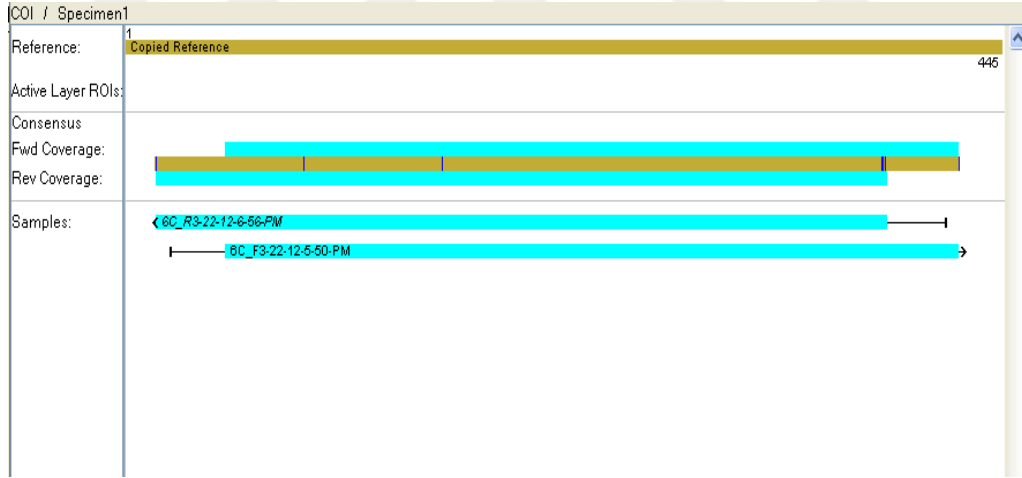
**Resim 7:** *Echinococcus granulosus*'un hastalardaki mitokondrial CO1 geninin PZR ile amplifiye edilmesi sonucu oluşan 446 baz çifti (bç) uzunluğundaki bantlar. M: Marker, 1,2,3,4,5,6; İnsan izolatu N: Negatif Kontrol (Distile Su).



**Resim 8:** *Echinococcus granulosus*'un insan izolatlarının mitokondrial NAD1 geninin PZR ile amplifiye edilmesiyle oluşan 378 baz çifti (bç) uzunluğundaki bantlar. M: Marker, 1,2,3,4,5; İnsan izolatu N: Negatif Kontrol (Distile Su).

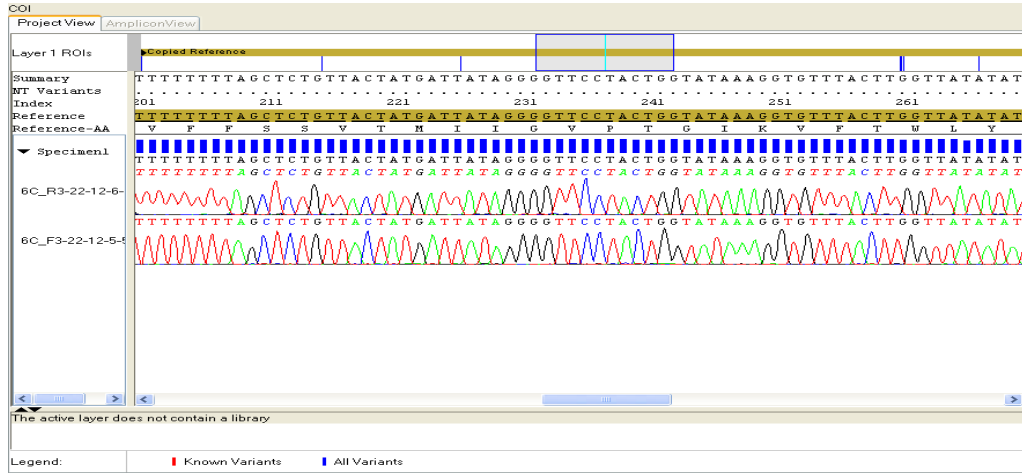
## 6.1.2. Mitokondrial CO1 Ve NAD1 Genlerinin Çift Yönlü DNA Dizi Analizi Bulguları

İleri ve geri yönlü olarak cycle sequencing işlemi yapıldıktan sonra tüm örnekler ABI Prism 310 Genetic Analyzer cihazına yüklenmiş ve dizileme işlemi yapılmıştır. Dizilemeden sonra her örneğe ait ileri ve geri yönlü elde edilen dizilerin karşılaştırma (alignment) analizi SeqScape V2.6 programı ile yapılmıştır. CO1 ve NAD1 genlerine ait alignment analiz sonuçları Şekil 13 ve Şekil 15’ de görülmektedir. Dizileme boyunca ve sonrasında her örneğin pik görüntüleri hem gözle hem de cihaz bilgisayarı ile kontrol edilmiştir. CO1 ve NAD1 genlerine ait ileri ve geri yönlü olarak bazların karşılaştırma analizlerinin yapıldığı ve kalitelerinin gösterildiği elektroferogram görüntüleri, Şekil 14 ve Şekil 16’da gösterilmiştir.

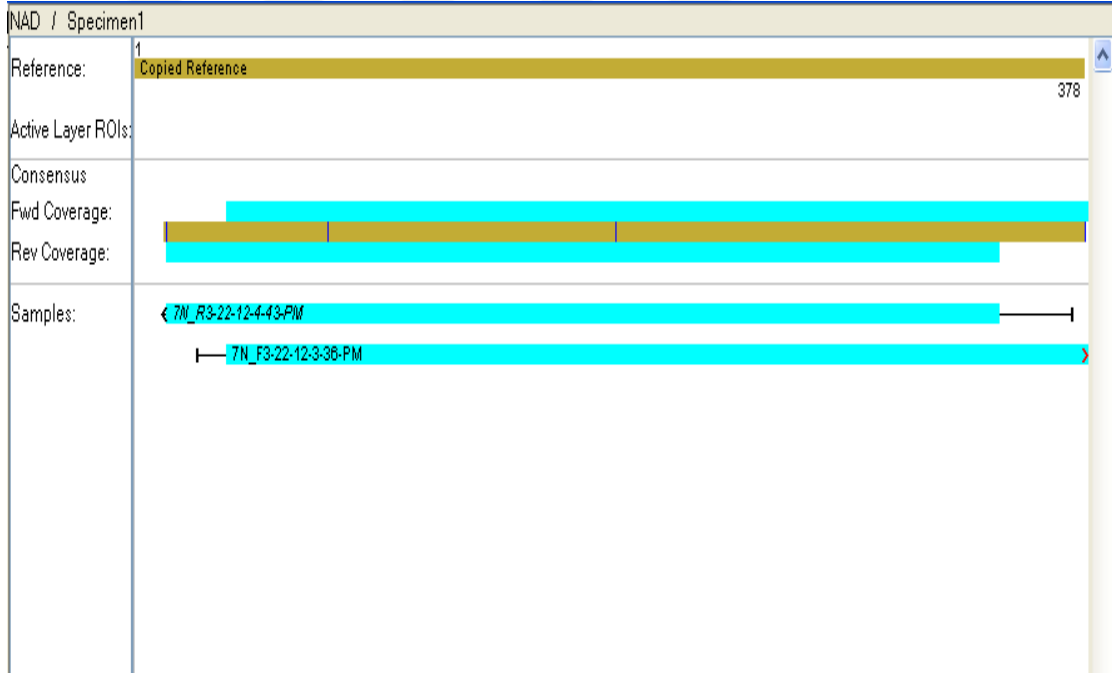


Şekil 13: CO1 genine ait ileri ve geri yönlü olarak dizileme işlemi sonrası elde edilen dizilerin alignment analizi.

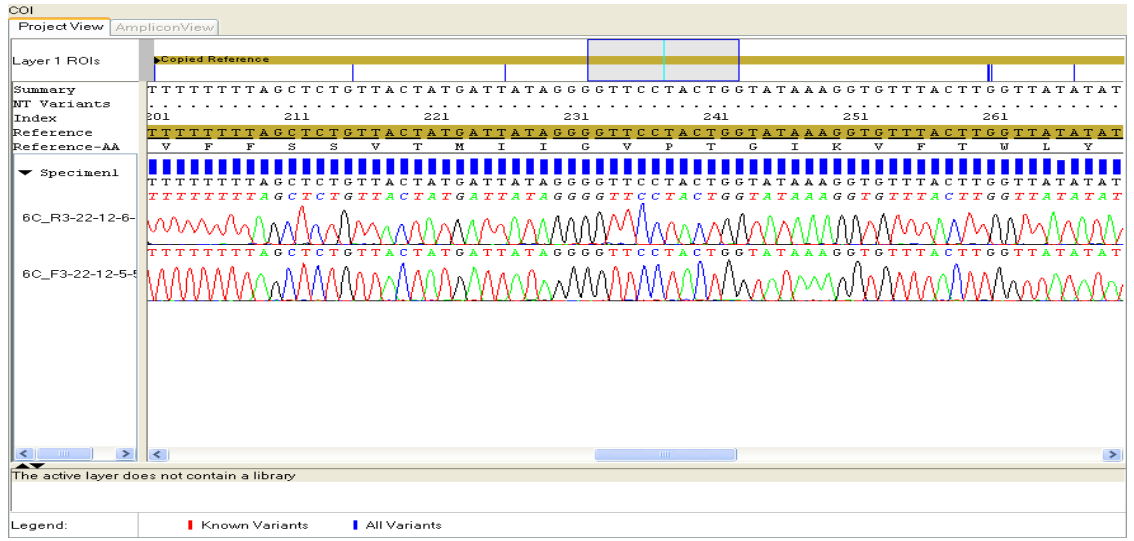




Şekil 14: CO1 genine ait ileri ve geri yönlü olarak elektroferogram görüntüsü.



Şekil 15: NAD1 genine ait ileri ve geri yönlü olarak dizileme işlemi sonrası elde edilen dizilerin allignment analizi.



Şekil 16: NAD1 genine ait ileri ve geri yönlü olarak elektroferogram görüntüsü.

Tüm örneklerin forward ve reverse dizileri analiz edilerek NCBI sitesindeki BLAST programı ile karşılaştırılmıştır. Bu işlem sonucunda çalışılan tüm örneklerin *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1/G3) olduğu tespit edilmiştir.

Sequences producing significant alignments:

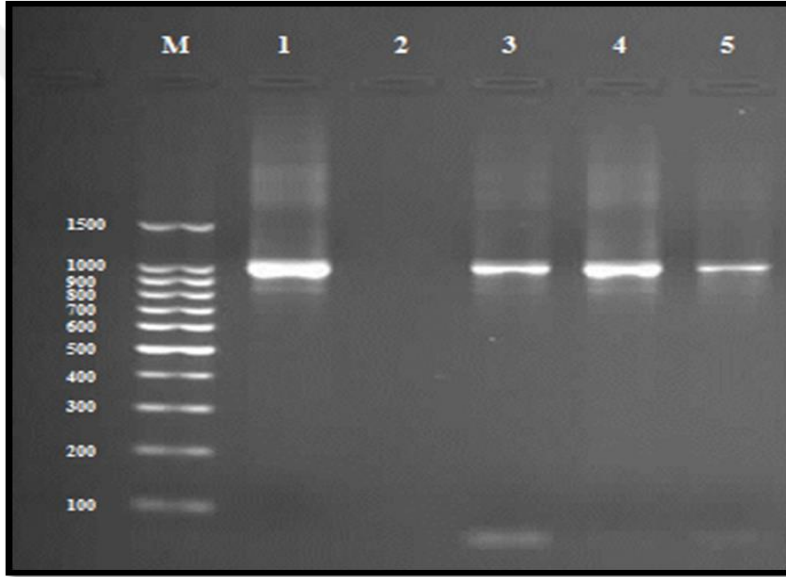
Select: All None Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Echinococcus granulosus isolate Echino UFSM-1 cytochrome c oxidase subunit I (cox1) gene, partial cds; mitochondrial</a>	710	710	100%	0.0	99%	<a href="#">KC860075.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Echinococcus granulosus mitochondrial DNA, complete genome, sample code: 52L107</a>	710	710	100%	0.0	99%	<a href="#">AB786664.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Echinococcus granulosus strain 15 cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) gene, partial cds; mitochondrial</a>	710	710	100%	0.0	99%	<a href="#">KC109654.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Echinococcus granulosus strain 12 cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) gene, partial cds; mitochondrial</a>	710	710	100%	0.0	99%	<a href="#">KC109651.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Echinococcus granulosus strain 8 cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) gene, partial cds; mitochondrial</a>	710	710	100%	0.0	99%	<a href="#">KC109647.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Echinococcus granulosus strain 4 cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) gene, partial cds; mitochondrial</a>	710	710	100%	0.0	99%	<a href="#">KC109643.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Echinococcus granulosus clone HY92 cytochrome c oxidase subunit I (Cox1) gene, partial cds; mitochondrial</a>	710	710	100%	0.0	99%	<a href="#">JX854029.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Echinococcus granulosus mitochondrial COX1 gene for cytochrome c oxidase subunit 1, partial cds, haplotype: EG44</a>	710	710	100%	0.0	99%	<a href="#">AB688621.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Echinococcus granulosus mitochondrial COX1 gene for cytochrome c oxidase subunit 1, partial cds, haplotype: EG40</a>	710	710	100%	0.0	99%	<a href="#">AB688617.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Echinococcus granulosus mitochondrial COX1 gene for cytochrome c oxidase subunit 1, partial cds, haplotype: EG39</a>	710	710	100%	0.0	99%	<a href="#">AB688616.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Echinococcus granulosus mitochondrial COX1 gene for cytochrome c oxidase subunit 1, partial cds, haplotype: EG37</a>	710	710	100%	0.0	99%	<a href="#">AB688614.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Echinococcus granulosus mitochondrial COX1 gene for cytochrome c oxidase subunit 1, partial cds, haplotype: EG34</a>	710	710	100%	0.0	99%	<a href="#">AB688611.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Echinococcus granulosus mitochondrial COX1 gene for cytochrome c oxidase subunit 1, partial cds, haplotype: EG33</a>	710	710	100%	0.0	99%	<a href="#">AB688610.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Echinococcus granulosus mitochondrial COX1 gene for cytochrome c oxidase subunit 1, partial cds, haplotype: EG32</a>	710	710	100%	0.0	99%	<a href="#">AB688609.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Echinococcus granulosus mitochondrial COX1 gene for cytochrome c oxidase subunit 1, partial cds, haplotype: EG31</a>	710	710	100%	0.0	99%	<a href="#">AB688608.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Echinococcus granulosus mitochondrial COX1 gene for cytochrome c oxidase subunit 1, partial cds, haplotype: EG30</a>	710	710	100%	0.0	99%	<a href="#">AB688607.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Echinococcus granulosus mitochondrial COX1 gene for cytochrome c oxidase subunit 1, partial cds, haplotype: EG26</a>	710	710	100%	0.0	99%	<a href="#">AB688603.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Echinococcus granulosus mitochondrial COX1 gene for cytochrome c oxidase subunit 1, partial cds, haplotype: EG25</a>	710	710	100%	0.0	99%	<a href="#">AB688602.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Echinococcus granulosus mitochondrial COX1 gene for cytochrome c oxidase subunit 1, partial cds, haplotype: EG21</a>	710	710	100%	0.0	99%	<a href="#">AB688598.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Echinococcus granulosus mitochondrial COX1 gene for cytochrome c oxidase subunit 1, partial cds, haplotype: EG20</a>	710	710	100%	0.0	99%	<a href="#">AB688597.1</a>

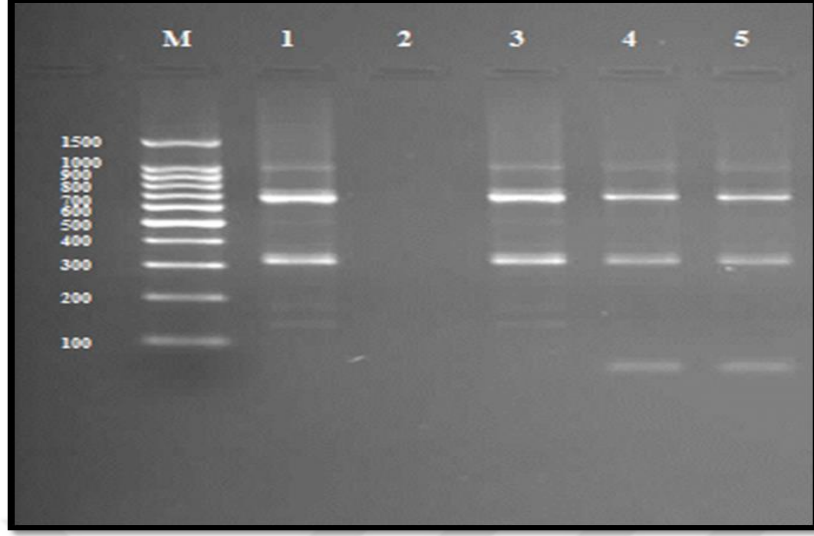
Şekil 17: Alligment analizi sonrası elde edilen dizilerin BLAST görüntüsü

### 6.1.3. Ribozomal ITS-1 Gen Bölgesi PZR-RFLP Bulguları

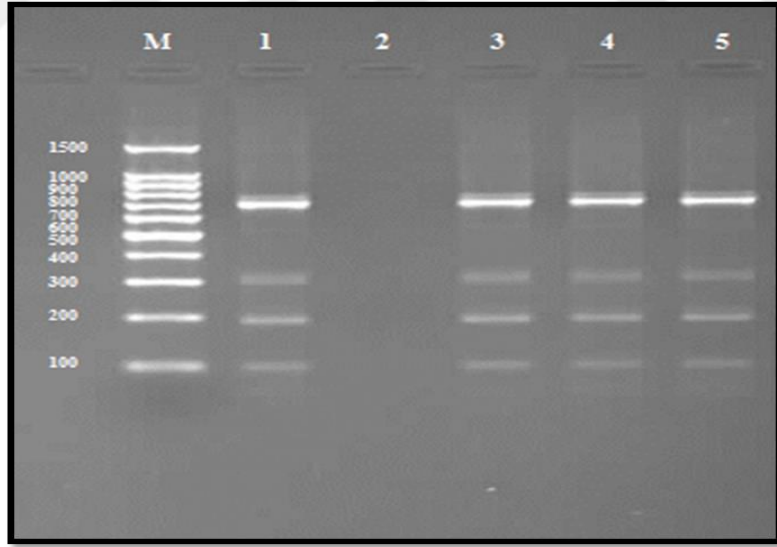
Protoskoleks veya germinal membranlardan izole edilen DNA'ların ribozomal ITS-1 gen bölgesi BD1 ve 4S primerleri ile çoğaltılarak, PZR ürünleri jel üzerinde yürütülmüştür. Elektroforez işlemi sonrası oluşan bant profili şekil 18'de gösterilmiştir. PZR ürünlerinin; AluI, RsaI, MspI, CfoI ve restriksiyon enzimleri ile kesim işlemleri yapılmış ve kesim işlemi sonrası oluşan bant profilleri de sırasıyla şekil 18, 19, 20, 21 ve 22'de gösterilmiştir. Bütün örneklerde aynı bant profili elde edilmiştir. Tüm *Echinococcus* izolatlarından elde edilen bant profilleri, pozitif kontrol (G1 - koyun suşu) bant profilleri ile kıyaslandığında hepsinin aynı olduğu saptanmıştır.



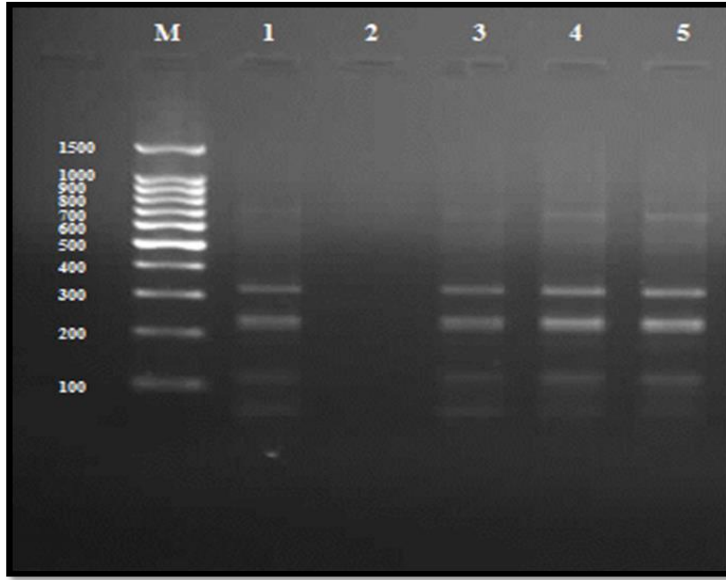
**Resim 9:** *Echinococcus granulosus*'un koyun, sığır ve insan izolatlarının ribozomal ITS-1 gen bölgesinin PZR ile amplifiye edilmesi sonucu oluşan bandların görünümü. M: Marker, 1; Pozitif Kontrol, 2; Negatif Kontrol (Distile Su), 3; İnsan İzolatu, 4; Koyun İzolatu, 5; Sığır İzolatu



Resim 10: *Echinococcus granulosus*'un insan izolatlarının ribozomal ITS-1 gen bölgesinin RsaI enzimi ile kesilmesi sonucu oluşan bandların görünümü. M; Marker, 1; Pozitif Kontrol, 2; Negatif Kontrol 4; İnsan izolatı.



Resim 11: *Echinococcus granulosus*'un koyun, sığır ve insan izolatlarının ribozomal ITS-1 gen bölgesinin MspI enzimi ile kesilmesi sonucu oluşan bandların görünümü. M; Marker, 1; Pozitif Kontrol, 2; Negatif Kontrol (Master mix içerisinde PZR ürünü yok, restriksiyon enzimi var), 3; Koyun İzolatı, 4; İnsan İzolatı, 5; Sığır İzolatı.



**Resim 12:** *Echinococcus granulosus*'un koyun, sığır ve insan izolatlarının ribozomal ITS-1 gen bölgesinin CfoI enzimi ile kesilmesi sonucu oluşan bandların görünümü. M; Marker, 1; Pozitif Kontrol, 2; Negatif Kontrol (Master mix içerisinde PZR ürünü yok, restriksiyon enzimi var), 3; Koyun İzolatu, 4; İnsan İzolatu, 5; Sığır İzolatu.

## 6.2. SEROLOJİK BULGULAR

Kistik Ekinokokkozis tanısı almış ve moleküler çalışma için gerekli materyali elde edilmiş (protoskoleks/germinatif membran) hastalardan elde edilen serum örnekleri IgG-ELISA ALP yönteminde 1/640  $\mu$ l oranında sulandırılmıştır.

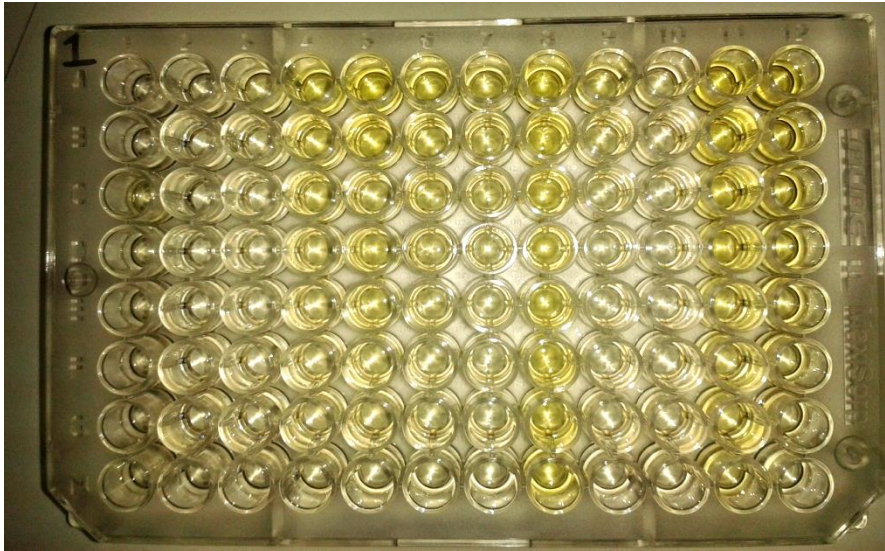
Konjuge dilüsyonu 1/5000  $\mu$ l olacak şekilde ayarlanmış ve okumalar 30 dakika ve 60 dakika olacak şekilde spektrofotometrede ve 450 nm dalga boyunda okutulmuştur. Sonuçlar Excel sayfası şeklinde kayıtlanmıştır. Cihazdaki hasta sonuçları; negatif ve pozitif serumları ile cihazın cut-off değerleri dikkate alınarak yorumlanmıştır.

Bazı hastaların serum örneklerinin yüksek pozitif olduğu saptanmış ve bu hastaların serumları daha sonraki çalışmalarda kontrol amaçlı kullanılmak üzere

-20 °C'ye kaldırılmıştır. Moleküler çalışma sonucunda G1/G3 suşu ile enfekte olduğu saptanan tüm hastaların IgG ALP yönünden seropozitif çıkması, yapılan serolojik ve moleküler çalışmaların bulgularının birbiriyle tutarlı olduğunu ve herhangi farklı bir sonuca neden olacak kontaminasyonun oluşmadığını göstermiştir.

**Tablo 4: 30. dakikada 450 nm’de okunan IgG ALP hasta değerleri.**  
**Neg: Negatif kontrol, Blank: boş ukur, +: düşük pozitif serum, ++: yüksek pozitif serum**

Blank	Blank	Neg	Neg	Düşük	Yüksek	1. Hasta	2. Hasta
0,098	0,083	0,145	0,152	0,248	0,649	1,051	1,264
0,096	0,083	0,138	0,123	0,177	0,509	0,986	1,214
0,091	0,08	0,134	0,114	0,161	0,512	0,98	1,021
0,08	0,08	0,112	0,099	0,133	0,42	0,865	0,984
0,08	0,08	0,011	0,095	0,113	0,27	0,735	0,859
0,07	0,07	0,095	0,095	0,102	0,219	0,672	0,851
0,065	0,065	0,092	0,089	0,094	0,164	0,526	0,831
0,059	0,06	0,092	0,089	0,092	0,129	0,502	0,815



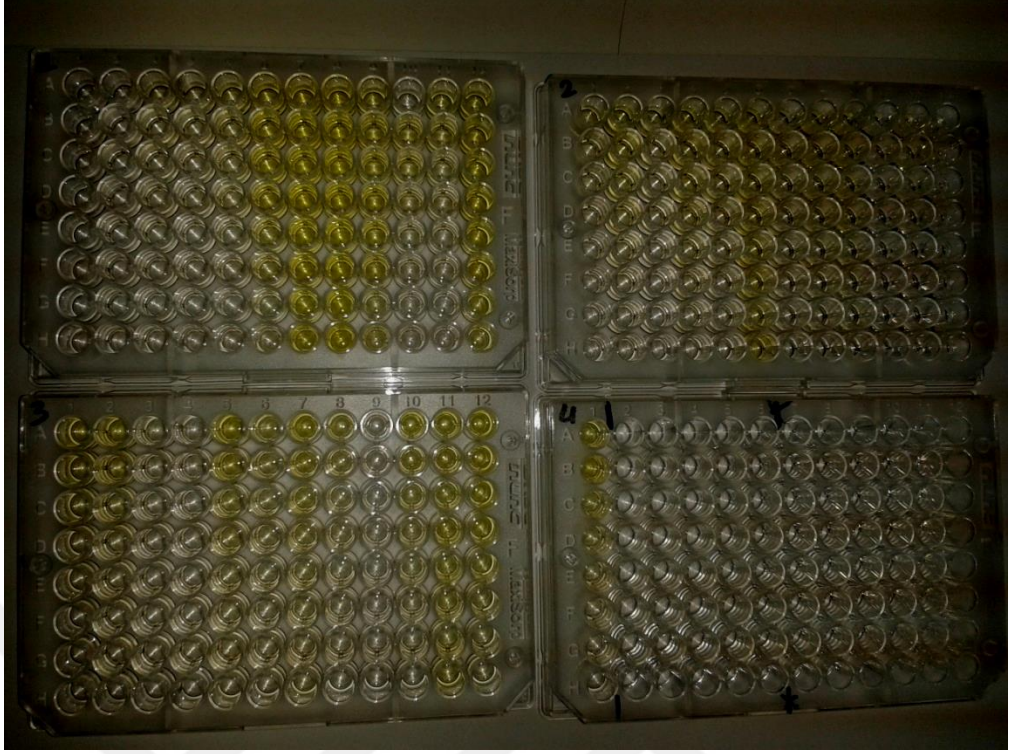
**Resim 13: 30. dakikada 450 nm’de okunan IgG ALP plağı**

**Tablo 5: 60. dakikada 450 nm'de okunan IgG ALP hasta değerleri.**  
**Neg: Negatif kontrol, Blank: boş ukur, +: düşük pozitif serum, ++: yüksek pozitif serum**

Blank	Blank	Neg	Neg	Düşük	Yüksek	1.Hasta	2.Hasta
0,104	0,087	0,341	0,262	0,522	1,523	2,403	2,859
0,1	0,087	0,225	0,192	0,34	1,225	1,979	2,765
0,098	0,087	0,177	0,169	0,295	1,21	1,806	2,429
0,098	0,079	0,156	0,13	0,231	0,972	1,256	2,272
0,091	0,077	0,151	0,108	0,167	0,596	1,214	1,95
0,09	0,69	0,109	0,106	0,137	0,443	1,115	1,904
0,9	0,06	0,105	0,097	0,116	0,295	1,114	1,073
0,09	0,04	0,102	0,097	0,109	0,203	1,102	1,045



**Resim 14: 60. dakikada 450 nm'de okunan IgG ALP ELISA plağı.**



**Resim 15: Bir saat çalışma sonunda IgG ALP ELISA plakları**



## 7. TARTIŞMA

*Echinococcus granulosus* insanda ve birçok evcil hayvanda “kistik ekinokokkozis”e neden olan bir faktördür. Dünyada ve Türkiye’de en önemli sağlık ve ekonomik problemlerden biri olarak güncelliğini korumaktadır. Metasestodlarla enfeksiyon, şiddetli hastalıklara ve yüksek ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Akgün 2008; Šnábel 2009).

KE’nin endemik olarak bulunduğu ve sıklığının en yüksek olduğu bölgeler; Orta Doğu, Orta Asya, Kuzey ve Doğu Afrika, Avustralya ve Güney Amerika’dır (Santivañez 2008; Schneider 2008).

Türkiye’de tarama çalışmaları fazla olmadığından insanlardaki prevalans hastane kayıtlarına dayanmaktadır ve prevalans tahminen 0,8-2.0/100.000 olarak belirtilmiştir (Nolan 2005).

**Dünya’da** *Echinococcus granulosus* suşlarının genotiplendirilmesi için yapılan moleküler epidemiyolojik çalışmalarda; PZR, PZR-RFLP, PZR-SSCP, RAPD-PZR, RT-PZR (QPZR), Nested PZR, Multipleks PZR, Reverse Transkriptaz PZR (RT-PZR) Southern Blot, DNA Dizileme ve ddF (Dideoksi parmakizi) gibi birçok teknik kullanılmıştır. Yapılan mitokondrial CO1 ve NAD1 sekans çalışmalarına göre *Echinococcus granulosus*’un 10 farklı genetik tipi (G1-G10) tanımlanmıştır. Günümüzde ise bu genotiplerin bazıları aynı suş altında toplanmış ve beş suş belirlenmiştir (Eryıldız ve ark. 2012; Gökpınar ve ark. 2017; Ahn ve ark 2017).

**Japonya, Finlandiya ve Amerika Birleşik Devletlerinden** üç araştırmacının yaptığı moleküler çalışmalarda G1, G6 ve G7 suşlarına rastlanmıştır. (Ito ve ark. 2017)

**İspanya’daki** çalışmalarda, RAPD-PZR ve Sekans yöntemi birlikte kullanılarak genotiplendirme yapılmış; koyun, sığır, keçi, domuz, yabani ayılar ve insanların G1 suşu ile atların G4 suşu ile enfekte olduğu bildirilmiştir. Ayrıca domuz, keçi ve yabani ayılarda G7 suşu da saptanmıştır (Mwambete 2004).

**Bulgaristan**'da sığır, koyun, domuz, çakal ve kurt örnekleriyle yapılan nükleer ve mitokondrial gen dizilerinin incelenmesi sonucunda baskın olan suşun G1 suşu olduğu belirtilmiştir (Bowles 1992).

**Meksika**'da, DNA Sekansı, PZR- RFLP ve RAPD-PZR yöntemleri kullanılarak, domuz örneklerini infekte eden *Echinococcus granulosus* suşunun, Polonya domuz izolatıyla aynı olduğu saptanmıştır (Ütük 2005).

**İran**'da koyun, keçi ve sığırların hidatik kistlerinin sebebinin G1 suşu olduğu tespit edilmiştir (Parsa 2011). Jafari ve ark'nın 50 hastadan aldıkları örneklerin G1, G3 ve G6 suşu bakımından pozitif olduğu bildirilmiştir (Jafari ve ark. 2017). Yine İran'da 138 insan ve koyun örneğinde elde edilen suşun baskın olarak G1, daha sonra G3 ve çok azının da G6 suşu olduğu raporlanmıştır (Nikmanesh ve ark. 2017).

**Tunus**'da insan, sığır, koyun ve deve izolatları PZR-RFLP yöntemi ile incelenmiş ve 40 izolatın CO1 gen bölgesi dizilerek 37'sinin (insan, sığır, koyun) G1 suşu ile üç deve izolatının ise G6 suşu ile infekte oldukları saptanmıştır (Parsa 2011).

**Sudan**'da 50 tek hörgüçlü deve hidatik kist izolatlarının NAD1 ve CO1 genleri DNA Sekansı yöntemiyle incelenmiş ve 49 izolatın G6 suşu ile infekte olduğu, bir izolatın ise G5 suşu ile infekte olduğu bildirilmiştir (Ahmed 2013).

**Güney Afrika**'da 32 insan hidatik kist örneği, PZR-RFLP ve DNA dizileme teknikleri birlikte kullanılarak incelenmiş ve insanların *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1-G3) (%81), *Echinococcus canadensis* (%16) ve *Echinococcus ortleppi* (%3) suşları ile infekte oldukları tespit edilmiştir. Güney Afrika'daki insanlarda G5 ve G7 suşları ilk defa gözlenmiştir (Mogoye 2013).

**Çin**'de 84 izolatın mitokondrial NAD1 ve ATP6 gen bölgeleri DNA dizileme yöntemiyle incelenmiş ve 82 izolatta G1 suşu, iki insan izolatında ise G3 suşu tespit edilmiştir (Yan 2013).

**Polonya**'da, *Echinococcus granulosus*'un insan ve domuz izolatlarının tipini belirlemek amacıyla bir hastadan aspirasyon yöntemiyle alınan biyopsi materyalinin, nükleer (ribozomal ITS-1) ve mitokondrial (NAD1) dizilerini PZR-RFLP ve DNA dizileme yöntemleriyle incelemişler ve hastanın yaygın olan G1 suşu ile infekte

olmadığını saptamışlardır. Hastanın ITS-1 gen bölgesinin PZR-RFLP analizi sonucunda domuz suşuna çok benzeyen fakat domuz suşu ve daha önce bildirilmiş suşlardan farklı bir suşla infekte olduğunu saptanmıştır (Varcasia 2006).

Polonya’da yapılan bir başka çalışmada iki domuz ve üç insan karaciğer örneğinde G7, koyunda ise G1 suşuna rastlanmıştır (Salamatin ve ark. 2017).

**Romanya**’da avlanan 290 vahşi hayvanın (267 yaban ayısı, 21 kızıl geyik ve iki yaban koyunu) nekropsisi esnasında 35 tanesinde (33 yaban ayısı ve 2 kızıl geyik) hidatik kistler görülmüştür. Kistlerin PZR ve PZR-RFLP yöntemleri ile incelenmesi sonucunda; yaban ayılarında G1 ve G7 suşları ve kızıl geyiklerde G1 suşu tespit edilmiştir (Breyer 2004).

Ülkemizdeki *Echinococcus granulosus* suşlarının karakterizasyonu hakkında yapılan moleküler çalışmalarda PZR, PZR-RFLP, RAPD-PZR, PZR-SSCP ve DNA dizileme gibi farklı moleküler yöntemler kullanılmıştır.

Türkiye’nin Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesini kapsayan bir çalışmada, 205 *Echinococcus granulosus* izolatının (179 koyun, 19 sığır ve 7 keçi) ribozomal ITS-1 gen bölgesi PZR-RFLP yöntemi ile incelenmiştir. PZR-RFLP analizi sonucu elde edilen elektroforez band profilleri aynı olduğu için seçilen dört sığır, üç koyun ve dört keçi izolatının mitokondrial CO1 gen bölgesi DNA dizileme yöntemi ile incelenmiştir. Tüm izolatların G1 suşu olduğu bildirilmiştir (Ütük 2008).

Türkiye’nin batı bölgesinde, 22 *Echinococcus granulosus* izolatının (12 koyun, 10 insan) mitokondrial COX1 ve NAD1 genleri DNA dizileme yöntemiyle incelenmiş ve 17 izolatta G1 suşu, bir koyun izolatında G3 suşu ve başka bir koyun izolatında G1/G3 suşu bulunmuştur. İki koyun ve bir insan izolatında ise ilk defa G7 suşu tespit edilmiştir (Šnábel ve ark 2009).

Erzurumda 1758 sığır örneğinde %33,9 oranında kist saptanmıştır. 220 kistli örneğin (173 akciğer, 47 karaciğer) germinal mebranından elde edilen materyalle yapılan çalışmada 147’sinin G1-G3 kompleksi olduğu, 73’ünün sadece CO1 gen bölgesinin çalışılıp bunlardan yedisinin 446 bp baz verdiği bildirilmiştir (Şimşek 2010).

Ütük ve ark'nın hayvan müzesinden elde ettikleri 2008'de otopsi yapılmış bir at karaciğerinde yaptıkları çalışma sonucunda etk in suşun G1-G3 suşu olduğu görülmüştür (Ütük ve ark. 2013).

Adana'nın Çukurova bölgesinde 58 örnekte (42 insan,13 sığır, 3 koyun) yapılan çalışmada etkin suşun %100 G1 suşu olduğu belirtilmiştir (Eroğlu ve ark. 2016).

Kırıkkale Hasandede Mezbahası'nda kesimi yapılan sığır örneklerinin moleküler incelenmesi sonucu 20 örneğin G1-G3 *Echinococcus granulosus sensu stricto* türü ile enfekte olduğu anlaşılmıştır (Gökpınar 2017).

Öge ve ark'nın Ankara'daki köpeklerde yaptıkları coprodiagnosis çalışmasında 14 örneğin G1 suşu ile enfekte olduğu anlaşılmıştır (Öge ve ark. 2017).

Türkiye'nin değişik bölgelerinden elde edilen 38 sığır ve 31 koyun örneği üzerinde yapılan başka bir çalışmada da paralel sonuçlar elde edilmiş ve G1 suşunun moleküler tanısı yapılmıştır (Kınkar ve ark 2016).

Çalışmamızın sonucunda, enfekte olmuş insanların karaciğerinden alınan toplam 33 hidatik kist örneği PZR, PZR-RFLP, DNA Dizileme yöntemleri kullanılarak tüm insan örneklerini enfekte eden yaygın suşun *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1-G3) olduğu bulunmuştur.

Moleküler çalışmada CO1 ve NAD1 genleri ve ITS-1 gen bölgesi tüm izolatlarda amplifiye edilmiştir. CO1 ve NAD1 genlerine ait amplikonlar [CO1 (446 baz çifti) ve NAD1 (378 baz çifti)] agaroz jel üzerinde elektroforez işlemi ile yürütüldüklerinde tek bir bant verdiği gözlemlenmiştir (Şekil 11-12). CO1 ve NAD1 sekans sonuçları hem birbirleriyle hemde referans dizisiyle homolog olup birkaç baz farklılığı göstermiştir. Aynı konaktan alınan kistlerden elde edilen amplikonların, agaroz jel elektroforezi sırasında elde edilen bantlarında boyut farklılığı saptanmamıştır. CO1, NAD1ve ITS-Igenlerine ait amplikonlar daha önceki çalışmalardan elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir (Xue 1993; Mwambete 2004; Ütük 2008; Yıldız ve ark. 2010; Ergin ve ark. 2010; Eryıldız 2010; Parsa 2011; Mogoye 2013;Adwan 2013; Yan 2013; Ahmed 2013, Öztatlıcı 2013; Altıntaş ve ark. 2013).

İnsandan elde edilen kist örneklerinin spesifik IgG antikor bakımından pozitif olduğu saptanmıştır. Antikor titrelerinin bazı hastalarda düşük, bazılarında ise çok yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 3,4). ELISA plaklarındaki renklenmenin cihaz okuma sonuçlarını desteklemesi, serum ve konjuge dilüsyonlarının hassas şekilde yapıldığının ve herhangi bir kontaminasyonun oluşmadığının göstergesidir.



## 8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın amacı, Manisa ve çevre illerde Kistik Ekinokokkozis tanısı almış 50 kişilik hasta popülasyonundaki, 33 bireyden elde edilen kist içeriği ve germinal membrandan elde edilen *Echinococcus granulosus* DNA 'sının; DNA Dizi Analizi Tekniği ile dizilenerek sonuçların ELISA testi sonuçları ile karşılaştırılmasıdır.

Sonuç olarak; çalışmamızda elde ettiğimiz 33 insan örneğinin serolojik ve moleküler bulguları, Türkiye'nin ve Dünya'nın farklı bölgelerinde yapılmış olan çalışmalardan elde edilen bulgularla benzerlik göstermiştir (Xue 1993; Parsa 2011; Mogoye 2013; Mwambete 2004; Eryıldız ve ark. 2012; Adwan 2013; Yan 2013; Ahmed 2013, Altıntaş ve ark. 2013; Eroğlu ve ark. 2016; Gökpınar ve ark 2017).

Türkiye'nin Manisa ili ve çevresinde Kistik Ekinokokkozisli hasta örneklerinin DNA Dizi Analizi Tekniği kullanılarak tespiti çalışmamızda, hastaların *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1/G3 ) ile infekte olduğu saptanmıştır. Dizi analizi verileri ile KE'li hastalardaki spesifik immun yanıtın tür ilişkili olup olmadığının araştırılabilmesi için farklı tür ya da genotipler ile infekte hastaların karşılaştırılması gerekmektedir. Bizim hastalarımızın tamamının *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1/G3 ) ile infekte olması nedeniyle bu yapılamamıştır.

Ancak genotiplerin birçoğu için coğrafi dağılım, insan ve hayvanlarda konak ilişkileri, klinik sonuçlar ve patoloji gibi hala yetersiz bilgiye sahibiz. Dolayısıyla, bu araştırma için daha fazla ve özellikle daha geniş hasta grupları ve farklı genotiplere sahip (eğer mümkünse) KE'li hastalar ile daha ileri araştırmaların sonuçlarını görmek ilginç olacaktır. Bu açıdan çalışmamız, özgül türler veya genotipler ile klinik sonuçlar arasındaki ilişkiyi ve Türk insan konakçılardan türetilen parazit materyalini kullanan serolojik sonuçları araştırması açısından özgün bir çalışma niteliği taşımaktadır.

## 9.KAYNAKLAR

Ahmadi N, Dalimi A. Molecular Characterization of *Echinococcus granulosus* Isolated from Sheep and Camel in Iran. Arch. Razi Ins. 2002; (53).

Ahmed ME, Eltom KH, Musa NO, Ali IA, Elamin FM, Grobusch MP, Aradaib IE. First Report On Circulation Of *Echinococcus Ortleppi* In The One Humped Camel (*Camelus Dromedaries*), Sudan. BMC Vet Res. 2013; 25(9):127.

Akgün S. *Echinococcus Granulosus*'a Karşı Oluşan Antikorların IHA, IFA Ve ELISA İle Tespiti Ve Western Blot İle Antikor Çeşitliliğinin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi Aralık 2008.

Altıntaş N, Doğanay A, Kistik Ekinokokkozis. Zoonozlar: Hayvanlardan İnsanlara Bulaşan Enfeksiyonlar. Editörler: Doğanay A, Altıntaş N. 2009, 901-937.

Altıntaş N, Özcel M, Kist Hidatikli Hastalarda Operasyon Öncesi Ve Sonrası IFAT İle IgG Ve IgM Antikorlarının Araştırılması. T Parazit Derg. 1991; 15: 31-40.

Altıntaş N, Yazar S. Kistik Ekinokokkoz'da Tanı. T. Parazit Derg. 1999; 23(2): 160-168.

Altıntaş N, Yolasığmaz A, Kilimcioğlu A, Şimşek S. *Echinococcus Granulosus*'da Moleküler Biyolojik Yapı Ve Çalışmalar. Moleküler Parazitoloji. 2009; 593-62.

Altıntaş N. ,Echinococcosis, Hidatidoloji Derneği Yayın No:1, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova, İzmir; 2004, s: 1-6.

Altıntaş N. Kist Hidatik'in Dünya Epidemiyolojisinin Belirlenmesinde Moleküler Yöntemlerin Yeri. KLİMİK 2005 XII. Türk Mikrobiyoloji Ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Özet Kitabı, 2005, 55-57.

Altıntaş Nuray, Öztatlıcı M, Altıntaş Nazmiye, Ünver A, Sakarya A. Manisa İlinde *Echinococcus granulosus*'un Sığır İzolatlarının Moleküler Analizi. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2013; 19 (3): 455-459.

Altintas N. Parasitic Zoonotic Diseases İn Turkey. Veterinaria Italiana. 2008; 44(4) October-December: 633-646.

Alvarez Rojas CA, Romig T, Lightowlers MW. *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes infecting humans--review of current knowledge. Int J Parasitol. 2014;44(1):9-18.

Bowles J, Blair D, Mcmanus DP: Genetic Variants Within The Genus *Echinococcus* İdentified By Mitochondrial DNA Sequencing. Mol Biochem Parasitol. 1992; 54: 165-174

Bowles J, McManus DP. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. Mol Biochem Parasitol. 1993 Feb; 57: 231-239.

Breyer I, Georgieva D, Kurdova R, Gottstein B: *Echinococcus Granulosus* Strain Typing İn Bulgaria: The G1 Genotype İs Predominant İn İntermediate And Definitive Wild Hosts. Parasitol Res, 2004; 93: 127-130.

Çelik, T *Echinococcus granulosus* Antijenlerinin İzolasyonu Ve Tanıdaki Değerlerinin Araştırılması Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2006, Ankara ( Danışman: Prof. Dr. Çiğdem GÜNGÖR).

Ergin S, Saribas S, Yuksel P, Zengin K, Midilli K, Adas G, Arikan S, Aslan M, Uysal H, Caliskan R, Oner A, Kucukbasmaci O, Kaygusuz A, Torun M.M, Kocazeybek B. Genotypic characterisation of *Echinococcus granulosus* isolated from human in Turkey. African Journal of Microbiology Research, 2010; 4 (7), pp. 551-555

Eroğlu F, Genç A, Koltaş İ.S. adana ilindeki *Echinococcus granulosus* izolatlarının PCR-RFLP Yöntemi İle Genotiplendirilmesi. Zirve Tıp Dergisi. 2016; 1(1) :22-25.

Ertabaklar H, Dayanır Y, Ertuğ S, Aydın İlinin Farklı Bölgelerinde Ultrason Ve Serolojik Yöntemlerle Kistik Ekinokokkozis Araştırılması Ve Eğitim Çalışmaları, Türkiye Parazitoloji Dergisi. 2012; 36: 142-6.

Eryıldız C, Şakru N, Isolates of *Echinococcus granulosus* in the Thrace Region, Turkey. Balkan Med. 2012; 29: 261-7.



Eryıldız C, Şakru N. Molecular Characterization of Human and Animal *Echinococcus granulosus* İzolatlarının Genotiplendirilmesi. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 2010, Edirne (Danışman: Doç. Dr. Nermin ŞAKRU)

Gökpınar S, Değirmenci R, Yıldız K. Kırıkkale’de kesilen sığırlarda *Echinococcus granulosus*’un Moleküler Olarak Genotiplendirilmesi. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2017; 64: 51-57

Gündoğdu C, Arslan R, Arslan M, Gıcık Y. Erzurum Ve Çevresinde İnsanlarda Kistik Ve Alveolar Ekinokokkozis Olgularının Değerlendirilmesi Türkiye Parazitoloji Dergisi. 2005; 29 (2):163-166.

Ito A, Nakao M, Lavikainen A, Hoberg E. Cystic echinococcosis: Future perspectives of molecular epidemiology. Acta Tropica, 2017, 165:3-9.

Jafari R, Sanei B, Baradaran A, Spotin A, Bagherpour B, . Yousofi Darani H. Genetic characterization of *Echinococcus granulosus* strains isolated from humans based on nad1 and cox1 gene analysis in Isfahan, central Iran. Journal of Helminthology, 2017.

Khachatryan A.S. Analysis of Lethality in Echinococcal Disease. Korean J Parasitol, 2017, 55 (5):549-553.

Kinkar L, Laurimäe T, Simsek S, Balkaya I, Casulli A, Manfredi M.T, Gordo F.P, Varcasia A, Lavikainen A, González L.M, Rehbein S, Giessen J, Sprong H, Saarma U. High resolution phylogeography of zoonotic tapeworm *Echinococcus granulosus sensu stricto* genotype G1 with an emphasis on its distribution in Turkey, Italy and Spain. Cambridge University Press. 2016; 143: 1790–1801.

Köksal A, Arhan M, Oğuz D, Kist Hidatik, Güncel Gastroenteroloji, 2004;8(1) Ankara.

Kuru B.B, Aypak S, Aysul N. Aydın Yöresindeki Köpeklerde *Echinococcus granulosus* Yaygınlığının Polimer Zincir Reaksiyonu İle Belirlenmesi. Türkiye Parazitol Derg. 2013; 37: 78-83

Leung KH, Yip SP. Single strand conformation polymorphism. In: Walker JM, Rapley R (Eds.). Molecular biometrics handbook. 2nd ed. New Jersey: Humana Press. 200; p.117-31.

Mogoye BK, Menezes CN, Wong ML, Stacey S, Von Delft D, Wahlers K, Wassermann M, Romig T, Kern P, Grobusch MP, Freaan J. First Insights Into Species And Genotypes Of *Echinococcus* In South Africa. *Vet Parasitol.* 2013;196(3-4):427-32.

Mwambete KD, Ponce-Gordo F, Cuesta-Bandera C. Genetic Identification And Host Range Of The Spanish Strains Of *Echinococcus granulosus*. *Acta Trop.* 2004;91(2):87-93.

Nikmanesh B, Mirhendi H, Mahmoudi S, Bagher Rokni M, B. Multilocus sequence analysis of *Echinococcus granulosus* strains isolated from humans and animals in Iran. *Experimental Parasitolog.* 2017; 183: 50-55

Nolan MJ, Cribb TH. The Use And Implications Of Ribosomal DNA Sequencing For The Discrimination Of Digenean Species. 2005; 60: 101–163.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(8):2766-70.

Oruç E, Yıldırım N, Topal N, Kılıçturgay S, Akgöz S, Savcı G, Difüzyon Ağırlıklı MR Görüntülemenin Karaciğer Hidatik Kistlerinin Sınıflandırmasındaki Ve Basit Kistlerle Apselelerden Ayırt Edilmesindeki Rolü, *Türk Radyoloji Derneği.* 2010; 16: 279-287.

Öge H, Öge S, Gönenç B, Sarımehmetoğlu O, Özbakış G. Coprodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in dogs from Ankara, Turkey. *Veterinary Parasitology.* 2017; 242 :44-46.

Özdemir A. Adana Ve Çevresinde Yaşayan İnsanlarda Kistik Ekinokokkoz (Hidatidoz) Antikorlarının Serolojik Yöntemle Araştırılması, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2005, Adana.( Danışman: Doç.Dr. İ.Soner KOLTAŞ).

Parsa F, Haghpanah B, Pestechian N, Salehi M. Molecular Epidemiology Of *Echinococcus Granulosus* Strains In Domestic Herbivores Of Lorestan, Iran. *JJM*. 2011; 4(2): 123-130.

Santivañez SJ, Gutierrez AM, Rosenzvit MC, Muzulin PM, Rodriguez ML, Vasquez JC, Rodriguez S, Gonzalez AE, Gilman RH, Garcia HH. Human Hydatid Disease In Peru Is Basically Restricted To *Echinococcus Granulosus* Genotype G1. *Am J Trop Med Hyg*. 2008; 79(1): 89–92.

Schneider R, Gollackner B, Edel B, Schmid K, Wrba F, Tucek G, Walochnik J, Auer H. Development Of A New PCR Protocol For The Detection Of Species And Genotypes (Strains) Of *Echinococcus* In Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. Elsevier. 2008; 1065–1071.

Sharbatkhori M, Mirhendi H, Jex AR, Pangasa A, Campbell BE, Kia EB, Eshraghian MR, Harandi MF, Gasser RB: Genetic categorization of *Echinococcus granulosus* from humans and herbivorous hosts in Iran using an integrated mutation scanning-phylogenetic approach. *Electrophoresis*, 30, 2648-2655, 2009

Sırmalı M. Akciğer Kist Hidatikleri Ve Cerrahi Tedavisi, *Tıp Araştırmaları Dergisi*.2005; 3 (3): 46-49.

Simsek S, Balkaya I, Koroglu E. Epidemiological survey and molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in cattle in an endemic area of eastern Turkey. *Veterinary Parasitology*. 2010; 172: 347–349.

Šnábel V, Altintas Nazmiye, D'Amelio S, Nakao M, Romig T Yolasiğmaz A, Gunes K, M. Turk M, Busi M, Hüttner M, Ševcová D, Ito A, Altintas Nuray, Dubinský P. Cystic echinococcosis in Turkey: genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country. *Parasitol Res*. 2009; 105:145–154.

Utuk A.E, Simsek S. Molecular characterization of the horse isolate of *Echinococcus granulosus* in Turkey. *Journal of Helminthology*.2013; 87: 305–308.

Utuk AE, Piskin F.C, Dalkilic B. Molecular Characterization of Sheep Isolates of *Echinococcus granulosus* in Kilis Province. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2012; 18 (Suppl-A): A35-A38

Utuk AE, Piskin F.C. Üç Aylık Bir Kuzuda Kistik Ekinokokkozis'in Moleküler Tanısı. F.Ü.Sag. Bil. Vet. Derg. 2011; 25 (2): 95 – 97

Utuk AE, Simsek S, Koroglu E, McManus DP. Molecular genetic characterization of different isolates of *Echinococcus granulosus* in east and southeast regions of Turkey. Acta Trop. 2008;107(2):192-4.

Ütük AE. *Echinococcus granulosus*'un Doğu Ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi İzolatlarının Moleküler Ayrımı. Doktora Tezi. 2008, Elazığ.

Ütük E, Şimşek S, Ekinokokkus ve Suş Kavramı, Türkiye Parazitoloji Dergisi.2008; 32 (1): 35-41.

Ütük E,Şimşek S, Köroğlu E, *Echinococcus* Cinsinin Moleküler Genetik Karakterizasyonu, Türkiye Parazitoloji Dergisi.2005; 29 (3): 171-176.

Varcasia A, Canu S, Lightowlers MW, Scala A, Garippa G: Molecular Characterization Of *Echinococcus granulosus* Strains İn Sardinia. *Parasitol Res.*2006; 98, 273-277.

Vural G, Unsal Baca A, Gauci CG, Bagci O, Gicik Y, Lightowlers MW. Variability in the *Echinococcus granulosus* cytochrome c oxidase 1 mitochondrial gene sequence 72 from livestock in Turkey and a re-appraisal of the G1-3 genotype cluster. Vet Parasitol. 2008;154(3-4):347-50.

Yan N, Nie HM, Jiang ZR, Yang AG, Deng SJ, Guo L, Yu H, Yan YB, Tsering D, Kong WS, Wang N, Wang JH, Xie Y, Fu Y, Yang DY, Wang SX, Gu XB, Peng XR, Yang GY. Genetic Variability Of *Echinococcus granulosus* From The Tibetan Plateau İnferred By Mitochondrial DNA Sequences. Vet Parasitol.2013, 1;196(1-2):179-83.

Yılmaz G. Babür C. Diagnosis of Echinococcosis Türk Hijyen Ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 2007 Sayı 3.

## **EKLER**

EK 1. Olgu Rapor Formu

EK 2. Hasta Anket Formu

EK 3. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

EK 4. Yönetim Kurul Kararı

EK 5: Etik Kurul Onay Formu

EK 6: Tez Çalışması Orjinallik Raporu

EK 7: Uluslararası Poster Bildiri

EK 8: Özgeçmiş

**EK.1**

**Çalışmanın adı:**

**Kistik Ekinokokkozisli Hastalarda Serolojik Sonuçların Genotip İlişkisinin Dizi Analizi Sonuçları İle Karşılaştırılarak Araştırılması**

**OLGU RAPOR FORMU**

<b>Hastanın Kod Numarası:</b>		<b>Tarih:</b>	
<b>Adı Soyadı:</b>		<b>Yaşadığı yer:</b>	
<b>Yaşı:</b>		<b>Telefonu:</b>	
<b>Cinsiyeti:</b>		<b>Adresi:</b>	

<b>Klinik Semptomlar</b>	<b>Ele gelen kitle</b>	<b>Ağrı</b>	<b>Hepatomegali</b>	<b>Diğer bulgular</b>

<b>Ultrason Sonucu:</b>	<b>Negatif</b>	<b>CL</b>	<b>CE1</b>	<b>CE2</b>	<b>CE3</b>	<b>CE4</b>	<b>CE5</b>

<b>Kitle sayısı:</b>		<b>Lokalizasyon:</b>		<b>Boyut:</b>	

<b>Serolojik Sonuçlar:</b>	<b>ELİSA</b>	<b>WB</b>
<b>Moleküler Sonuçlar</b>	<b>RT-PCR</b>	

**EK.2**

**Çalışmanın adı:**

**Kistik Ekinokokkozisli Hastalarda Serolojik Sonuçların Genotip İlişkisinin Dizi Analizi Sonuçları İle Karşılaştırılarak Araştırılması**

**HASTA ANKET FORMU**

<b>Hastanın Kod Numarası:</b>		<b>Tarih:</b>	
<b>Adı Soyadı:</b>		<b>Yaşadığı yer:</b>	
<b>Yaşı:</b>		<b>Telefon:</b>	
<b>Cinsiyeti:</b>		<b>Adres:</b>	

<b>Meslek:</b>				
<b>Hayvancılıkla uğraşiyor musunuz?</b>				
<b>Evde köpek besliyor musunuz?</b>		<b>Sayısı:</b>		
<b>Bu hastalığı hiç duydunuz mu?</b>				
<b>Kesilen hayvanların organlarında</b>				



<b>kistlere rastladınız mı?</b>				
<b>Bu kistli organları ne yapıyorsunuz?</b>				

**KE için**

<b>Ameliyat öyküsü:</b>	
<b>Daha önce tanı almış mı?</b>	

<b>Aldıysa hangi yöntemlerle?</b>	<b>Seroloji</b>	<b>US</b>	<b>X Ray</b>	<b>Diğer</b>

<b>İlaç tedavisi almış mı?</b>	<b>Evet</b>	<b>Hayır</b>	<b>Ne kadar süre?</b>	<b>Ne zaman?</b>
<b>Ailede başka hasta var mı?</b>				

### EK.3

#### BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (FORM 17)

##### LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

#### ÇALIŞMANIN AMACI NEDİR?

Kistik ekinokokkozis (KE) hayvanlardan (özellikle köpeklerden) insanlara geçen bir hastalıktır. Hastalık insana geçtikten sonra karaciğerde oluşacak lezyonun; Ultrasonografi, Bilgisayarlı Tomografi, Magnetik Rezonans gibi tıbbi görüntüleme teknikleri ile tanınabilmesi ya da sizin karın ağrısı, sağ tarafınızda sırta vuran bir ağrı, sarılık gibi hastalık belirtilerini hissedebilmeniz için 5-15 yıl gibi bir sürenin geçmesi gerekmektedir. Hastalığın tanısı günümüzde radyolojik tanı yöntemleri ile konulmaya çalışılmasına rağmen; kistin tümör, apse, basit kist gibi diğer yer kaplayan olgularla ayırıcı tanısının yapılabilmesi için ön tanının, mutlaka serolojik tanı yöntemleriyle desteklenmesi gerekmektedir. Tedavi sonrası hastaların takiplerinde ise radyolojik tanı yöntemlerinin yetersiz kaldığı ve hastaların özellikle serolojik tanı yöntemleri ile takip edilmesinin önemli olduğu vurgulanmaktadır. Serolojik testlerin, enfeksiyonlu kişilerin serumundaki spesifik antikorları tespit etme kapasitesinin (sensitivite) ve KE hastalığı olanları diğer parazitik ve klinik hastalığı olanlardan ayırma kapasitesinin (spesifite); kullanılan antijenin cinsi ve hazırlama şekli, değişik pozitiflik kriterleri, kistin canlılığı ve lokalizasyonu, parazitin suşu gibi birçok sebebe bağlı olarak farklı oldukları bilinmektedir. Parazitin genotipinin belirlenmesi hastalığın gelişiminin seyri bakımından son derece önemlidir.

Çalışmamızın amacı; elde edilecek dizi analizi verileri ile KE'li hastalardaki *Echinococ* türünün saptanması ve bu hastalardaki spesifik immün yanıtın tür ilişkili olup olmadığının araştırılmasıdır.

### **KATILMA KOŞULLARI NEDİR?**

Bu çalışmaya dâhil edilebilmeniz için kistik ekinokokkozis hastası olmanız gerekir.

### **NASIL BİR UYGULAMA YAPILACAKTIR?**

Olguların sosyodemografik özelliklerini ve yaşadıkları çevresel koşulları belirlemek amacıyla hazırlanacak anket formu uygulanacaktır.

Ege Üniversitesi ve Celal Bayar Üniversitesi Hastanesine başvuran 50 kişiden serolojik incelemeye uygun şekilde jelli vakumlu kan tüplerine 5 ml kan alınacaktır. Toplanan kanlar 4000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılacak ve uygun koşullarda (-70°C dipfrizde) saklanmak üzere 1.5 ml lik ependorf tüplerine aktarılacaktır.

Alınan kan sadece bu araştırmada kullanılacak olup bunun dışında hiç bir araştırmada kullanılmayacaktır. Doktorunuz ameliyat olup olmayacağınıza karar verecek ve işlem gerçekleştirilecektir. Ameliyat esnasında sizden çıkarılacak olan kistin sıvısı ya da kist membranı da çalışmamızda kullanılacaktır.

### **SORUMLULUKLARIM NEDİR?**

Araştırma ile ilgili olarak yalnızca kan vermek ve ameliyat esnasında çıkarılan kist sıvısının ya da membranının kullanılması için onay vermek sizin sorumluluklarınızdır.

Bu koşullara uymadığınız durumlarda araştırmacı sizi uygulama dışı bırakabilme yetkisine sahiptir.

### **KATILIMCI SAYISI NEDİR?**

Araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı 50 'dir.

### **KATILIMIM NE KADAR SÜRECEKTİR?**

Bu araştırmada yer almanız için öngörülen süre 2 yıldır.

### **ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI YARAR NEDİR?**

Bu araştırmada sizin için beklenen yararlar sizde hastalık oluşturan etkenin suşunun belirlenmesidir. Bu sayede hem sizin hastalığınızın seyrinde hem de diğer hastaların tanı ve takibinde önemli bilgiler edinmemize yardımcı olacaktır.

### **ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI RİSKLER NEDİR?**

Bu araştırmada sizden fazladan 2 ml (Bir çay kaşığı) / 5 ml (Bir tatlı kaşığı) kan alınacaktır. Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bayılma, ağrı ve/veya morarma sayılabilir. Ender durumlarda iğne deliğinin yerinde enfeksiyon ya da küçük bir kan pıhtısı olabilir. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.

### **ARAŞTIRMA SÜRECİNDE BİRLİKTE KULLANILMASININ SAKINCALI OLDUĞU BİLİLEN İLAÇLAR/BESİNLER NELERDİR?**

Yoktur.

### **HANGİ KOŞULLARDA ARAŞTIRMA DIŞI BIRAKILABİLİRİM?**

Uygulanan çalışma programını aksatmanız halinde doktorunuz sizin izniniz olmadan sizi çalışmadan çıkarabilir.

### **DIĞER TEDAVİLER NELERDİR?**

Yoktur.

### **ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ÇIKABİLECEK SORUNLAR İÇİN KİMİ ARAMALIYIM?**

Uygulama süresi boyunca, zorunlu olarak araştırma dışı ilaç almak durumunda kaldığınızda sorumlu araştırıcıyı önceden bilgilendirmek için, araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için 0 236 2331920-437 ya da 0 532 527 65 53 no.lu telefonda Yrd. Doç. Dr. Nuray ALTINTAŞ'a başvurabilirsiniz.

### **ÇALIŞMA KAPSAMINDAKİ GİDERLER KARŞILANACAK MIDIR?**

Yapılacak her tür tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.

### **ÇALIŞMAYI DESTEKLEYEN KURUM VAR MIDIR?**

Çalışmayı destekleyen kurum Celal Bayar Üniversitesi ve Ege Üniversitesi'dir (Yrd. Doç.Dr. Nuray ALTINTAŞ'a ait devam eden 2011-065 nolu proje ile Prof.Dr. Nazmiye Altıntaş'a ait devam eden 2011 TIP 099 nolu proje malzemelerinden yararlanılacaktır).

### **ÇALIŞMAYA KATILMAM NEDENİYLE HERHANGİ BİR ÖDEME YAPILACAK MIDIR?**

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır.

### **ARAŞTIRMAYA KATILMAYI KABUL ETMEMEM VEYA ARAŞTIRMADAN AYRILMAM DURUMUNDA NE YAPMAM GEREKİR?**

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; reddetme veya vazgeçme durumunda bile sonraki bakımınız garanti altına alınacaktır. Araştırmacı, uygulanan tedavi şemasının gereklerini yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız veya tedavinin etkinliğini artırmak vb. nedenlerle isteğiniz dışında ancak bilginiz dâhilinde sizi araştırmadan çıkarabilir. Bu durumda da sonraki bakımınız garanti altına alınacaktır.

Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

## KATILMAMA İLİŞKİN BİLGİLER KONUSUNDA GİZLİLİK SAĞLANABİLECEK MİDİR?

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

### Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren 3 sayfalık metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyorum ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

<b>VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASİNİN</b>		<b>İMZASI</b>
<b>ADI &amp; SOYADI</b>		
<b>ADRESİ</b>		
<b>TEL. &amp; FAKS</b>		
<b>TARİH</b>		

<b>ARAŞTIRMA EKİBİNDE YER ALAN VE YETKİN BİR ARAŞTIRMACININ</b>		<b>İMZASI</b>
<b>ADI &amp; SOYADI</b>		
<b>TARİH</b>		

<b>GEREKTIĞİ DURUMLARDA TANIK</b>		<b>İMZASI</b>
<b>ADI &amp; SOYADI</b>		
<b>GÖREVİ</b>		
<b>TARİH</b>		

Ek 4: Yönetim Kurul Kararı



T.C.  
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÖNETİM KURULU KARAR ÖRNEĞİ

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
28.08.2012	20	10

**Karar 4-** Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 09.08.2012 tarih 56 sayılı yazısı ve aynı tarih, 5 sayılı Akademik Kurul Kararı görüşülerek; Yüksek Lisans öğrencilerinden Özlem AKSOY'un "Kistik Ekinokokkozisli Hastalarda Serolojik Sonuçların Genotip İlişkisinin Dizi Analizi Sonuçları ile Karşılaştırılarak Araştırılması başlıklı tez konusunun Etik onaylarının alınması kaydı ile kabulüne **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi.

(İmza) Prof. Dr. İbrahim TUĞLU Enstitü Müdürü		
(İmza) Doç. Dr. Necip KUTLU Müdür Yardımcısı	(İmza) Doç. Dr. Enis CEZAYİRLİ Üye	(İmza) Prof. Dr. Gürbüz BÜYÜKYAZI Üye
(İmza) Yrd. Doç. Dr. Kamil VURAL Üye	Özcan GERÇEKER Enstitü Sekreteri Raportör	(İmza) Yrd. Doç. Dr. Adalet KUTLU Üye

Aşlı Gibidir  
04/09/2018

Aynur PALAMUTÇUOĞLU  
Enstitü Sekreteri





Ek 5: Etik Kurul Onay Formu

**EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzincan Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR  
Tel:0 232 390 4219 - 379 78 81 Fax: 0232 390 21 34  
e-mail: aetk@mal.ege.edu.tr - www.aetk.med.ege.edu.tr

**ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ**

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kistik Eksokokkosisli Hastalarda Serolojik Sonuçların Genotip İlgisinin Dizi Analizi Sonuçları ile Karşılaştırılarak Araştırması				
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU					
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd. Doç. Dr. Nuray ALTINTAS				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD.				
	DESTEKLEYİCİ					
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ					
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1 <input type="checkbox"/>	FAZ 2 <input type="checkbox"/>	FAZ 3 <input type="checkbox"/>	FAZ 4 <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon <input type="checkbox"/>	Yüksek Dost Araştırması <input type="checkbox"/>			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Diğer İse belirtiniz: <input type="checkbox"/>	Diğer Dep: <input type="checkbox"/>	TÜRK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASTI <input type="checkbox"/>

<b>DEĞERLENDİRİLEN BELGELER</b>	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	DİL		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	08.08.2012	—	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	08.08.2012	—	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
OLGU RAPOR FORMU	—	—	—	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	Karar No: 12-7/36	Tarihi: 15.08.2012
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen çok merkezli klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekliliği, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderilerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetlenmediği koşullarda başvuru formunda adı geçen merkezlerde araştırmaya başlanmasında etik açıdan sakınca olmadığının oy birliği ile karar verilmiştir.	

**EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

<b>ÇALIŞMA ESASI</b>	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
<b>BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:</b>	Prof. Dr. Kaan KAVAKLI

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyesi	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Onayett	Bilgi (*)	Kabulm (**)	İmza
Prof. Dr. Kaan KAVAKLI Başkan	Çocuk Sağlığı Hast. ve Çocuk Kan Hast.	E.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hast. AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Aytül ÖNAL Başkan Yardımcısı	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	<i>[Signature]</i>
Uzm. Ecz. Ebru BEDİR Raportör	Eczacılık	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Suna TOKSAVUL Üye	Protetik Diş Tedavisi	E.Ü. Diş Hek. Fakültesi Protetik Diş Tedavisi AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Bülent SEMERCİ Üye	Üroloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Üroloji AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	TOPLANTIYA KATILMADI

Araştırma Başvurusu Onay Belgesi

## EK 6: Tez Çalışması Orjinallik Raporu

T.C.  
**MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU**  
**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA**

Tez Adı

KİSTİK EKİNOKOKKOZİSLİ HASTALARDA SEROLOJİK SONUÇLARIN GENOTİP  
İLİŞKİSİNİN DİZİ ANALİZİ SONUÇLARI İLE KARŞILAŞTIRILARAK ARAŞTIRILMASI

Tezime ilişkin 17/07/2018 tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orjinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 30 'tür.

Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

18/07/2018

Adı Soyadı : ÖZLEM TÜRKÜM  
Öğrenci No : 3113010003  
Anabilim Dalı : TIBBİ BİYOLOJİ  
Programı : TIBBİ BİYOLOJİ

**DANIŞMAN ONAYI**  
UYGUNDUR.  
DOÇ.DR. NURAY BULUNTAŞ

### Açıklamalar

- 1-Tez Çalışması Orjinallik Raporu (TÇOR), TURNITIN İntihal Tespit Programı kullanımı için kişisel hesap alma hakkı bulunan tez danışmanları, Enstitülerde görevlendirilen personeller, Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nda görevlendirilen kütüphaneciler tarafından alınır.
- 2-Sayfa sayısı 400'den az olan tezler için tez savunmasından önce ve başarılı olması durumunda düzeltmelerden sonra olmak üzere 2 kez TÇOR alınır.(400 sayfadan fazla olan tezler 400 ve katları şeklinde bölünerek Turnitin veri tabanına yüklenmesi gerekmektedir. Bu gibi durumlarda benzerlik oranının hesaplanmasına ilişkin detaylı forma, kütüphane web sayfasında bulunan Turnitin kullanım kılavuzlarının altından erişilebilir.)
- 3-TÇOR, tezin yalnızca Kapak Sayfası, Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan kısmının tek bir dosya olarak intihal tespit programına yüklenmesi ile alınır.
- Programa yükleme yapılırken Dosya Başlığı (document title) olarak tez başlığının tamamı, Yazar Adı (author's first name) olarak öğrencinin adı, Yazar Soyadı (author's last name) olarak öğrencinin soyadı bilgisi yazılır.
- 4- TURNITIN İntihal tespit programına yüklenen dosyanın süreçlenmesinde, ilgili programdaki filtreleme seçenekleri aşağıdaki şekilde ayarlanır: - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 5 words)
- 5-**İsteğe bağlı ayarlar kısmından; "Ödevleri şuraya gönder?" seçeneği mutlaka DEPO YOK şeklinde işaretlenmesi gerekmektedir**; aksi durumda aynı tezin ikinci kez yüklenmesi durumunda benzerlik %100 çıkacaktır ve depodan tezi silmek çok uzun süreç gerektirecektir.
- 6- Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra, kaydedilmiş olan ekranın görüntüsünü sağ üst köşesinde yüzdelik sayı olarak belirtilen "benzerlik oranı," raporlamaya tabi tutulmuş olan dosyanın "toplam sayfa sayısı" ve raporlama işleminin yapıldığı "tarih" bilgisi, "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orjinallik Raporu" formuna işlenir.
- 7- **Benzerlik oranında tüm sorumluluk öğrenciye aittir.**
- 8-Tez savunma sınavı sonrasında başarılı bulunan öğrenci, tez savunma sınavı tarihi sonrasında tezde yapılmış muhtemel değişiklikleri içeren dosya kullanılarak alınmış ikinci bir intihal raporundaki bilgiler kullanılarak hazırlanmış ve tez danışmanı tarafından onaylanarak imzalanmış ikinci bir "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orjinallik Raporu"nu Enstitüye teslim etmekte yükümlüdür.
- 9-Turnitin Hakkında Bilgiler: <http://kutuphane.cbu.edu.tr/turnitin.9370.tr.html>



XXVII WORLD CONGRESS OF ECHINOCOCCOSIS

4<sup>th</sup> - 7<sup>th</sup> OCTOBER, 2017

ALGHERS, ALGERIA

FREE COMMUNICATIONS	Oral	Session	Video	Poster	X
<b>Title</b>	Could the results obtained with the application of ELISA and Western Blotting methods contribute to clinical outcomes in genotype-defined cystic echinococcosis patients?				
<b>Authors</b>	Nuray ALJINTAS, Ozlem AKSOY, Selda KARAMIL, Mesut AKIL, Mustafa OZTATLI, Murat SOZBILEN, Aslan SAKARYA, Nazmiye ALTINTAS				
<b>Presenting author affiliation</b>	Celal Bayar University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Manisa, TURKEY				
<b>ABSTRACT (500 words)</b>					
<i>Aim; Material and Methods; Results; Conclusion</i>					
<p><b>Aim;</b> Human cystic echinococcosis (CE) caused by infection with the metacestodes of the tapeworms <i>Echinococcus granulosus</i> s.s. is among the most pathogenic helminth zoonoses. Molecular identification of human CE cases is strongly recommended for better understanding of pathology and the course of infections as well as epidemiology. So, there may be a critical question whether or not there are characteristic or typical associations linking CE clinical outcomes with specific species or genotypes. Aim of this study is to investigate application of ELISA and Western Blotting methods could contribute to clinical outcomes in genotype-defined cystic echinococcosis patients.</p> <p><b>Material and Methods;</b> Thirty three human isolates and blood have been taken from patients who underwent surgery or percutaneous aspiration (PAIR) for therapeutic purposes at Ege University Hospital and Celal Bayar University Hospital. Fertility and the viability of the cysts were observed microscopically. For molecular evaluation, DNA was extracted from both germinal layer and protoscolices. The total genomic DNA was extracted using RTA-DNA Isolation Kit (Gebze / Kocaeli, Turkey) according to manufacturer instructions. After the PCR, to investigate the genetic characteristics of isolates, ribosomal ITS-1 gene region was digested with restriction endonucleases and deoxyribonucleic acid sequencing of the mitochondrial COX1 and NADH 1 genes were performed with ABI Prism Genetic Analyzer 310 instrument. Forward and reverse sequences of amplicons were examined with Sequencing Analysis software and then their alignment analyze were done by using SeqScape V2.6 software. After the alignment analyze all samples were examined with NCBI BLAST program (<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>) to compare other <i>E. granulosus</i> sequence data. Phylogenetic analysis of strains was done by Geneious software. All serum samples of patients were screened for the presence of <i>E. granulosus</i> IgG antibodies using in-house ELISA and WB tests.</p> <p><b>Results;</b> According to ELISA results, all sera from patients were seropositive and ranges were 1/640 - 1/5000. Immunoblot analysis of EgAg showed many protein bands of 8, 12, 20, 22, 24, 36, 75 and 90 kDa. Of them, 8-12 kDa bands (90%), 20-22 kDa and 36 kDa bands presented strong reactivity against human serum specimens. No serum samples from healthy control reacted with EgAg. As a result of our study all patients found to be infected with the <i>E. granulosus</i> G1 genotype. There is no consistent correlation between results of ELISA and Western Blotting, the number or size of cysts and genotype.</p>					

SECRETARIAT

E mail: [contact@chirurgiethoracique-babeloued.com](mailto:contact@chirurgiethoracique-babeloued.com)

Tel: 00 213 552 35 16 37

Web site: <http://chirurgiethoracique-babeloued.com/>

**EK 8: ÖZGEÇMİŞ**

Adı	Özlem	Soyadı	TÜRKÜM
Doğum Yeri	Niğde	Doğum Tarihi	03.06.1988
Uyruğu	TC	Tel	05547154193
E-mail	ozzlem_green@hotmail.com		

**Eğitim Düzeyi**

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	MCBÜ Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü	2011
Lise	Suphi Koyuncuoğlu (YDA) Lisesi	2007

**İş Deneyimi**

Görevi	Kurum	Süre (Ay/Yıl - Ay/Yıl)
Biyolog	Çeşme Özel Sissus Hastanesi	7 ay
Biyoloji Öğretmeni	Özel Bilgince Butik Dershanesi	3 ay
Biyoloji Öğretmeni	Milli Eğitim Bakanlığı	29.02.2016-Halen

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*					
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok iyi					
Almanca	Orta	Orta	Orta					
<b>Yabancı Dil Sınav Notu</b>								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFLİBT	TOEFLPBT	TOEFLCBT	FCE	CAE	CPE
	51,25							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	69,28	68,83	62,69
KPSS Puanı	77,29		

#### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office Programları	İyi

•Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

**EK: Diğer Bilimsel faaliyetler (yayın, kongre bildiri)**

**EK: 1 Diğer Bilimsel faaliyetler (yayın, kongre bildiri)**

#### POSTER /BİLDİRİ

1. Nuray ALTINTAS, **Ozlem AKSOY**, Selda KARAMIL, Mesut AKIL, Mustafa OZTATLICI, Murat SÖZBİLEN, Aslan SAKARYA, Nazmiye ALTINTAŞ. Could the results obtained with the application of ELISA and Western Blotting methods contribute to clinical outcomes in genotype-defined cystic echinococcosis patients? XXVII WORLD CONGRESS OF ECHINOCOCCOSIS. 04 - 07 October.2017.Algeria

2. Nazmiye ALTINTAŞ, **Özlem AKSOY**, Nuray ALTINTAŞ, Demet BULUT, Şebnem CİDDİ, Ayşegül ÜNVER. İzmir İlindeki Ekinokokkozisin Son Beş Yıldaki Dağılımı. 6. Ulusal Hidatidoloji Kongresi. 12-15 Eylül 2012.Gaziantep.

3. Nuray ALTINTAŞ, Demet BULUT, **Özlem AKSOY**, Şebnem CİDDİ, Ayşegül ÜNVER, Nazmiye ALTINTAŞ. Kistik Ekinokokkozisin Ekonomik Önemine Genel Bir Bakış. 6. Ulusal Hidatidoloji Kongresi. 12-15 Eylül 2012.Gaziantep.

4. Nuray ALTINTAŞ, Şebnem CİDDİ, **Özlem AKSOY**, Demet BULUT, Ayşegül ÜNVER, Nazmiye ALTINTAŞ. Manisa İlinde Kistik Ekinokokkozisin Son Beş Yıldaki Dağılımına İlişkin Bir Çalışma. 6. Ulusal Hidatidoloji Kongresi. 12-15 Eylül 2012. Gaziantep.

**KURSLAR:** Araştırma Planlama ve Analiz Yöntemleri Kursu (07-19 Mart 2012), Bilgisayar İşletmenliği Kursu (11.07.2014), FATİH Etkileşimli Tahta ve EBA V Sınıf Kursu (06.06.2016) , Çalışanların Temel İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitimi Kursu (15.06.2017).

**EĞİTİM:** Pedagojik Formasyon Eğitimi (23.03.2012), MCBÜ 2. Laboratuvar Güvenliği Uygulamalı Eğitimi (11.05.2012). Finansal Okuryazarlık Eğitimi (21.03.2017).

**SEMİNER:** QIAGEN, SABioscience PCR Array Semineri (28.03.2012), Optimization Techniques for Western Blot, Immunoprecipitation, and Immunohistochemistry Semineri ( 27.04.2012), Ulusal ve Uluslararası Eğitim Projeleri ve Örnek Projeler Semineri (03.08.2016), Milli Eğitim Sisteminde Öğretmenlik ve Elektronik Uygulamalar Semineri (28.07.2016), Etkili İletişim ve Etkili Sınıf Yönetimi Semineri (22.07.2016).

**KONGRE-SEMPOZYUM:** 6. Uluslararası Hidatidoloji Kongresi (12-15 Eylül 2012), Uluslararası Katılımlı Genotiplendirme Sempozyumu (19.06.2013), Kanser Biyolojisi ve Genetiği Sempozyumu (31.03.2013).

## **ÖDÜL:**

1- Nuray ALTINTAŞ, **Ozlem AKSOY**, Selda KARAMIL, Mesut AKIL, Mustafa OZTATLICI, Murat SÖZBİLEN, Aslan SAKARYA, Nazmiye ALTINTAŞ Cezayir de düzenlenen 27. World Congress

Echinococcosis" Kongresinde **Laboratuvar Araştırma Dalında "En İyi Poster Bildiri Ödülü"**. (04-07 Ekim 2017).

2- MCBÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü **"Örgün Öğretim Üçüncülük Ödülü."** (15.06.2011).

