

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA İLİNDE GÖRÜLEN E.GRANULOSUS  
SUŞLARININ PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE  
GENOTİPLENDİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Cemile GÜNBEĞİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Fadile Yıldız ZEYREK**

**ŞANLIURFA  
2015**

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA İLİNDE GÖRÜLEN E.GRANULOSUS  
SUŞLARININ PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE  
GENOTİPLENDİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Cemile GÜNBEĞİ**

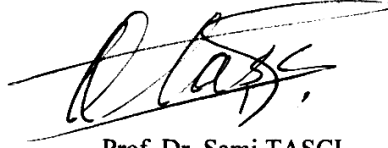
**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Fadile Yıldız ZEYREK**

**Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 17/03/2014 tarih ve 014074 proje numarası ile desteklenmiştir**

**ŞANLIURFA  
2015**

**HARRAN ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE**

Cemile GÜNBEĞİ'nin hazırladığı “Şanlıurfa İlinde Görülen E.Granulosus Suşlarının PCR-RFLP Yöntemi ile Genotiplendirilmesi” konulu çalışma 21/07/2015 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Sami TAŞÇI

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi

Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

**Başkan**



Prof. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**Üye (Danışman)**



Prof. Dr. Ali UZUNKÖY

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi

Genel Cerrahi Anabilim Dalı

**Üye**

18.12.2015

ONAY



Prof. Dr. Nurten AKSOY

Harran Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Tez konumun seçilmesinden, çalışmaların yürütülmesine kadar her aşamada bilgi ve desteğinden yararlandığım değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK'e, en içten duygularıyla teşekkür ederim. Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Başkanımız hocam Sayın Prof. Dr. Samî TAŞCI' ya ve hocamız Sayın Prof. Dr. Mehmet BAYRAKTAR'a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda katkısı olan ve her türlü yardımını esirgemeyen Sayın Öğr. Gör. Gülcan GÜRSES teşekkür ederim. Moleküler parazitoloji konusundaki bilgilerinden faydalandığım ve çalışmalarımda yol gösterip pozitif kontrol veren Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK'e ve Doç.Dr Armağan Erdem ÜTÜK'e en içten duygularıyla teşekkür ederim. Yazı işlerinde yardımını esirgemeyen Tevrat ZERAY'a ve ihtiyacım olan çalışma ortamını hazırlayan Ali KÜÇÜK'e ve bölümdeki kıymetli arkadaşlarıma en içten duygularla teşekkür ederim.

Cemile GÜNBEĞİ

2015

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa No

TEŞEKKÜR .....	i
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER .....	v
ÖZET .....	vi
ABSTRACT .....	vii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Echinococcus Cinsi Parazitleri Genel Morfolojisi .....	6
2.2. Echinococcus Cinsi Parazitlerin Yaşam Döngüsü .....	8
2.3. Echinococcus Cinsinin Türleri .....	10
2.3.1. Echinococcus granulosus .....	10
2.3.2. Echinococcus multilocularis .....	11
2.3.3. Echinococcus oligarthrus .....	12
2.3.4. Echinococcus vogeli .....	12
2.3.4.1. Echinococcus granulosus Epidemiyoloji .....	15
2.4. Kist Yerleştiği Tabakalar .....	17
2.4.1. Perikist (Adventisya) .....	17
2.4.2. Ektokist (Laminated membran veya Kutikula) .....	18
2.4.3. Endokist (Germinatif tabaka veya Çimlenme zarı) .....	18
2.4.4. Protoskoleksler .....	19
2.5. Echinococcus Granulosus Suşları .....	21
2.5.1. Evcil Koyun Suşu (G1) .....	21
2.5.2. Tazmanya Koyun Suşu (G2) .....	22
2.5.3. Manda Suşu (G3) .....	22
2.5.4. At suşu(G4) .....	23
2.5.5. Sığır suşu(G5) .....	24
2.5.6. Deve Suşu (G6) .....	24
2.5.7. Domuz Suşu (G7) .....	25
2.5.8. Geyik Suşu (G8) ve Fennoscandian Geyik Suşu (G10) .....	25
2.5.9. İnsan Suşu (G9) .....	25
2.6. Echinococcus'ta Tür ve Suş Belirlemede Kullanılan Yöntemler .....	25
2.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....	26
2.6.2. Restriksiyon Fragman Uzunluğu Polimorfizmi(RFLP) .....	29
2.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu - Restriksiyon Fragman Uzunluğu Polimorfizmi (PCR-RFLP) .....	30
2.6.4. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik Deoksiribonükleik Asit - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD-PCR) .....	32
2.6.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu - Tek Sarmal Konformasyon Polimorfizmi (PCR- SSCP) .....	32
2.6.6. Dideoksi Fingerprinting (ddF) .....	33
2.6.7. Deoksiribonükleik Asit Dizi Analizi .....	33
2.7. Tanı .....	34
2.7.1. Klinik Tanı .....	34

2.7.2. Spesifik Tanı.....	35
2.7.2.1. Görüntüleme Yöntemleri.....	36
2.7.3. Serolojik Yöntemler.....	36
2.8. Tedavi .....	37
2.9. Bulaşma Yolları .....	37
2.9.1. Sindirim yolu .....	37
2.9.1.1. Transhepatik Yol .....	37
2.9.1.2. Direkt Yol.....	38
2.9.1.3. Lenfatik Yol .....	38
2.9.2. Solunum Yolu .....	38
2.10. Korunma .....	39
3. MATERYAL ve METOT .....	41
3.1. Örneklerin Toplanması .....	42
3.2. Direkt Mikroskopik İnceleme .....	43
3.3. DNA Ekstraksiyonu .....	43
3.3.1. Ekstraksiyonun standardizasyonu.....	43
3.3.2. Ekstraksiyonun Aşaması.....	43
3.3.3. Ekstrakte edilen ürünlerdeki DNA miktarı belirlenmesi .....	45
3.4. Ribozomal Deoksiribonükleik Asit "Internal Transcribed Spacer 1" Gen Bölgesi Kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (rDNA ITS1-PCR) .....	45
3.5. ITS1-PCR-RFLP Yönteminin Uygulanması .....	47
4. BULGULAR .....	48
5. TARTIŞMA.....	52
KAYNAKLAR.....	60

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1 Erişkin <i>E. granulosus</i> .....	6
Şekil 2 Erişkin <i>E. granulosus</i> Yumurtası.....	7
Şekil 3 <i>E. granulosus</i> Kız Keseleri.....	8
Şekil 4 Echinococcus <i>granulosus</i> 'un a: Erişkin formu b: Olgun halkası c: Gebe halkası.....	10
Şekil 5 Echinococcus <i>granulosus</i> 'un (koyun tipi) yaşam çemberi.....	11
Şekil 6 <i>E. Türleri</i> .....	14
Şekil 7 Erişkin Echinococcus <i>granulosus</i> .....	16
Şekil 8 Echinococcus <i>granulosus</i> Gebe Halka.....	17
Şekil 9 Echinococcus çimlenme kapsülü.....	19
Şekil 10 Echinococcus <i>granulosus</i> Protoskoleksleri Direkt Mikroskopik Görünümü.....	20
Şekil 11 Kistli Karaciğer.....	20
Şekil 12 PCR cihazı.....	27
Şekil 13 PCR Siklusunun aşamaları.....	28
Şekil 14 PCR siklusları ile DNA'nın çoğalması.....	29
Şekil 15 Fertil Kistte Protoskleks.....	48
Şekil 16 Protoskoleks.....	49
Şekil 17 Echinococcus <i>granulosus</i> 'un koyun ve insanda elde edilen DNA ürünlerinin ITS-1 bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonucunda oluşan bandların görünümü.....	49
Şekil 18 AluI ile kesimi yapılan ITS-1 PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jel görüntüsü.....	50
Şekil 19 RsaI ile kesimi yapılan ITS-1 PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jel görüntüsü.....	51
Şekil 20 TaqI ile kesimi yapılan ITS-1 PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jel görüntüsü.....	51

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
Tablo-1 Echinococcus türlerinin karşılaştırmalı özellikleri .....	13
Tablo-2 Ekinokok türlerine ait konak farklılıkları .....	14
Tablo-3 İnsan ve hayvanlardan alınan örneklerin türlerine dağılımı.....	42
Tablo-4 İnsan ve hayvanlardan alınan kist örneklerinin fertilité durumuna göre dağılımı .....	48





## KISALTMALAR VE SİMGELER

<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	: Deoksiribonükleozid trifosfat
<b>ITS1</b>	: Internal transcribed spacer 1
<b>KE</b>	: Kistik ekinokokkozis
<b>PCR</b>	: Polymerase chain reaction
<b>RFLP</b>	: Restriction fragment length polymorphism
<b>rDNA</b>	: Ribozomal deoksiribonükleik asit
<b>TBE</b>	: Trisbase - boric acid - ethylenediaminetetraacetic acid
<b>mtDNA</b>	: Mitokondriyal DNA
<b>rRNA</b>	: Ribozomal RNA

## ÖZET

### ŞANLIURFA İLİNDE GÖRÜLEN E.GRANULOSUS SUŞLARININ PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE GENOTİPLENDİRİLMESİ

Cemile GÜNBEĞİ

#### Tıbbi Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Tezi

*Echinococcus granulosus* larvalarının neden olduğu kistik ekinokokozis hem insanları hem de hayvanları etkileyen dünyadaki en önemli zoonozlardan birisidir. Parazitin ergin şekilleri köpek, kurt, çakal ve diğer kanidelerin ince bağırsaklarında, larva formu ise koyun, keçi, sığır, domuz, insan ve birçok memeli hayvanın iç organlarında bulunmaktadır. Günümüzde Türkiye'de *Echinococcus granulosus*'un suşları hakkında detaylı bilgi bulunmamaktadır. Bu amaçla Türkiye'nin Şanlıurfa ilindeki hastane ve mezbahaneden 33 insan ve 80 koyun olmak üzere toplam 113 hidatik kist izolatu toplanmıştır. Bu izolatların genetiğini belirlemek amacıyla örneklerin ribozomal DNA internal transcribed spacer gene 1 (rDNA-ITS1) bölgesi PCR-RFLP tekniğiyle incelenmiştir.

Aynı band profiline sahip olması sonucu izolatların hepsinin yaygın koyun suşu (G1) olduğu belirlenmiştir. Mevcut çalışma Türkiye'nin Şanlıurfa ilimizin *E. granulosus* 'un evcil koyun suşunun baskın genotip olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışma bu bölgede koyun suşunun bulunduğunu gösteren rapordur. Bu bilgi bu bölge ve çevre ülkelerde hayvanlardaki parazitlerin epidemiyolojisi ve ekolojisi ile ilgili ileri çalışmalar açısından oldukça önemlidir.

**Anahtar Kelimeler:** *Echinococcus granulosus*, PCR-RFLP, Türkiye

## ABSTRACT

### *E.GRANULASUS* GENOTYPING BY PCR-RFLP IN SANLIURFA

Cemile GÜNBEĞİ

Department of Medical Microbiology Master thesis

Cystic echinococcosis caused by larvae of the *Echinococcus granulosus* is affecting both people and animals and it is one of the world's most important zoonosis. The adult forms of parasite are found dogs, wolves, jackals and other canids small intestine and the larvae forms are found sheep, goats, cattle, pigs, humans and many other mammals internal organs.

There is still no detailed molecular data about the strains of *Echinococcus granulosus* in Turkey.

For this aim 113 hydatid cyst isolates contained 33 human and 80 sheep were collected from Şanlıurfa provinces in the regions of Turkey. In order to determine genetic variatin, ribosomal ITS-1(Internal Transcribed Spacer )gen regions of isolates were analysed by PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism). The result of this study analysed isolates were belonging to the common sheep strain (G1). The present study revealed that domestic sheep strain is the most common genotype in Şanlıurfa provinces of Turkey. This is the report indicating that *E. granulosus* sheep strain is present in human in this region. This knowledge is quite important for future studies on the epidemiology and ecology of the parasites in animals and humans in this region and surrounding countries.

**Key Words:** *Echinococcus granulosus*, PCR-RFLP, Turkey

## 1. GİRİŞ

Echinococcus'lar, Taeniidae ailesine ait küçük sestodlardır. Echinococcus cinsinin *Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* ve *E. vogeli* olarak dört türü tanımlanmıştır. Yetişkin parazit; son konak olan köpeğin ya da diğer etobur hayvanların ince bağırsağında, larval (metasestod) form; tırnaklı hayvanlar (koyun, sığır, domuz, at vs.) ve insanların iç organlarında bulunur. İnsanlar bu 4 türün yumurtalarına duyarlı olup metasestodlar insanların çeşitli organ ve dokularında gelişerek echinococcosise neden olur. İşte metasestod formu bu ara konaklarda ekinokokkozise neden olur (28,95). Ekinokokkoz (hidatidoz) Avrupa, Orta Doğu, Güney Amerika ve Afrika ülkelerinde endemik bir parazitozdur(1). Kistik fibroz (KF), dünya genelinde beyaz ırkta en sık görülen ilerleyici ve öldürücü kalıtsal hastalıklarından bir tanesidir (2,3).

Türk toplumundaki sıklığı 1/2000 olarak bildirilmiştir (4). Dünyada ve ülkemizde özellikle hayvancılığın yaygın olduğu bölgelerde sık görülen Kistik Ekinokokkozis (KE) insanlar için sağlık sorunlarına neden olmasının yanı sıra ekonomik sorunlara da yol açar.

Gelişmekte olan ülkelerde paraziter hastalıklar halk sağlığı açısından önemli bir problem oluşturmaktadır. Bütün dünyada insan ve hayvan sağlığını tehdit eden kistik ekinokok Türkiye'deki paraziter zoonozların en önemlilerinden biridir. "Echinococcus" enfeksiyonlarında uygulanan kontrol programlarının başarıya ulaşması açısından hastalığın ara konak hayvanlardaki tanısı büyük önem taşımaktadır. Hidatidozun eradike edildiği ülkelerde, ithal edilen enfekte hayvanlar hastalığın yayılmasında potansiyel bir risk oluşturduğundan dolayı bu hayvanların hastalık açısından takip edilmesi mücadelede oldukça önem taşımaktadır (5). Türkiye'de insan ve hayvan sağlığını olumsuz yönde etkileyerek büyük ekonomik kayıplara (et, süt, iş gücü ve verimlilik, tanı, ilaç ve ameliyat masrafları, vb.) neden olmaktadır (6,7,8,9,10,11,12). CE'nin Türkiye'deki yayılışı coğrafik bölgelere göre koyunlarda %3,5 -71,56, sığırlarda %0,98-46, keçilerde de %1,6-74,4 arasında değişmektedir

(4). Yazar ve arkadaşlarının (96) yaptığı çalışmaya göre; 2001-2005 yılları arasında Türkiye'den toplam 14789 KE olgusu bildirilmiştir.

Kistik ekinokokkozun insidans ve prevalansı son yıllarda belirgin olarak düşmekle birlikte, bazı ülkelerde ve bazı coğrafi bölgelerde, özellikle ekonomik sıkıntılara bağlı olarak kontrol programlarının uygulanamaması nedeniyle, önemli bir sağlık sorunu olarak baş göstermektedir. Bu parazitik enfeksiyonun coğrafi dağılımı, parazitin ara konağı olan ve göçebe-yarı göçebe yaşayan koyun ve keçi sürülerinin sayısına ve bu sürülerin parazitin son konağı olan ve insanlara bulaşmada önemli bir rol oynayan köpeklerle birlikteliğine bağlıdır. *Echinococcus* cinsinin, erişkin ve metasestod safhalarının; morfolojik, biyolojik ve epidemiyolojik özellikleri tür karakterizasyonunda en çok kullanılan kriterlerdir. Fakat suş tayini daha karmaşık olup morfolojik, biyolojik, biyokimyasal, epidemiyolojik ve moleküler kriterlere bağlıdır. Morfolojik ve biyolojik çalışmalar suş tayininde çok faydalı bilgiler sağlamasına rağmen, bu özelliklerin değişken olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bunlar konak ve çevresel faktörlerden etkilenebilir ve genetik düzeydeki farklılığı yansıtmayabilirler. Klasik teknikler çevreden ve konaktan etkilenmesine rağmen, moleküler teknikler parazit genomunun direk karakterizasyonuna olanak sağlar ve çevresel faktörlerden etkilenmezler.

*Echinococcus granulosus* türü içerisinde bugüne kadar 10 suş (G1-G10) tanımlanmıştır. Bunlar; Evcil koyun suşu (G1), Tazmanya koyun suşu (G2), Manda suşu(G3), At suşu (G4), Sığır suşu (G5), Deve suşu (G6), Domuz suşu (G7), Geyik suşu (G8), İnsan suşu (G9), Fennos candian geyik suşu (G10)'dur. Yapılan son moleküler çalışmalarla genetik farklılıklarından dolayı *E.granulosus sensu stricto* (G1-G3), *E.canadensis* (G6-G10), *E.equinus* (G4) ve *E.ortleppi* (G5) ayrı birer tür olarak kabul edilmektedirler (13,14,15,16). Ülkemizde bazı bölgelerde *E. granulosus'un* sığır, deve, koyun, keçi, insan ve köpek izolatlarının moleküler ayrımı ile ilgili bazı araştırmalar yapılmış fakat bu konudaki çalışmalar yeterli değildir. Bu alanda Türkiye'de yapılan çalışmalar Vural ve arkadaşlarının (53) yaptığı çalışmada koyun ve sığırlarda *E. granulosus'un* G1 ve G3 genotipleri saptanmıştır.

Ütük ve arkadaşlarının (52) yaptığı çalışmada ise insan, köpek, deve, koyun, keçi ve sığırlardan elde edilen *E. granulosus* izolatlarının tamamının G1 genotipinde olduğu belirlenmiştir. Ergin ve ark.'nın (80) çalışmasında ise; insan izolatların tümünün G1 suşu olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle Şanlıurfa ilimizdeki suş tayını yapılarak hem ekolojik olarak hem de ekonomik katkı sağlayacak bu çalışmamız.



## 2. GENEL BİLGİLER

*Echinococcus granulosus* 'un larva evresi olan kist hidatik tarihin çok eski zamanlarından beri bilinmektedir. Hipokrat ( İ.Ö. 460 -377 ) domuz ve sığırlarda kist hidatiğin varlığını bildirmiş, ayrıca insan karaciğerinde gördüğü hidatid kisti "su dolu kese" olarak ifade etmiştir. Kapadokyalı Arataeus (İ.S. 9-79) ve Bergamalı Galen (İ.S. 129-200) de insan ve hayvanlarda su dolu keselerin varlığını bildirmişlerdir. Fakat bu keselerin yıllarca ne olduğu anlaşılamamış, bunların tümör veya dokuların kistleşmiş yapılar olduğu düşünülmüştür (17,18). Aristoteles ise su keselerinin akciğer ve karaciğer dokularında yıkım yaptığını bildirmiştir. 1695 yılında ise Hartman tarafından, ilk olarak köpeklerde erişkin paraziti gördüğünü bildirmiştir (19). Andersen isimli araştırmacı tarafından 1938 tarihinde pankreasın kistik fibrozis olarak tanımlanan kistik fibroz (KF), beyaz ırkta sık görülen bir genetik hastalıktır (2). Hastalık, adını duktuslarda meydana gelen kistik dilatasyon ve fibrozisten almıştır. Ekinokokkozis ve hidatidozis terimleri ekinokok cinsi sestodların erişkin ve larva (metasestod) şekillerinin yol açtığı zoonotik infeksiyonları tanımlamakta kullanılır. "Hidatik Kist" terimi bir hastalık ismi değil, *Echinococcus granulosus*'un (EG) yaşam siklusundaki larva (metasestod) evresidir. Bu nedenle doğru kullanım "Hidatik kist hastalığı" (HKH) olmalıdır. *Echinococcus*'un metasestod şeklinin insanlarda hastalığa yol açabilen 4 türü mevcuttur. (7) *Echinococcus* cinsinde toplam 16 tür ve 13 alt tür tanımlanmış fakat taksonomide sadece 4 tür olarak tanımlanmıştır.

Bunlar: *Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* ve *E. vogeli* olarak dört türü tanımlanmıştır.

*Echinococcus granulosus* ve *E. multilocularis*'in sebep olduğu kistik ve alveolar echinococcosis oldukça yaygın olmasına rağmen *E. oligarthrus* ve *E. vogeli* oluşturduğu polycystis echinococcosis Orta ve Güney Amerika ile sınırlıdır.

Echinococcus hermofradit olan erişkin parazitler, son konakların bağırsak mukozasına oldukça sıkı bir şekilde tutunarak yaşamlarını burada sürdürürler. Parazitin seksüel gelişimi 3-4 hafta içerisinde tamamlamakta, etkenin tür suşuna bağlı olarak yumurta üretimi 28. günde başlayabilmektedir. Gebe halkadaki yumurtalar son konakların dışkılarıyla dışarı atılmıştır.

Dışkı ile dışarı atılan yumurtaların tamamen embriyonlanmış ve enfektif olduğu düşünülmektedir. Dışarı atılan yumurtalar keratinize embriyofor yapısından dolayı olumsuz koşullara oldukça dayanıklıdır. Ara konaklar canlı ve embriyonlu yumurtaları oral yolla ve nadiren de solunum yoluyla alarak enfeksiyona yakalanmakta ve bu konakların çeşitli organ ve dokularında metasestodlar gelişmektedir. Alınan yumurtalar ara konağın mide ve ince bağırsağında açılmakta ve onkosfer serbest kalmaktadır. Onkosfer çengelleri ile salgıladıkları histolitik enzimler vasıtası ile hızla villus epiteline penetre olmakta ve lamina propriyaya ulaşmaktadır. Onkosfer, venal ve lakteallere ulaştığına da pasif olarak genellikle karaciğer ve akciğere, nadiren diğer organ ve dokularada taşınmaktadır. Ara konaklardan etkilenen organ ve dokular Echinococcus türüne ve suşuna göre değişmektedir. Onkosfer bir kere lokalizasyon yerine ulaştıktan sonra, burada aseksüel olarak çoğalan kistik metasestodu oluşturmaya başlar. Oluşan kist yapısı ise Echinococcus türüne göre değişmektedir. Tüm türlerde kistlerin ortak özelliği, içeride germinal dışı ise laminer tabakaya sahip olmasıdır. Echinococcus *multilocularis* haricindeki diğer türlerde laminer tabakayı çevreleyen ve konak tarafından oluşturulan fibroz bir adventisiya tabakası bulunmaktadır. Metasestodun gelişim süresi parazitin türüne, suşuna, konağın türüne, ırkına, yaşına, cinsiyetine ve bağışıklık durumuna göre farklılıklar arz etmektedir.

Echinococcus *granulosus* ile doğal enfekte koyun gibi ara konaklarda kist gelişimi ve protoskoleks oluşumu 2 yıla kadar uzuyabilirken, Echinococcus *multilocularis* ile enfekte rodentlerde 2-4 ay gibi kısa bir sürede oluşabilmektedir. Son konaklar protoskoleks ihtive eden kistleri yemek suretiyle enfeksiyona yakalanmaktadır. Alınan protoskoleksler bir kaç saat içerisinde ince bağırsak villusları arasına girmekte ve buraya tutunarak erişkin parazitleri oluşturmaktadır (42,97).

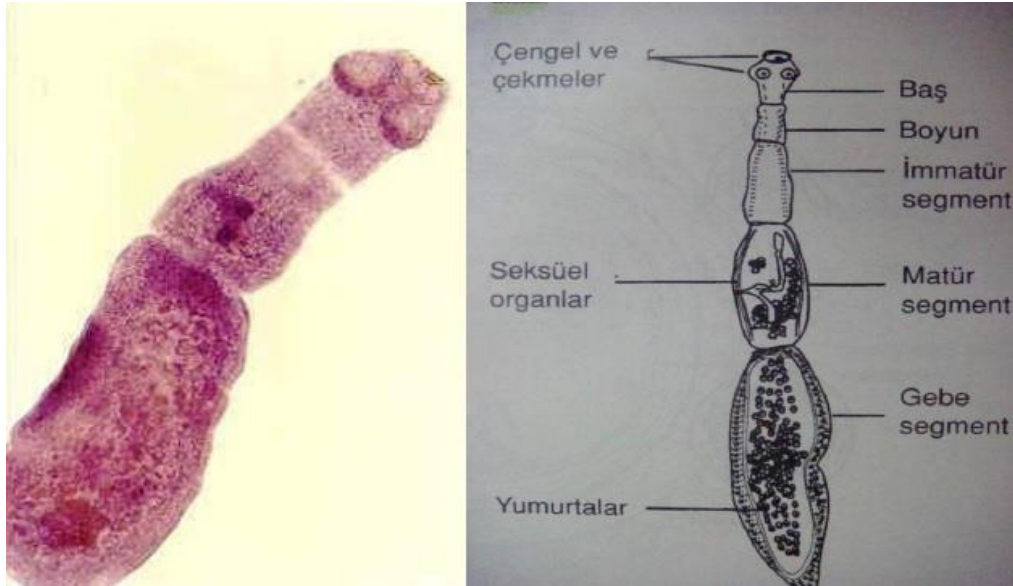


## Echinococcus türlerinin sınıflandırmadaki yeri şu şekildedir

<b>Alt alem;</b>	Metazoa,
<b>Şube;</b>	Platyhelminthes,
<b>Sınıf;</b>	Cestoda,
<b>Alt sınıf;</b>	Eucestoda,
<b>Takım;</b>	Cyclophyllidea
<b>Aile;</b>	Taeniidae,
<b>Cins;</b>	Echinococcus,

### 2.1. Echinococcus Cinsi Parazitleri Genel Morfolojisi

Echinococcus cinsi erişkin parazitler 1,2 - 6 mm uzunluğunda ve baş (skoleks), boyun, 2 -6 adet proglottide sahip gövdeden (strobilia) oluşur. Skoleks, dört çekmene ve rostellum üzerinde bulunan biri küçük biri büyük olmak üzere iki sıra çengele sahiptir. Strobiliadaki proglottidlerden ilki immatür, sonraki matür ve sonuncusu ise gebe proglottiddir. İmmatür proglottidin seksüel organları henüz gelişmemiştir. Matür proglottid fertilizasyonun gerçekleştiği işlevsel hermafroditik seksüel organları içerir. Gebe proglottidde uterus yumurta ile doludur ve yumurtalar tamamen geliştiği zaman uterus son segmentin çoğunu kaplar (21, 7, 9,22, 12, 5).



Şekil 1: Erişkin *E. granulosus*

**Yumurta:** Echinococcus yumurtaları yuvarlak ya da hafif oval şekilli olup, 30-40 um çapındadır. İçerisinde altı çengelli bir embriyon bulunur. Onkosferi çevreleyen çok sayıdaki zardan biri olan embriyofor 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. Diğer Taenia yumurtalarından mikroskopik olarak ayırt edilmesi zordur.



**Şekil 2 :** Erişkin *E. granulosus* Yumurtası

**Metasestod (Larva):** Metasestodun (ikincil larval evre) yapı ve gelişimi dört Echinococcus türü arasında farklılık gösterir. Karakteristik olarak tüm türlerin kistleri dış kısmı aselüler laminer tabaka ile desteklenmiş, iç kısmı ise germinal tabakadan oluşur. *E. multilocularis* hariç tüm türlerde laminer tabaka konak tarafından yapılan adventisyal tabaka ile çevrilidir. Germinal tabaka çimlenme kapsüllerine aseksüel gelişim ile çoğalabilen tabakadır. Protoskoleksler çimlenme kapsüllerinin veya birincil kistin iç duvarından ortaya çıkar. Embriyodan gelişen metasestod (hidatik kist) beş ayda 1 cm çapa ulaşır ve büyümeye devam ederek on veya daha fazla yılın sonunda birkaç litre sıvı içerebilen büyük bir kist halini alabilir.

Larval form olan hidatik kist adı verilen *E.granulosus* kistleri makroskopik olarak genellikle uniloküler yapıdadır.

Seyrek olarak multikistik (multiveziküler) tipte kistler de oluşabilmektedir. Uniloküler kistler içi sıvı dolu büyükçe bir kese biçimindedir. Bu kesenin duvarı dışta kütiküller (laminar), içte germinal olmak üzere iki farklı tabakadan oluşur.

Germinal tabakanın görevi; dışarı doğru kütiküller tabakayı, ayrıca içeri veya bazen de dışarı doğru skoleks ve üreyici kapsülleri oluşturmaktır. Üreyici kapsül etrafı germinal tabakayla çevrilmiş içinde iki veya daha fazla sayıda skoleks bulunan yapıdır. Zamanla üreyici kapsülün dış yüzü kütiküle ile örtülür ve böylece kız keseler meydana gelir. Ayrıca vücudun bu kiste karşı gösterdiği reaksiyon sonucu, en dışta kisti çevreleyen konağa ait bir fibroz adventisyal tabaka (perikist- fibroz kapsül) bulunur.



**Şekil 3:** *E.granulosus* Kız Keseleri

## 2.2. Echinococcus Cinsi Parazitlerin Yaşam Döngüsü

Echinococcus cinsinin üyeleri yaşam döngülerinde etobur bir son konak ve etobur olmayan memeli bir ara konağa sahiptir. Erişkin parazit; son konağın ince bağırsağının mukozasına sıkıca tutunarak yaşar. Seksüel olgunlaşma tür ve suşlara bağlı olarak 28 gün gibi kısa bir sürede yumurta üretiminin başlaması ile 3-4 hafta içinde olur. Yumurtalar proglottidlerin içinde veya serbest olarak feçesle dış ortama atılır.

Çevrede olgunlaşma periyoduna gereksinimi olan immatür yumurtalar salınabilmesine karşın, feçesle atılan yumurtaların tam olarak embriyone ve enfektif olduğu düşünülmektedir (23). Mide ve ince bağırsaklara gelen yumurtalarda onkosfer enzimler yardımı ile keratinize embriyofordan çıkar, ince barsak duvarını delerek venler ile pasif olarak karaciğere taşınır. Karaciğere yerleşeceği gibi buradan portal dolaşım ile genel dolaşıma geçerek, akciğer, dalak, kas, beyin, kemik ve diğer organlara yerleşebilir (24, 25, 26).

Tutundukları organın parankimasına yerleşen embriyo çıkardığı enzim ile çevresindeki dokuyu eriterek bir vezikül oluşturmaktadır. Bu vezikül dördüncü günde 40-50 µm'ye, yirminci günde 250 µm'ye ulaşır ve etrafında adventisyal bir membran oluşturmaktadır. Beşinci ayda 1 cm çapa ulaşan kistin etrafında ikinci bir membran (germinatif membran) şekillenir enfeksiyonun birinci yılından sonra kistlerin çapı 2 cm'yi geçerek içlerinde protoskoleksler oluşmaya başlamaktadır.

Protoskoleksler germinatif membran hücrelerinin, membran proliferasyonu ile oluşan, başlangıçta sap ile membrana bağlı, çok sayıda çengel taşıyan rostellum taslağının invagine olduğu, kalsiyum granülleri bulunan hafif oval formlardadır. Germinatif membran ve protoskoleks oluşumu; kistin büyüklüğüne, konağa ve organa göre farklılık göstermektedir. İçinde protoskoleks bulunan kistlere fertil, bulunmayanlara ise steril kist adı verilir.

Koyunlarda fertil, sığırlarda ise steril kistler çoğunluktadır. Arakonaktaki fertil kistler patladığında etrafa dağılan protoskolekslerden sekonder kistler gelişir (2, 27).

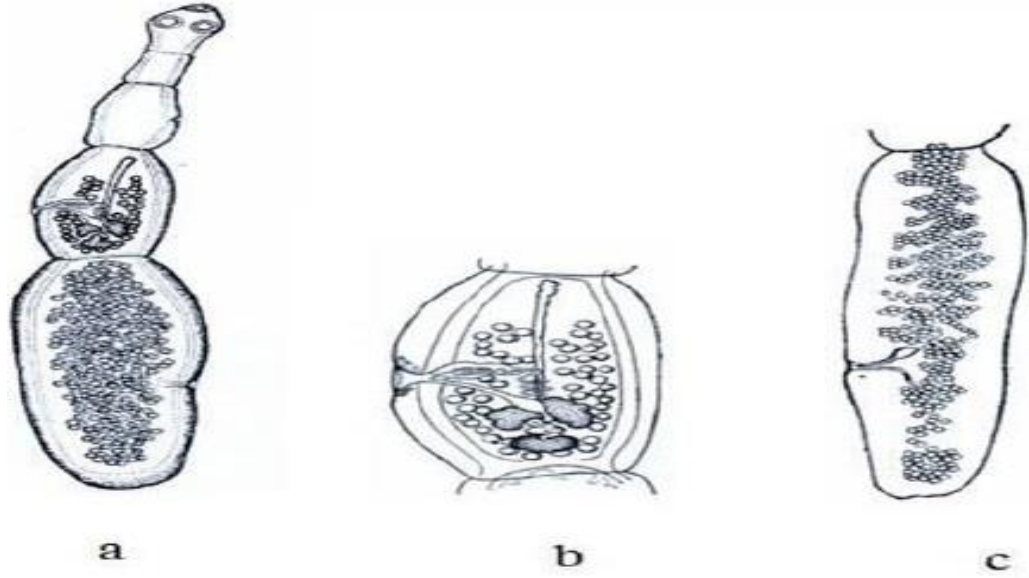
Örneğin; koyunlardaki çoğu kistlerin içinde protoskoleks şekillenmişken (fertil kist), sığırlardakilerin çoğunda protoskoleks şekillenmemiştir (steril kist)

Fertil kistlerde protoskoleksler dışında genellikle kistin içine ya da çok nadir olarak dışına doğru gelişen kız veya torun kistler gelişebilmektedir. Çok sayıda kistin oluşturduğu bu yapılar multikist, polikist veya multiveziküler kist olarak adlandırılmaktadır (28). Hidatik kist en sık karaciğerde (%50-70) ve akciğerde (%20-30) yerleşim gösterir. Fakat hayli düşük sıklıkla da olsa (<%10) vücutta diğer herhangi bir organı da tutabilir.

### 2.3. Echinococcus Cinsinin Türleri

- 1-Echinococcus *granulosus* (kistik ekinokokuz)
- 2-Echinococcus *multilocularis*(*alveoller* kistik ekinokokuz)
- 3-Echinococcus *vogeli* (polikistik ekinokokuz)
- 4-Echinococcus *oligarthus* (polikistik ekinokokuz)

Echinococcus *granulosus* türü içinde genetik çeşitliliğe sahip bazı formlar önceki yıllarda farklı tür veya E. *granulosus*'un alt türü olarak tanımlanmıştır. Günümüzde bu formların taksonomideki durumunun yeniden tanımlanması konusu, DNA dizi verilerinin filogenetik analizi sonucu Echinococcus taksonomisinin tekrardan gündeme gelmiştir (21).



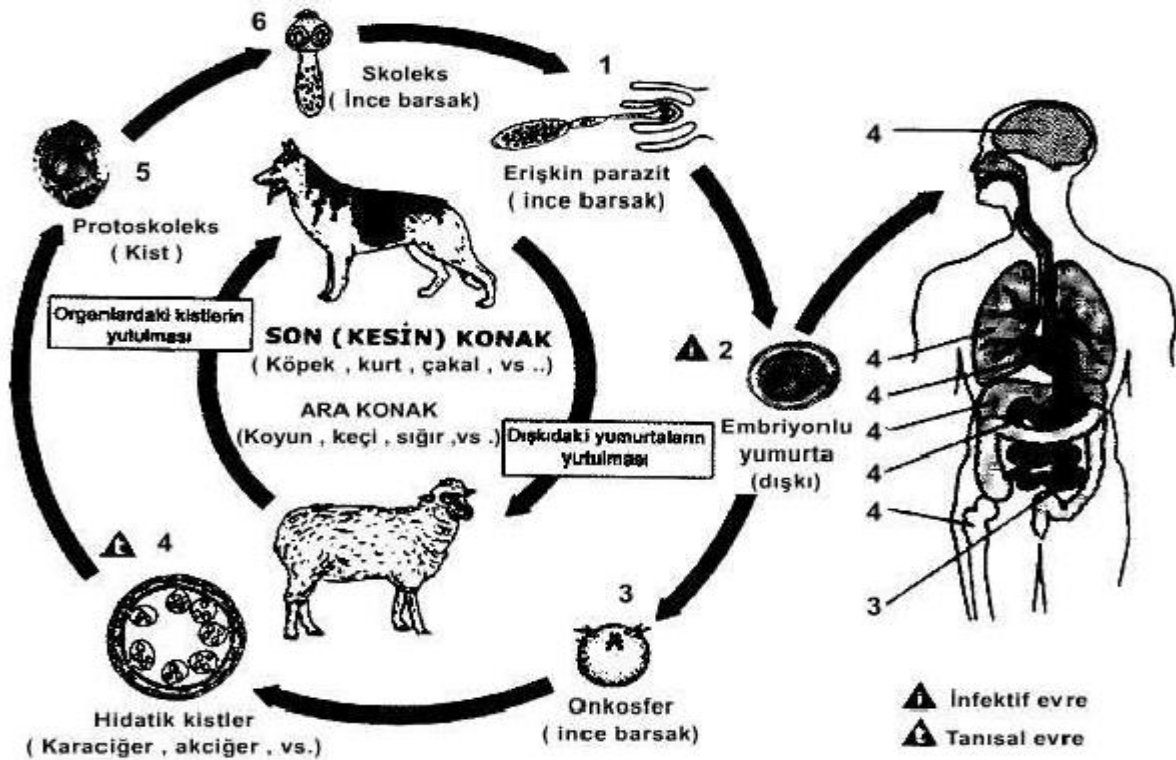
Şekil 4 : Echinococcus *granulosus*'un a: Erişkin formu b: Olgun halka c: Gebe halkası

#### 2.3.1.Echinococcus *granulosus*

Erişkin *E.granulosus* 3-6 mm uzunluğunda, küçük bir sestoddur. Fertil hidatik kistlerden köken alan protoskolekslerin köpek ya da diğer etçil hayvanlar tarafından ağızdan alınır.

Ardından Lieberkuhn kriptalarındaki villuslar arasında derin bir biçimde evagine, penetre olur ve 4-5 hafta içinde seksüel açıdan olgun erişkin parazitler oluşur. Parazit kesin konağın ince bağırsak mukozasına sıkı bir şekilde tutunmuş olarak yaşar.

Birinci sıradaki büyük çengeller 32-42 µm ikinci sıradaki küçük çengeller 20-36 µm boyundadırlar. Yumurtalık böbrek şeklindedir. Genital delikler değişimli olarak düzensizdir. Normalde matür ve gebe proglottidlerin arka yarısına açılır. Gebe proglottidin uterusu iyi gelişmiş divertiküle sahiptir. Gebe proglottidlerin her biri bir kaç yüz adet yumurta içerir (28,21,29).



Şekil 5: *Echinococcus granulosus*'un (koyun tipi) yaşam çemberi

### 2.3.2. *Echinococcus multilocularis*

*Echinococcus multilocularis*'in doğal döngüsü kesin konak olarak *Vulpex* (kızıl) ve *Alopex* (kutup) cinsi tilkileri içerir. Bazen kurt, çakal, köpek veya kediler de kesin konak olarak döngüde bulunabilirler.

*E. granulosus* gibi, erişkin parazitler ince bağırsak mukozasına tutunurlar. Erişkinler *E. granulosus*'tan daha küçüktür 1,2 – 4,5 mm uzunluğundadır. Diğer morfolojik farklılıklar; 2-6 proglottidin bulunması; rostellar çengellerin yapı ve sayısında farklılık, (küçük çengeller 20-21µm -büyük çengeller 25-35 µm, 14-34 adet gebe proglottidde) uterusun lateral poşunun olmayışı, genital deliğin proglottidin ön kısmına daha yakın oluşu, ön-sondan ikinci segmentin karakteristik olarak matür oluşu ve testislerin 14-35 adet oluşudur. Hermafrodit erişkinler yaklaşık 4 haftada seksüel olgunluğa ulaşır. Yumurta üretimi 28 gün gibi kısa bir sürede başlar (21,30,31,32). *E. multilocularis*'in neden olduğu alveoler ekinokokkoz (AE) ise agresif bir patolojidir. *E.multilocularis* kistleri organ içinde yanal tomurcuklanma ile çoğalırlar. Tümöre benzer şekilde komşu dokulara doğru yavaş yavaş yayılım gösterirken, vücudun uzak bölümlerinde "metastaz" yapabilirler (33,9).Metastazlar genellikle akciğer veya beyinde olur. Yaşam döngüsünün tamamlanması için kesin konaklar protoskoleks içeren olgun enfektif metasestodu yemelidir. Enfekte dokunun sindirimini invagine skoleksli protoskolekslerin serbestleşmesi takip eder. Pepsin ve safra tuzları skoleksin hızlı evaginasyonu uyarır, böylece intestinal mukozaya sıkıca bağlanabilir (34,35).

### **2.3.3. Echinococcus oligarthrus**

Erişkini yaklaşık 1,9 -2,9 mm boyunda olup, genellikle 3 segmentten oluşur. Sondan bir önceki segment olgun halka olup, genital delik genellikle, olgun halkaların ortasının anterioruna, gebe halkalarının ortasına açılır. Gravid uterus kese biçimindedir. Metasestodu polikistik yapıda ve içi sıvı dolu olup, septumlarla ayrılmış odacıkların bir araya gelmesiyle oluşur. Tek bir kist yaklaşık 5 cm çapa kadar gelişebilir. Evriminde puma, jaguar gibi vahşi hayvanlar kesin, bazı kemirgenler de arakonak olarak rol oynar. Bu güne kadar insan vakası bildirilmemiştir (36).

### **2.3.4. Echinococcus vogeli**

Erişkini yaklaşık 3,9- 5,6 mm boyunda olup genellikle 3 segmentten oluşur. Sondan bir önceki segment olgun halka olup genital delik genellikle olgun ve gebe halkaların ortasının posterioruna açılır. Gravid uterus keselenme veya dallanma göstermeyip uzun tübüler biçimdedir.

Kesin konağı köpek olup ara konakları Cuniculus paca adlı kemirgendir (37). Metasestodu *E. Oligarthrus'unkine* benzer yapıda olup, larval evresi insanda Kist Hidatik'in polikistik formuna benzer yapıda hastalık oluşturur (35,38).

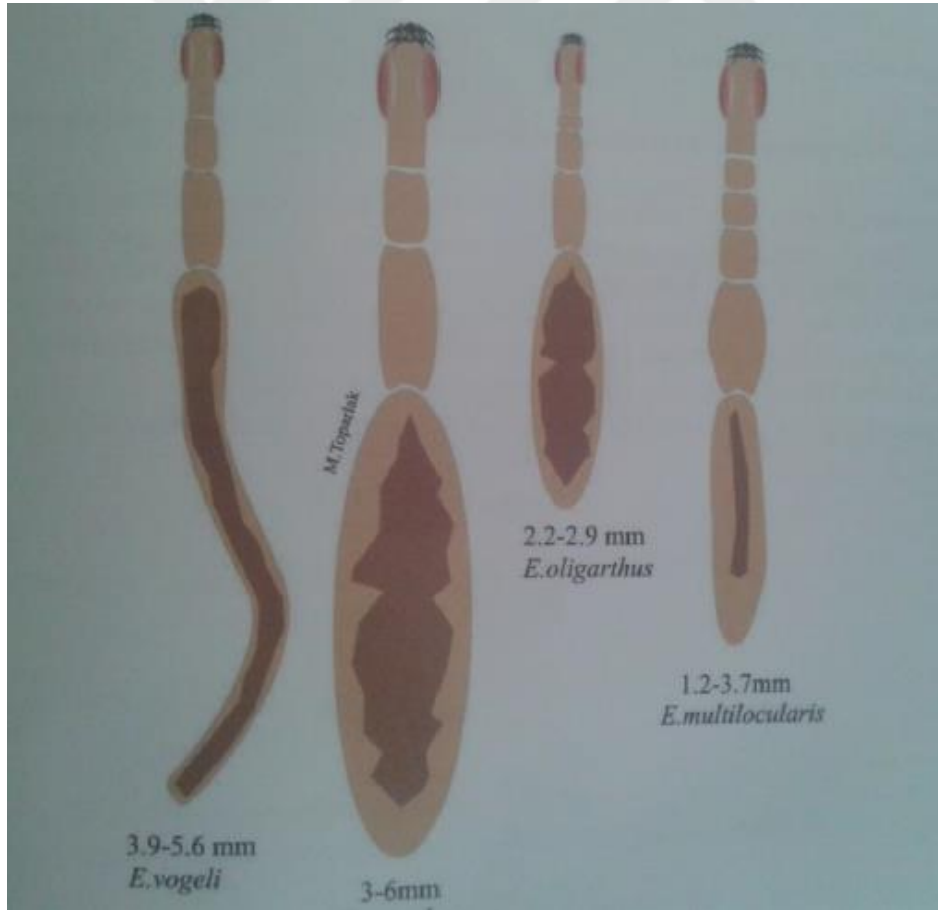
**Tablo-1:** Echinococcus türlerinin karşılaştırmalı özellikleri (39,40,21)

Morfolojik özellik	<i>E. granulosus</i>	<i>E.multilocularis</i>	<i>E.oligarthus</i>	<i>E.vogeli</i>	<i>E.shiquicis</i>
Strobila uzunluğu (mm)	2-11	1,2-4,5	2,2-2,9	3,9-5,5	1,3-7
Coğrafik Dağılım	Kozmopolit	Amerika, Orta ve Kuzey Avrasya, Kuzey	Orta ve Güney Amerika	Orta ve Güney Amerika	Çin – Tibet Bölgesi
Son Konak	Köpek ve Köpekgiller	Tilkiler, köpekgiller ve kedigiller	Vahşi kedigiller	Vahşi Köpek	Tibet Tilkisi
Ara Konak	Birçok memeli hayvanlar ve insan	Kemirgenler, insan	Sıçan	Sıçan, insan	Işıklı tavşan
Metasestod Tipi	Üniloküler (kist)	Multiveziküler (kist)	Polikistik	Polikistik	Üniloküler (sikt)
Metasestod lokalizasyonu	Visceral (karaciğer, akciğer)	Visceral (karaciğer)	Periferik, kas ve viseral	Visceral (karaciğer)	Visceral (karaciğer, akciğer)
Çengel sayısı	30-60	14-34	26-40	28-36	18-34
Büyük çengellerin uzunluğu (µm)	32,0-42,0 (25,0-49,0)	31,0(24,9-34,0)	52,0 (43,0-60,0)	53,0 (49,0-57,0)	20,0-23,0
Küçük çengellerin ortalama uzunluğu (µm)	22,6- 27,8 (17,0-31,0)	27,0 (20,4-31,0)	39,0 (28,0-5,0)	42,6 (30,0-47,0)	16,0-17,0
Ortalama Segment Sayısı	3 (2-7)	5 (2-6)	3	3	2-3
Halkaların toplam uzunluğu	2,0-11,0	1,2- 4,5	2, 2- 2,9	3,9-5,5	1,0-1,42
Genital deliğin yeri					
Olgun halkanın yeri	Ortaya yakın	Ortanın önünde	Ortanın Önünde	Ortanın arkasında	Üst kenara yakın
Gebe halkanın boyu (mm)	Ortanın arkasında	Ortanın önünde	Ortada	Ortanın arkasında	Ortanın önünde
Ortalama Testis sayısı	32 -68 (25-80)	18-26 (16-35)	29 (15-46)	56 (50-67)	12-20
Testislerin dağılımı	Genital deliğin çoğunlukla arkasında	Çoğunlukla arkada	Çoğunlukla arkada	Çoğunlukla arkada	Çoğunlukla arkada
Erişkin segmentin pozisyonu	Sondan bir önceki	Sondan iki önceki	Sondan iki önceki	Sondan bir önceki	Sondan bir önceki
Uterusun yapısı	Yanlara dallanmış	Kese şeklinde	Kese şeklinde	Kese şeklinde Uzun, tubüler ve kese	Kese şeklinde
Strobilanın ön kısmının gebe halkaya oranı	1 : 0,86-1 ,31	1 : 0,3 1-0,8	1 : 0,96-1,10	1: 1,90-3,00	-



**Tablo-2:**Ekinokok türlerine ait konak farklılıkları

Parazit	Son konak	Arakonak
<i>E.granulosus</i>	Köpek, kurt, çakal ve diğer karnivorlar	Koyun, keçi, sığır, domuz, insan ve birçok memeli hayvan
<i>E.multiloculari</i>	Tilki nadiren köpek ve kedi	Başta tarla fareleri olmak üzere kemiriciler ve insan
<i>E.vogeli</i>	Yabani ve evcil köpek	Kemirici ve nadiren insan
<i>E.oligarthrus</i>	Kedigiller (Jaguar, puma ve yabani kedigiller)	Kemiriciler
<i>E.shiquicus</i>	Tilki	Islıklı tavşan ( <i>Ochotona curzomae</i> )



**Şekil 6 :***E.* Türleri

### 2.3.4.1. Echinococcus granulosus Epidemiyoloji

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

Ormansal döngü; kurt, çakal, tilki gibi yabani karnivorlar ile geyik, karaca gibi yabani ruminantlar arasında seyrederek. Daha çok Kuzey Amerika, Asya ve Avrupa'nın yüksek kısımlarında görülen ve *E. granulosus*'un orijinal formunu temsil ettiği düşünülen bu (silvatik) forma evcil ruminantlarda seyrek rastlanır. Ormansal formların neden olduğu insan enfeksiyonları genel olarak öncelikle akciğerlerde lokalize olmakta ve klinik semptomlar belirginlik göstermemektedir. Kırsal döngü ise; 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.

Örneğin; Büyük Britanya'da *E. granulosus* 'un sadece tazi ve at arasında biyolojik evre gösteren at suşu ile köpek ve koyun arasında biyolojik evre gösteren koyun suşu arasında morfolojik ve biyokimyasal farklılıklar saptanmıştır. Nitekim koyun suşu in vitro koşullarda seksüel olgunluğa erişirken, at suşu erişememektedir. Buna karşılık koyun suşu ile insanlar kolaylıkla enfekte olabilmektedir. Bunların dışında *E. granulosus*'un deve/köpek, domuz/köpek, sığır/köpek, vallabi kangurusu/dingo biyolojik döngülerinde de çeşitli farklılıklar görüldüğü bildirilmiştir (41).

*Echinococcus*'un birkaç arakonak türünün bulunduğu bölgelerde, her birinin farklı bir tür barındırıp barındırmadığını ve sıklıklar arasında etkileşim olasılığının var olup olmadığını bilmek epidemiyolojik olarak önemlidir. *E. granulosus* tüm dünyada geniş bir coğrafi bölgeye yayılmıştır. Bu hastalık bütün kıta ve kutuplarda, ılıman, tropikal ve subtropikal bölgelerde görülmektedir. *E. granulosus* endemik bölgelerde çocuklarda daha sık görülür. Çocuklarda en sık akciğerler, erişkinlerde ise çoğunlukla karaciğerin sağ lobu tutulur. Karaciğer kistlerinin büyümesi ve semptom vermesi için yıllar gerekir. Kemik, genitoüriner sistem, barsaklar, subkutan dokular, beyin tutulabilir.

Parazit prevalansının en yüksek olduğu b6lgeler Avrasya, Afrika, Avustralya ve G6ney Amerika'nın bazı b6lgeleridir.

Endemik 6lkelerde kistik ekinokozis insidansı 1-220/100 000 dolaylarındadır (14).

Enfeksiyonun endemik olarak g6r6ld6đ6 b6lgelerin yanında sporadik olarak da saptanabildiği, Gr6nland ve İzlanda'da parazite rastlanılmadığı bildirilmiştir. 6lkemizde ve d6nyadaki hastalığın yaygınlığına y6nelik veriler yetersizdir.

**Echinococcus granulosus:** Erişkin *E.granulosus* 'un uzunluğu 3-6 mm olup nadiren 11 mm'yi bulabilmektedir. V6cudu ge6nç, olgun ve gebe olmak 6zere 3 (2-7) halkadan oluşmaktadır. Skoleksin 6apı 0,26-0,36 mm' dir ve 0,10-0,13 mm 6apında 4 kaslı 6ekmene sahiptir. Rostellumda iki sıra halinde dizilmiş 30-60 6engel bulunmaktadır.

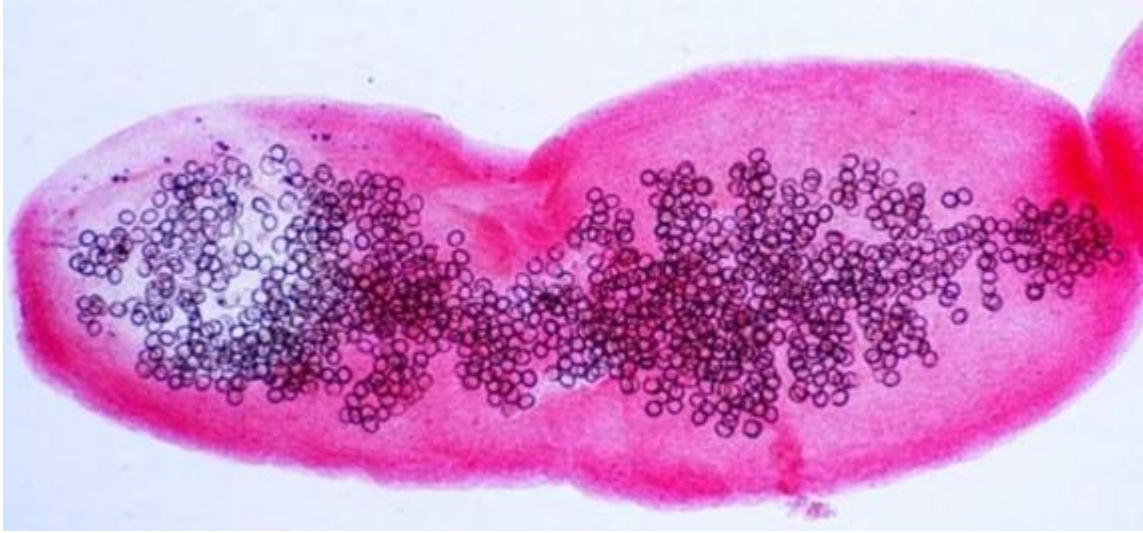
İlk on sıradaki 6engeller b6y6k ve 32-42  $\mu$ m, arka sıradaki 6engeller ise daha k66k ve 20-36  $\mu$ m uzunluğundadır. Olgun halkanın boyu, eninin iki katı kadar olup genital organları gelişmiş durumdadır.



**şekil 7 :** Erişkin *Echinococcus granulosus*

Dişi dölleme organları halkanın arka üçte birinde bulunmaktadır. Böbrek şeklindeki ovaryum halkanın ortasında yer almaktadır. Genital delik halkanın bir tarafında olup, halkanın daha çok arka yarısında, seyrek olarak da ortasına yakın dışarı açılmaktadır. Sayısı genellikle 25-80 arasında değişen testisler ise genital deliğin ön ve arka kısmında bulunmaktadır.

Gebe halka olarak adlandırılan son halka 1,02- 3,2 mm uzunluğunda olup, parazitin toplam uzunluğunun yarısı kadar veya daha büyüktür. Uterus halkanın içinde boylu boyunca uzanmakta, yanlara değişik sayıda kısa ve kör dallar vermektedir. İçerisinde yaklaşık 200-800 yumurta bulunmaktadır (42).



**Şekil 8 :** *Echinococcus granulosus* Gebe Halka

## **2.4. Kist Yerleştiği Tabakalar**

### **2.4.1. Perikist (Adventisya)**

En dışta yer alan tabaka kistin oturduğu organ tarafından kistin etrafında oluşturulan fibröz dokudur. Embriyo, konakçı dokuda lokal bir reaksiyona neden olur ve bu bölgeye mononükleer lökositler, lenfositler ve eozinofiller göçer. Zamanla hücrelerin yerini fibroblastlar alır. Bu tabaka parazite mekanik koruyucu ve besleyici bir görev üstlenir ve Perikist (adventisya) olarak isimlendirilir.

#### **2.4.2. Ektokist (Laminated membran veya Kutikula)**

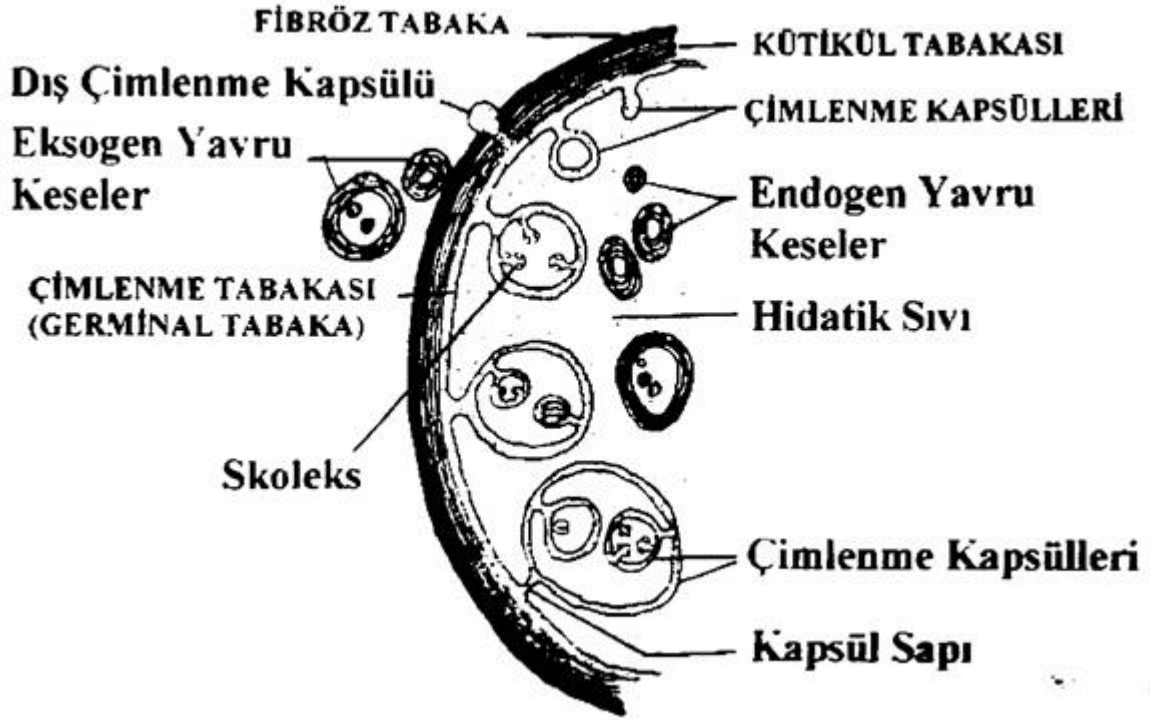
Kistin kendisinin oluşturduğu en dış tabakasıdır. Mukopolisakkaritlerden oluşmuştur. Kalınlığı 1-3 mm arasında değişmektedir, beyaz renkte koruyucu bir zardır, yaprakçıklar halindedir. Bakteriler için geçirgen değildir fakat besinlerin geçişini ve atıkların dışarı atılmasını sağlar. Kalsiyum, potasyum, su ve üreye geçirgendir. Kistin rüptüre olması için bu tabakanın zedelenmesi gerekir. Perikistik dokudan kolaylıkla ayrılabilir olması cerrahi girişim için avantaj sağlar.

#### **2.4.3. Endokist (Germinatif tabaka veya Çimlenme zarı)**

Kistin iç yüzeyinde ise germinatif tabaka bulunmaktadır. Bu tabaka granüller yapıda ve üreme yeteneğine sahiptir. 22-25 mikron kalınlığındadır. Kutikula ile arasında çok ince bir serbest boşluk bulunur. Bu zardan tomurcuklanma ile yavru kapsüller (kız veziküller) oluşur. Bu yavru kapsüllerin içinde de birçok skoleksler doğar bunlara protoskoleks denir. Kapsül geliştikçe içinde 5-20 adet 0,1 mm çapında skoleksler meydana gelir. Kistler skoleks içerip içermemesine göre fertil veya steril olarak nitelenir. Yavru kapsül içinde skolekslerin oluşumu, ana kistin erişkin hale geldiğini gösterir.

Oluşan yavru kapsüller kist içinde kalabilir veya kist içine açılabilir. Bu durumda protoskoleksler sıvıda serbest olarak bulunur, buna " hidatik kum "denir veya dışa doğru gelişerek " dış yavru kapsüller oluşur. Bu durumda kist multiloküler bir hal alır. Kız veziküller akciğer hidatik kistlerinde nadiren bulunmaktadır. Protoskoleksler kaya suyu içine dökülür. Protoskoleksler geliştikçe skoleksler kist sıvısının içinde birikir, sıvının miktarı artar ve bu kistin büyümesine neden olur ( 43).

Kist içeriğini dolduran sıvı " kaya suyu olarak adlandırılmaktadır. Bu sıvı kokusuz renksiz ve antijeniktir. Perfore olmamış kistler sterildir. Yoğunluğu 1007-1015, pH'ı 6,7-7,2 arasında değişmektedir. Hidatik sıvının aşırı artışı, beslenmeyi bozduğu için parazitin ölmesine neden olur.



Şekil 9: Echinococcus çimlenme kapsülü

#### 2.4.4. Protoskoleksler

Çimlenme kapsüllerinin içinde genellikle 10-30 adet protoskoleks doğar. 0,14-0,16 mm enindeki bu protoskolekslere erişkin formun skolekslerinden ayırt edilebilmesi için bu isim verilmiştir. Her biri 24-29 µm boyunda 32-40 adet çengeli bulunan ve 4 vantuza sahip olan rostellumun bulunduğu kısmın içe doğru dönük olmasından dolayı çengeller protoskolekslerin tam ortasında görülmektedir. Tam gelişmiş protoskoleksler, invagine rostellum üzerinde çengellerin oluşumuyla karakterizedir. Kist içerisinde protoskolekslerin çekmen, rostellum ve çengellerin bulunduğu ön kısım invagine durumda olup ortamda evaginasyona kadar dış etkilerden korunmaktadır.

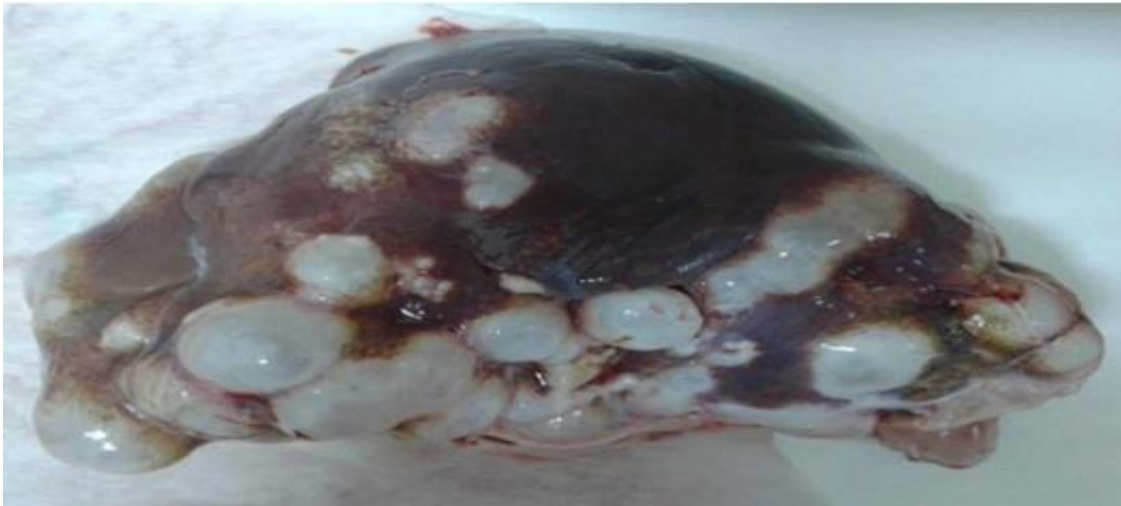
Protoskoleksler çimlenme kapsülünden serbest hale geçerken mitokondrilerin sayılarının arttığı ve evaginasyonun olduğu bildirilmiştir. Çimlenme kapsüllerinin duvarlarının yırtılmasıyla kist sıvısı içine dökülen protoskoleksler, bir kist içinde milyonlarca sayıda bulunabilirler.

Kist içinde serbest halde bulunan protoskoleksler keseleşerek yeni çimlenme kapsüllerini oluşturabilirler. Yaşlı (eski) kistlerin içerisinde kız keseler, serbest protoskoleksler, üreme kapsülleri kist sıvısında bir arada bulunurlar ve " hidatid kum " olarak adlandırılır.

İçinde üreme kapsülleri, protoskoleks ve kız keseler görülmeyen kistlere steril, protoskoleks taşıyanlara ise fertil kist denir. Kistlerin steril olmasında konağın türü ve yaşı önemli rol oynar. Yaşlı hayvanlar enfeksiyona daha az duyarlı olup genelde steril kistler oluşturmaktadır. Koyunlarda bulunan kistler genelde fertil iken, sığırlardakiler çoğunlukla sterildir. Sığırlardaki kistlerin %90'ında, domuzlardaki kistlerin %20'sinde, koyunlardaki kistlerin %8'inde protoskoleks bulunmamaktadır. Sığırlardaki kistler önce kazeifikasyona sonra da kalsifikasyona uğrar. Konağın yaşının artmasıyla steril kistlerin sayısında da artma görülür.



**Şekil 10:** Echinococcus Granulosus Protoskoleksleri Direkt Mikroskopik Görünümü



**Şekil 11:** Kistli Karaciğer

## 2.5. Echinococcus Granulosus Suşları

Echinococcus türleri için suş "aynı tür içinde gen frekansları yönünden ve ekinokozisin kontrolünde aktüel veya potansiyel biyolojik önemi bulunan bir veya daha fazla karakter yönünden istatistiksel olarak farklılık gösteren gruplar" şeklinde tanımlanmaktadır. Echinococcus cinsi içerisindeki varyasyon, nükleik asit sekanslarındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Bu farklılıklar, parazitin yaşam çemberi, konak özgülüğü, gelişim hızı, patojenitesi, antijenite ve kemoteropatik ajanlara duyarlılığı, bulaşma dinamikleri, hastalığın epidemiyolojisi ve kontrol yöntemleri üzerinde önemli derecede rol oynamaktadırlar. Bu bakımdan endemik bir bölgedeki baskın suş ya da suşların belirlenmesi parazitin kontrolü ve eradikasyonu açısından çok önemlidir ( 13, 44, 21, 42 ).

Yapılan son moleküler çalışmalar neticesinde *E.granulosus* cinsi içerisinde bugüne kadar 10 suş (G1-G10) tanımlanmıştır. Fakat yapılan son moleküler çalışmalarla genetik farklılıklarından dolayı *E.granulosus sensu stricto* (G1-G3), *E.equinus* (G4), *E.ortleppi* (G5) ve *E.canadensis* (G6-G10) ayrı birer tür olarak kabul edilmekte, *E.ortleppi* ve *E.canadensis* ise kardeş türler olarak tanımlanmaktadır.

Yeni filogenetik çalışmalarla bu beş suşun (G5-G10) yakınlıklarından dolayı bir grup olarak ele alınması önem kazanmaktadır. Bununla birlikte *E.granulosus'un* sınıflandırılması devamlı olarak değişiklik göstermektedir. *E.oligarthus* ve *E.vogeli* türlerine bağlı suş ise bulunmamaktadır (14, 16, 45, 46, 47).

### 2.5.1. Evcil Koyun Suşu (G1)

*E. granulosus'un* en önemli ve yaygın ara konağı evcil koyunlardır. *E. granulosus'un* evcil koyun suşu (G1) dünya çapında geniş bir dağılıma sahiptir. Güney Amerika'nın bir kısmı, Güney ve Doğu Avrupa, Kuzey ve Doğu Afrika, Asya'nın bir bölümü ve Avustralya'da bulunmaktadır. Evcil koyun suşu koyun dışında keçi, sığır, manda, deve, domuz gibi geniş bir ara konağa sahiptir. Şimdiye kadar insanlardan elde edilen *E. granulosus* materyalinin çoğu, moleküler yöntemler kullanılarak evcil koyun suşu olarak belirlenmiştir (13,42,48).



Son zamanlarda yapılan izoenzim ve moleküler çalışmalar, insan enfeksiyonlarının çoğunun kaynağının evcil koyun suşu olduğunu göstermiş ve Türkiye'de etkin suşun G1 olduğu; koyun, keçi, sığır, deve, köpek gibi birçok konaktan alınan izolatların incelenmesiyle ortaya konmuştur (49,50,51,52).

### **2.5.2. Tazmanya Koyun Suşu (G2)**

Bu suş Avustralya'nın Tazmanya adasında bulunmuştur. Yapılan morfolojik, biyolojik ve moleküler çalışmalar neticesinde Avustralya'nın Tazmanya adasındaki koyun izolatlarının, Avustralya ve başka bölgelerdeki koyun izolatlarından farklı olduğu görülmüştür. Buradaki enfeksiyonların Avustralya'dakinden farklı bir kökene sahip olduğu veya genetik bir değişim sonucunda oluştuğu belirtilmektedir. Bu genetik değişimin son konaklara arekolin uygulanması ile oluşabileceği düşünülmüştür. Diğer bir olasılık da, Tazmanya'da kesin konaklara tanısal arekolin uygulaması programının parazitte adaptif genetik farklılaşmaya yol açmasıdır. Tazmanya koyun suşu (G2) Tazmanya, Arjantin, Romanya ve Cezayir'de bulunmaktadır.

Moleküler olarak G1 ve G2 suşları arasında 3 nükleotidlik fark bulunmakta ve bu varyantlardan ikisi farklı aminoasit sentezine neden olmaktadır. Koyun suşunda (G1) yumurta çıkışı enfeksiyonu takip eden 45. günde olurken, bu suş ile yapılan deneysel enfeksiyonlarda 39. günde olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte G2'nin farklı bir suş olmadığı, sadece G3'un küçük bir varyantı olduğu da öne sürülmektedir ( 42,49,53,54,55 ).

### **2.5.3. Manda Suşu (G3)**

Özellikle Asya'da *E.granulosus*'un yaygın arakonağı mandalardır. Kistler genellikle akciğerlere yerleşmekte ve yüksek fertilitate göstermektedirler. Yapılan ilk çalışmalarla parazitin morfolojisi ve gelişiminin daha önce tanımlanan alt türlerden farklı olduğu görülmüştür. Bu çalışmalar sonucunda *E.granulosus canadensis* suşuna yakın olduğu düşünülmüştür. Geyikgillerde bulunan bu formun (*E.g.canadensis*) morfolojik olarak diğer suşlara nazaran sığır suşuna çok daha fazla benzediği belirtilmiştir.

Daha sonra yapılan moleküller çalışmalarında mandalarda koyun ve sığır suşlarının da var olduğu gösterilmiş, ayrıca domuzlarda da fertil G3 kistlerine rastlanmıştır.

Parazitin en önemli morfolojik özelliği, biri gebe, diğeri de genç ya da olgun olmak üzere toplam iki halkaya sahip olmasıdır( 42,50,56,57 ). Yapılan deneysel çalışmalarda manda kaynaklı kistler köpeklere yedirilmiş ve belli aralıklarla köpeklere otopsi yapılmıştır. Strobilar formların büyüme hızının en fazla enfeksiyondan sonra 10 ile 20. günler arasında olduğu gözlenmiştir.

20. Günde üreme organları iyi gelişmiş ve iki halkalı ergin parazitlere rastlanmıştır. Parazitin toplam uzunluğu 10. günde 0,80 mm, 20. günde 1,69 mm ve 64. günde 5,16 mm olarak ölçülmüştür. Erişkin parazitlerin en uzun olanının boyu 5,16 mm ölçülmesine rağmen ortalama 2,8 mm (1,4-5,16 mm) uzunluğunda bulunmuştur. 20. günde birinci halka 0,89 mm, ikinci halka 0,50 mm iken, 30. günde sırasıyla 1,14 mm ve 0,90 mm olarak ölçülmüştür. Enfekte edilen iki köpeğin dışkısında yumurtaya enfeksiyondan sonra sırasıyla 57. ve 59. günlerde rastlanmıştır (56).

G1-G2-G3 suşları, aralarında çok küçük nükleotid farklılıkları bulunan çok yakın gruplardır. Son yapılan morfolojik ve moleküler çalışmalar sonucu G1-G2-G3 suşlarının bir küme şeklinde *E.granulosus sensu stricto* olarak adlandırılması yönündeki görüşler ağırlık kazanmaktadır.

#### **2.5.4. At suşu(G4)**

Bu suş bazı Avrupa ülkelerinde, Ortadoğu ve Güney Afrika'da, Yeni Zelanda ve Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunmaktadır. At suşunun (G4) tek kesin konağının köpek olduğu görülmektedir. Yapılan bu çalışmalarda at kökenli parazitlerin, koyun kökenli parazitlerden oldukça önemli morfolojik farklılıkları olduğu gösterilmiştir. Yine bu araştırmacılar koyun ve atlarda bazı çapraz enfeksiyon denemeleri yapmış ve koyun kökenli enfeksiyonlara karşı atların daha dayanıklı olduğunu gözlemlemişlerdir.

Görünüyor ki morfolojik farklılıklar ve konak özgüllüğünden dolayı, atların arakonak olduğu *Echinococcus* formunun bu hayvanlara adapte olduğu düşünülmüştür.

İngiltere'de atlarda rastlanan bu form alt tür olarak tanımlanmış ve *E.granulosus equinus* olarak adlandırılmıştır.

#### **2.5.5. Sığır suşu(G5)**

*E. granulosus* 'un sığır suşu çeşitli Orta Avrupa ülkelerinde, Rusya, Güney Afrika, Hindistan ve Sri Lanka'da bulunmaktadır. Epidemiyolojik olarak arakonağın sırasıyla köpek ve sığır olduğu bilinmektedir (13). Sadece morfolojik olarak değil, biyolojik ve biyokimyasal olarak da diğer suşlardan farklıdır. Parazit son konak olan köpeklerde hızlı gelişim sürecine sahiptir ve prepatent süresi 33-35 gündür. Bu süre, diğer suşlarda ortalama 40-48 gün olan erginleşme zamanına göre oldukça kısadır. Köpeklerde 29 günde 2,6 mm boyutlarına ulaşırken, 35. günde 4,1-4,3 mm uzunluğa erişmektedir.

Daha çok arakonakların akciğerine yerleşmekte, kistlerin %90'dan fazlası fertil olabilmekte ve insanları enfekte edebilmektedir (42,55). G5, *E.granulosus*'un bir suşu olsa da son yıllarda *E.ortleppi* adıyla farklı bir tür olarak kabul edilmesi yönündeki görüşler ağırlık kazanmaktadır (14).

#### **2.5.6. Deve Suşu (G6)**

Develerin Afrika ve Orta Doğu'da *E.granulosus*'un önemli arakonağı olması sebebiyle G6 bu bölgelerde oldukça yaygındır. Develerden elde edilen parazitlerin çengellerinin sayısı ve büyüklüğü, koyun kökenlilere göre önemli farklılık göstermekte, büyük çengellerin uzunluğunun 35,4 um, kısa çengellerin uzunluğunun da 28,8 um olduğu belirtilmektedir.

Parazit köpeklerde hızlı gelişmekte, protoskolekslerin alınmasından 35 gün sonra ortalama 2,2 mm boyutlarına ulaşmaktadır. Prepatent süresi yaklaşık olarak 40 gündür. Develerden başka keçi ve sığırların da arakonaklık yaptığı bildirilmiştir. Kistler daha çok akciğerlere yerleşmekte ve genellikle yüksek fertiliteye (>%90) sahiptirler (42,58).

### **2.5.7. Domuz Suşu (G7)**

Polonya, Rusya ve diğer Doğu Avrupa ülkelerinde yapılan çalışmalar, domuz orjinli erişkin parazitlerin diğer izolatlardan morfolojik, biyolojik ve genetik olarak farklı olduğunu göstermiştir. Sonkonak köpeklerdeki gelişim süreçleri hızlıdır ve enfeksiyonu takiben 34. günlerde yumurta çıkışı olmaktadır. Bu süre G7 suşu ile enfekte köpeklere antiparaziter ilaçların daha kısa dönemlerle verilmesi gerektiğini göstermektedir. İnsan enfektiviteleri ise düşüktür.

### **2.5.8. Geyik Suşu (G8) ve Fennoscandian Geyik Suşu (G10)**

Geyikler, yabani hayvanlarda parazitin yaşam döngüsü açısından çok önemli arakonaklardır. Geyik suşu kuzey bölgelerde geniş bir yayılım göstermekte ve uygun koşullarda Kuzey Amerika ve Avrasya'nın bazı bölgelerinde görülebilmektedir.

### **2.5.9. İnsan Suşu (G9)**

Polonyalı hastalardan aspirasyon tekniği ile elde edilen parazit materyalinin PCR-RFLP ve DNA dizilim teknikleri ile incelenmesi neticesinde hastaların tüm dünyada yaygın olan koyun suşu ile enfekte olmadıkları görülmüştür. Enfeksiyona neden olan etkenin daha önce belirlenen G7 suşuna benzerlik gösterdiği, ancak ondan farklı bir suş olduğu anlaşılmış. Bu etkene G9 suşu adı verilmiştir (16).

## **2.6. *Echinococcus*'ta Tür ve Suş Belirlemede Kullanılan Yöntemler**

Direkt olarak parazit genomunu inceleyen DNA esaslı yöntemler; çevre veya konak kaynaklı faktörlerden veya yaşam döngü evrelerinden etkilenmeyen yöntemlerdir. Genetik varyasyon mitokondriyal veya nükleer genomda araştırılabilir. Evrimleşme hızı daha fazla olduğu için mitokondriyal DNA (mtDNA) yakın ilişkili organizmaların ayırımı için kullanışlıdır. mtDNA'nın rekombinasyon yapmaması analizleri basitleştirir.

Ribozomal DNA (rDNA) tekrar ünitesi, çeşitli hızlarda gelişen farklı bölgelere sahiptir. Bu bölge, taksonomik düzeylerde varyasyon ve filogeni çalışmalarında kapsamlı olarak kullanılmıştır (48).

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

PCR spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan in vitro bir yöntemdir. PCR ilk kez 1983 yılında Kary Mullis tarafından tanımlanmıştır. Moleküler yöntemlerden en geniş kullanım alanına sahip olan bu yöntem tek bir nükleik asidi bile gösterebilecek kadar güçlü bir çoğaltma yöntemidir. Özgül primerler kullanılarak hedef DNA'nın çoğaltılması esasına dayanmaktadır. PCR için, belirlenen nükleik asit gösterebilecek kadar güçlü bir çoğaltma yöntemidir. Özgül primerler kullanılarak hedef DNA'nın çoğaltılması esasına dayanmaktadır.

PCR için, belirlenen nükleik asit kısmının her bir zincirinin 3' ucuna tutunacak ve 5' yönünde uzayacak iki kısa nükleotid dizisi (primer), uzamayı sağlayacak olan DNA polimeraz enzimi, yeni zincirlerin yapısında yer alacak oligonükleotidler ve reaksiyon için gerekli tuzu içeren tampon solüsyonlara ihtiyaç vardır.

PCR çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır.

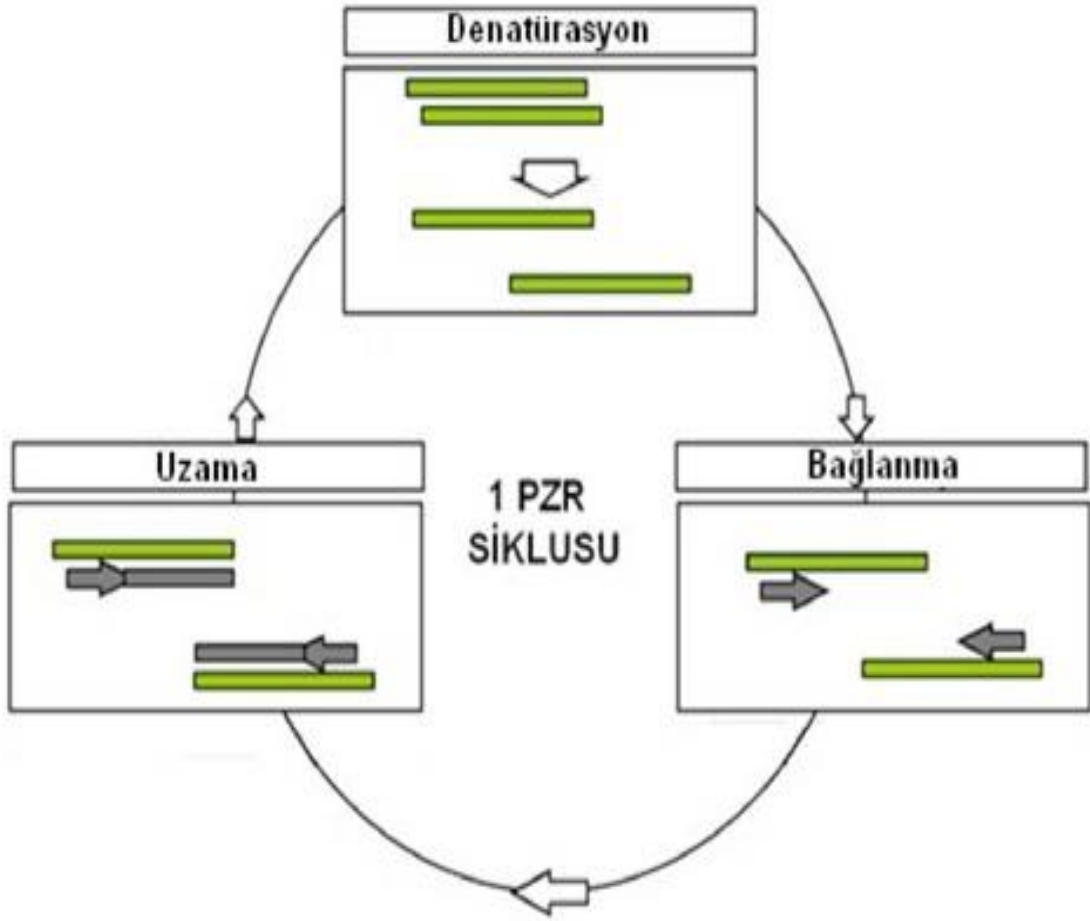
Primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle melezlenirler. Primerlerin spesifik olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleosid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Bir PCR döngüsü denatürasyon, primerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur. Ardarda tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA parçaları üssel olarak artar. Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primerler için kalıp görevi yapmasıdır.

Böylece her PCR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır. PCR boyunca biriken ürünlerin boyu iki primerin boyu ve hedef DNA bölgeleri arasındaki mesafelerin toplamı kadardır. PCR'nin temel bileşenleri; kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve MgCl<sub>2</sub>'dür. Amplifikasyon aşamasından sonra elde edilen ürünler, agaroz jel veya poliakrilamid jel elektroforezis ile ayrıştırılmakta, ethidium bromide ile boyanarak veya Southern blot analizi ile görünür hale getirilebilmektedir (62).

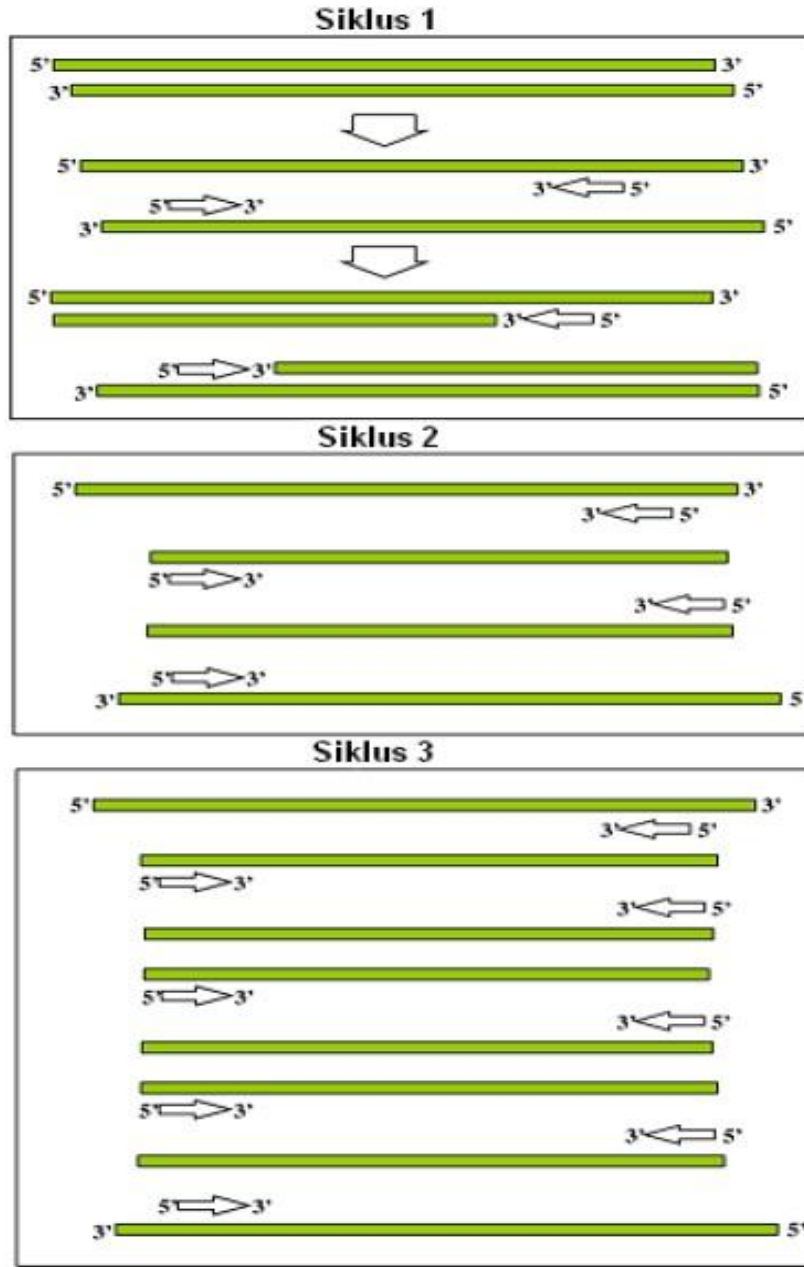
*Echinococcus granulosus* içerisindeki suşların tanımlanması ve gruplandırılmasında birçok PCR tabanlı yöntemler kullanılmaktadır. PCR, RFLP, PCR-RFLP, RAPD-PCR, SSCP, dideoxy fingerprinting (ddF) ve DNA baz dizi analizi gerek parazitlerin genom araştırmalarında, gerekse tanıya yönelik moleküler çalışmalarda kullanılan temel tekniklerdir (62,69). Tek bir nükleik asidi bile gösterebilecek kadar güçlü bir çoğaltma tekniği olan PCR bugün en yaygın kullanılan yöntemidir (98). DNA dizi analizleri ya da sekanslama ise herhangi bir DNA parçasında bulunan A,G,T,C nükleotid sıralarının belirlenmesi olarak tanımlanabilmektedir (71).



**Şekil 12:** PCR cihazı



Şekil 13: PCR Siklusunun aşamaları (107)



**Şekil 14** : PCR siklusları ile DNA'nın çoğalması(107)

### 2.6.2. Restriksiyon Fragman Uzunluğu Polimorfizmi(RFLP)

Restriction fragment length polimorphism (RFLP) DNA'da oluşan mutasyonları ortaya koymaya yarayan ve restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan değişik DNA segmentlerini belirlemeye yönelik tekniktir (63), ya da Southern Blotting tekniğinde saptanan aynı türün bireyleri arasındaki restriksiyon enzimleri ile kesim yerlerine bağlı olarak ortaya çıkan bant farklılıkları şeklinde tanımlanabilir (64).



**Bu tekniğin çalışma prensibi şu şekilde özetlenebilir;**

- 1- Elde edilen DNA önce RE ile kesilir,
- 2- Oluşan fragmentler elektroforetik olarak agaroz jelde ayrılır,
- 3- DNA fragmentleri nitroselüloz veya naylon membrana transfer edilir,
- 4- Radyoaktif veya non-radyoaktif problemlerle hibridizasyon sağlanır,
- 5- Sonuçlar otoradyografik olarak veya kolorimetrik olarak değerlendirilir (64,103).

Bu yöntem PCR-RFLP ile karşılaştırıldığında; uygulaması ve değerlendirmesi daha güçtür, sonuçlar daha uzun sürede alınmaktadır ve maliyeti daha yüksektir (104). Diğer tiplendirme teknikleri ile kıyaslandığında ise her iki yönteminde (RFLP, PCR-RFLP) ayırım gücü orta düzeydedir ancak laboratuvarlar arası uyumları daha iyidir (104).

Xue ve ark. (105), Çin'in 4 bölgesinden toplanan *E.granulosus* izolatlarından elde ettikleri DNA'yı RFLP ve Southern blot analizi ile incelemiş, neticede bu 4 bölgedeki koyunlardan toplanan izolatlar arasında ayırıcı yok ve koyun izolatları arasında genetik bir varyasyon olmadığını belirtmişlerdir.

### **2.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu - Restriksiyon Fragman Uzunluğu Polimorfizmi (PCR-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 (63).

Restriksiyon Enzimleri tip I, II, III olmak üzere üç temel gruba ayrılırlar ancak bu üç grup içerisinde sadece tip II enzimler çift iplikçikli DNA'da spesifik yerlere bağlanır ve belirli uzunlukta (4-7 baz aralığı) çift iplikçikte kesim yaparlar. Bu nedenle genetik manipülasyonlarda kullanılan enzimler tip II enzimlerdir (64).

Restriction fragment length polimorphism (RFLP) ise; DNA'da oluşan mutasyonları ortaya koymaya yarayan ve restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan değişik DNA segmentlerini belirlemeye yönelik tekniktir (63).

Bu yöntemde bilinen RFLP'den farklı olarak, genomik DNA'nın belirli bir bölgesi, spesifik primerler kullanılarak çoğaltılmaktadır. Diğer moleküler yöntemlerin avantajları fark edilinceye kadar PCR-RFLP yöntemi parazitlerin tanımlanması ve ayırt edilmesinde yoğun olarak kullanılmıştır (65). *Echinococcus granulosus*'un rDNA- ITS1 gen bölgesi kullanılarak yapılan PCR-RFLP uygulamasında; Bowles ve McManus'un tanımladığı yöntem modifiye edilerek kullanıldı( 48). Diğer moleküler yöntemlerin avantajları fark edilinceye kadar PCR-RFLP yöntemi parazitlerin tanımlanması ve ayırt edilmesinde yoğun olarak kullanılmıştır (67).Elde edilen ürünler bir veya daha fazla sayıda restriksiyon enzimi ile kesilmekte, agaroz jel elektroforez ile ayrılmakta, jel ethidium bromide ile boyanmakta ve son olarak ultraviyole ışık altında görüntüleme işlemi yapılmaktadır. PCR-RFLP, *Echinococcus* izolatlarının ya da öteki parazit gruplarının ayrımında kullanılan oldukça basit, duyarlı ve hızlı bir yöntemdir (66). RFLP, bu şekilde jelde oluşan DNA bantlarının sayısı ve yeri kıyaslanarak genom üzerinde belli bölgelerde oluşan tek baz çifti değişikliklerinin tespit edilmesi yöntemidir (67,65).

Bu yöntem *Echinococcus* izolatlarının tiplendirilmesi amacıyla birçok çalışmada kullanılmıştır. *E.granulosus*'un İspanyol suşlarının ayrımı amacıyla İspanyanın çeşitli bölgelerinden elde edilen 53 izolatın karakterizasyonu için PCR-RFLP yöntemi kullanılmıştır. Sonuç olarak; *E.granulosus*'un *E.multilocularis*'ten ayrımı yapılmış, İspanya'daki *E.granulosus* suşları tanımlanmış ve *E.granulosus*'un domuz izolatı içerisinde iki farklı genotipin bulunduğu belirlenmiştir. Domuz suşunun ileri ayrımını sağlamak amacıyla da NDI ve COI genleri amplifikasyona edip sekanslanmıştır. Çalışma sonucunda İspanya da G1 ve G7 genotiplerinin bulunduğu bir kez daha ortaya konulmuştur (66).

İran'da yapılan bir çalışmada; insanlardan ve koyun, keçi, sığır ve deve gibi çeşitli çiftlik hayvanlarından elde edilen 16 *Echinococcus* izolatı DNA sekanslama (NDI ve COI genleri) ve PCR-RFLP teknikleri ile incelenmiş ve neticede İran'da koyun ve deve genotiplerinin bulunduğunu belirlenmiştir (102).

İran'da yapılan başka bir çalışmada insan ve hayvanlardan toplanan *E.granulosus* izolatları hem PCR-RFLP yöntemi ile hem de morfolojik olarak incelenmiş ve çalışma sonucunda İran'da deve ve koyun suşlarının olduğu, deve suşunun insanlarda enfeksiyona neden olduğu ve bu suşun hem koyunları hem de sığırları enfekte ettiği belirlenmiştir (75).

Bowles ve ark, ribozomal DNA tekrarlarının nüklear ITS1 bölgesinin PCR-RFLP analizi ile geyik suşunun *E.granulosus*'un diğer suşlarından ayrılabilceğini belirtmişlerdir(106).

#### **2.6.4. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik Deoksiribonükleik Asit - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD-PCR)**

Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA - polimeraz zincir reaksiyonu, "random amplification of polymorphic DNA - polymerase chain reaction" (RAPD-PCR); nükleotid dizilimi rastgele seçilmiş tek bir primer kullanılarak DNA'nın çoğaltılması temeline dayanan bir polimorfizm inceleme yöntemidir. "Arbitrary priming - polymerase chain reaction" (APPCR) olarak da adlandırılan bu teknik; organizmalar arasındaki genetik ilişkilerin analizinde, tanımlama amacıyla çeşitli parazit gruplarında kullanılmaktadır. RAPD-PCR *Echinococcus* türlerini ve genetik olarak farklı *E. granulosus* suşlarını tanımlamada hızlı ve güvenilir bir yöntemdir (108,109 ). Slovakya'da yapılan bir çalışmada RAPD analizi ile domuz izolatları arasında iki farklı patern belirlenmiştir (110).

#### **2.6.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu - Tek Sarmal Konformasyon Polimorfizmi (PCR-SSCP)**

Polimeraz zincir reaksiyonu - tek sarmal konformasyon polimorfizmi, "polymerase chain reaction - single stranded conformation polymorphism" (PCR-SSCP); PCR ile çoğaltılmış çift iplikli DNA'nın ısıtma ile tek zincir haline dönüştürülüp, bu tek zincir DNA molekülünün nötral poliakrilamid jeldeki hareketinin incelenmesi temeline dayanır (111,112).

Tek zincir moleküller her bir zincir içinde nükleotidler arasında baz çiftleşmesinin sonucu olarak ikincil ve üçüncül yapılar oluşturur. Bu yapılar zincirin uzunluğuna ve baz çiftleşme bölgesinin yer ve sayısına bağlıdır.

Onlar da yüksek oranda molekülün birincil dizisine bağlıdır. Denatürasyonda dört farklı zincir oluşur. Bu zincirlerin üç boyutlu yapıları farklı olduğundan poliakrilamid jelde farklı hızlarda göç ederler.

Böylece, çoğaltılan DNA bölgesindeki tek baz değişiminin varlığı nedeniyle farklı örnekler farklı bant paternleri sergilerler. Fragment boyutunun mutasyon saptama oranını belirleyen en önemli faktör olduğu görülmektedir.

#### **2.6.6.Dideoksi Fingerprinting (ddF)**

Dideoksi fingerprinting (ddF), PCR ile çoğaltılmış segmentlerde tek baz ve diğer dizi değişikliklerinin varlığını tespit edebilen, dideoksi dizileme ve SSCP yöntemlerinin bir karışımıdır. ddF, bir dideoksinükleotidli Sanger dizileme reaksiyonunun ardından denatüre edici olmayan jel elektroforezini içerir (113). Gasser ve ark. (68) *Echinococcus* cinsinde mitokondriyal CO1 gen dizisini kullanarak genetik olarak tiplendirmede ddF yöntemini uygulamışlardır. *Echinococcus*'un yedi genotipinin ayırt edilebileceği, G1 genotipini yansıtan sekiz izolatin bazılarında kolay fark edilmeyen varyasyon profillerinin gözlemlendiği, genotip G4 ve genotip M2 olan iki örnek arasında varyasyon gözlenmediği belirtilmiştir.

#### **2.6.7.Deoksiribonükleik Asit Dizi Analizi**

Deoksiribonükleik asit dizi analizi herhangi bir DNA fragmanının nükleotid baz diziliminin ortaya konulmasıdır. DNA dizi analizi için en yaygın olarak kullanılan yaklaşım Sanger dizi analizidir. Sanger dizi analizinde başlangıçtaki orijinal kalıp için komplementer zinciri sentezleyen DNA polimerazı inhibe etmek amacıyla nükleotidlerin kimyasal analogları kullanılır. Kısa bir oligonükleotid ile DNA sentezi başlatılır ve DNA polimeraz kalıp iplik boyunca hareket eder veya radyoaktif işaretli nükleotidleri veya floresan işaretli nükleotidleri yeni sentezlenen zincir içerisine ekler. Dört sekans reaksiyonunun her birine dört normal nükleotidin her biri ve yalnızca bir inhibitör analogunun eklenmesi ile bir sekans bilgisi

sağlanır. Günümüzde, DNA dizi analizine ait işlemleri otomatik olarak gerçekleştiren cihazlar geliştirilmiştir ve hem normal hem mutant genlerin analizi için rutin olarak kullanılmaktadır(114).

*Echinococcus granulosus*'un genotip tayininde DNA dizi analizini kullanan Vural ve ark. (9) Türkiye'de çeşitli illerden İstanbul'a kesim amacıyla getirilen hayvanlardan elde ettikleri izolatların G1 veya G3 suşu olduklarını bulmuşlardır. Dizi analizi ve PCR-RFLP'nin birlikte kullanıldığı bir çalışmada ise, Türkiye'de doğu ve güney doğu illerinden toplanan 17 izolata dizi analizi uygulanmış, tamamı G1 suşu olarak belirlenmiştir (10). Yine, Snabel ve ark.'nın (89) yaptığı ve Ege Bölgesi'nden toplanan izolatları kapsayan bir çalışmada Türkiye'de ilk kez domuz suşu (G7) tespit edilmiştir.

## **2.7. Tanı**

### **2.7.1. Klinik Tanı**

Kistik ekinokokkozisin klinik belirtileri değişkendir ve kistin konumu, boyutu ve durumu ile tanımlanır. Enfeksiyon ile klinik belirtiler arasındaki zaman aralığı da değişkendir ve genellikle birkaç yılı bulur. Tanısı konan hastalar genellikle 10-50 yaş arasındadır(115). Çoğu hasta asemptomatiktir, bazen hemoptizi, abdomende sağ alt kadran ağrısı, ağrılı hepatik kitle bulunabilir. Kistlerin rüptüre olma oranı %20 olup ateş, pruritus, ürtiker ve bazen anafilaktik şok ve ölüm gözlenir (117). Skolekslerin salınması enfeksiyonun yayılmasına yol açar. Pulmoner kistlerin rüptürü öksürük, göğüs ağrısı ve hemoptiziye de neden olabilir. Karaciğer kistleri diyaframı geçebilir veya safra kanalı veya peritoneal kaviteye rüptüre olabilir (116). Kistlerin biliyer ağaç veya bronkus içine rüptüre olması obstrüksiyon veya postobstrüktif bakteriyel enfeksiyona neden olabilir. Bakteri kiste girebilir ve kistte piyojenik abse oluşmasına neden olabilir (32). Kardiyak lezyonlar; ileti bozuklukları, ventriküler rüptür ve embolik metastazlar ile birlikte olabilir. Dolaşımdaki antijen-antikor kompleksleri böbrekte birikebilir ve membranöz glomerülonefriti başlatabilir(116). Serebral kistlerin ilk semptomları artmış kafa içi basıncı veya fokal epilepsi olabilir. Renal kistler bel ağrısı veya hematüri ile kendini gösterebilir. Kemikteki kistler patolojik kırıklar meydana gelinceye kadar genellikle asemptomatiktir(115).

Hidatidoz'da klinik tablo çok farklı olup, her yaşta ve organda görülebilmektedir. İnsanlarda sıklıkla klinik belirtiler gözlenmesine rağmen hayvanlarda çoğunlukla hiçbir klinik belirti görülmez.

Intraabdominal yerleşimli kistleri olan hastalarda öne çıkan semptomlar karın ağrısı, ateş ve dispeptik şikâyetlerdir (118,119). Türkiye'de pulmoner hidatik kistleri olan hastalardaki başlıca semptomlar öksürük, balgam çıkartma, göğüs ağrısı, hemoptizi, solunum zorluğu, kistik sıvı ve membranların ekspektorasyonu olup hastaların bir bölümünde ise herhangi bir yakınma bulunmamaktadır (118,120,121).

Bu yüzden klinik belirtiler görüntüleme teknikleri ve seroloji ile doğrulanmalıdır. E. granulosus karaciğerde (%63), akciğerler (%25), kaslar (%5), kemik (%3), böbrek (%2), beyin (%1) ve dalak (%1) gibi organları tutar (59).

### **2.7.2. Spesifik Tanı**

Bir kistin varlığını onaylamak için görüntüleme tekniklerinin ve bunların sonucunu desteklemek amacıyla serolojik tekniklerin kullanımı gerekmektedir (60). Antikor testleri, KE'li bazı hastaların saptanabilir immün yanıtı gösterememesine karşın olası radyolojik tanıyı doğrulamada ve cerrahi veya farmakolojik tedavi sonrası hastaların takibinde kullanılır(20,39). Karaciğer kistleri akciğer kistlerinden yüksek olasılıkla daha fazla bir immün yanıtı neden olur. Yerleşimi dikkate almadan, serolojik testlerin duyarlılığı kist içinde ekinokokkal antijenlerin toplanma derecesi ile ters orantılıdır. Örneğin, sağlam, bütünlüğü bozulmamış kistler minimal saptanabilir yanıtı neden olurken, rüptüre olmuş veya sızan kistler güçlü immün yanıt ile ilişkilidir (39).

"Enzyme-linked immunosorbent assay", IHA testi, lateks aglütinasyon ve immünblot test en yaygın kullanılan serolojik yöntemlerdir.

İmmünfloresans test ve arc-5 immünelektroforez de kullanılan diğer yöntemlerdir (20). Serolojik yöntemler, karaciğer kistleri için %80-100 duyarlı ve %88-96 özgül olup akciğer kistleri için duyarlılık %50-56.

Diğer organ tutulumları için %25-56 ve multiple organ kistleri için %90-100'dür (95,103). Diğer sestod enfeksiyonları (*E. multilocularis* ve *Taenia solium*) bazı helmint hastalıkları.

### 2.7.2.1. Görüntüleme Yöntemler

Hidatidoz'un tanısında kullanılan başlıca görüntüleme yöntemleri şunlardır.

- Ultrasonografi (USG)
- Bilgisayarlı tomografi (BT)
- Manyetik rezonans Görüntüleme (MR)
- X-Ray (Röntgen)

Herhangi bir organı izleme olanağı sunan BT, daha küçük kistleri saptaması, boyutlarını ölçmesi, parazitik kist oluşumlarını parazitik olmayanlardan ayırt edebilmesi nedeniyle USG'ye oranla daha üstündür. Ancak BT 'nin yüksek maliyeti kullanımını kısıtlamaktadır.

### 2.7.3. Serolojik Yöntemler

Günümüzde Hidatidoz'un radyolojik tanı yöntemleriyle teşhis edilmeye çalışılmasına rağmen kistin tümör, apse gibi olgularda ayırıcı tanı yapılabilmesi için serolojik tanı yöntemleriyle desteklenmesi gerekmektedir.

#### **Hidatidoz'un tanısında kullanılan serolojik testler:**

1. Casoni deri testi
2. Kompleman birleşme testi (CF) (Weinberg)
3. Latex Aglutinasyon (LA) Testi
4. Indirekt Hemaglutinasyon (IHA) Testi
5. Immunodiffuzyon (ID) ve Immunoelektoferez (IE) Testleri
6. Indirekt Floresan Antikor (IFA) Testi
7. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Testi
8. Blotting yöntemleri
9. Bentonit Flocculasyon (BF)
10. Double Diffusion 5 (DD5)

Kist hidatik genetik materyali daha ileri tekniklerle (PCR) kolayca saptanabilmekte fakat kullanımı oldukça kısıtlıdır(61). Veteriner hekimlikte klinik teşhis hemen hemen imkansızdır; çünkü teşhise yardımcı olacak karakteristik bir semptom tespit edilemez.Ülkemizde serolojik testlerin kullanımı ile ilgili yapılan çalışmada IFAT'ın % 78,95 , IHAT'ın ise % 78,29 sensitivite gösterdiği bildirilmiştir. Kesin teşhis otopsi ile konur.Hidatik kistler kalın ve opak oluşu, delince fışkıracak derecede basınçlı kist sıvısı içermesi, fertil kistlerde protoskolekslerin bulunması, kist cidarının suya batırıldığında boru gibi kıvrılması ile hidatik olmayan kistlerden kolayca ayrılır.

## **2.8. Tedavi**

Kist hidatik tedavisinde en çok başvurulan tedavi şekli cerrahidir. Bununla birlikte punctureaspiration- injection-re-aspiration (PAIR) ve kemoterapinin girişi özellikle inoperabl kistler ve yüksek hayati risk taşıyan kistlerde, alternatif tedavi olmuştur. Operasyon öncesi Benzimidazollerden albendazol ve mebendazol ile kemoterapi sekonder hidatidozis riskini azaltır. Kist hidatik tedavisinde albendazol 10-15 mg/kg/ gün dozda birkaç ay boyunca 14 günlük aralarla uygulanır. Mebendazol'ün oral dozu en az 3-6 ay olmak şartıyla 45-50 mg/kg/gün dür. Ayrıca tedavide benzimidazollere alternatif olarak bir isoquinoleine türevi olan praziquantel 40 mg/kg/ hafta dozunda kullanılabilir ( 94).

## **2.9. Bulaşma Yolları**

### **2.9.1. Sindirim yolu**

#### **2.9.1.1.Transhepatik Yol**

Ağız yoluyla vücuda giren yumurtalar enzimlerin etkisiyle serbestleşerek, jejunum ile ileum duvarından vena porta yoluyla karaciğere gelir. 30 mikron çapındaki karaciğer sinüzoidleri tarafından bloke edilenler primer karaciğer kist hidatiğini oluşturur.



Karaciğerde tutulmayarak karaciğer barajını aşanlar akciğer kapilleri tarafından tutularak primer akciğer kist hidatiğini oluşturur (20).

### **2.9.1.2. Direkt Yol**

Duodenum arka duvarını delen embriyon vena kava inferior dalları içerisine girer. Sağ kalp ve pulmoner arter yoluyla akciğer filtresine ulaşır.

### **2.9.1.3. Lenfatik Yol**

Bağırsak sisteminden lenfatik sisteme geçer. Duktus torasikus yoluyla v.subklavia sinistraya ve buradan vena kava superior, sağ kalp ve akciğere ulaşır. Embriyonlar, anatomik portokaval anastomozlardan da yine direkt olarak karaciğere uğramadan akciğer filtresine takılabilmektedir. Kolonlara kadar sürüklenmiş olanlar, v.hemorroidalis inferiorların içerisine girerek vena kava inferiora dahil olurlar (20).

### **2.9.2. Solunum Yolu**

Larvaların giriş yollarındandır. Deve tarafından 1907 yılında embriyon zarının dejenere olması için sindirim enzimlerinin mutlaka gerekli olmadığını belirtilerek vücudun her dokusunda bunun mümkün olduğunun açıklanmasıyla solunum yolu ile bulaşmanın mümkün olduğu görüşü ortaya çıkmıştır. Gıda ve tozlarla ağız boşluğuna geçen ekinokok yumurtası, gıda maddeleri ile sindirim sistemine geçebileceği gibi bronşlara da geçebilmektedir. Loblara giden ana bronşlar sağda daha dikey olduğundan yumurtalar, sağ alt lobda daha çok yerleşmektedirler (52).

## 2.10. Korunma

Parazitin (*Echinococcus granulosus*) biyolojik çemberinin kırılması hastalığın kontrolünde en önemli noktalardan biridir.

### 1. Eğitim verilecek kitleler

Okul çocukları

Köpek sahipleri

Hayvancılık yapanlar

Mezbaha çalışanları

Kasaplar

Çiftçiler

Tedavi edilen hastalar ve yakınları

Anne-babalar

### 2. Eğiteceğimiz kitlelere ulaşabilmek için kullanacağımız eğitim ortamları;

Okullar

Sağlık kurumları (özellikle sağlık ocakları)

Kışlalar

Camiler (özellikle Kurban Bayramı'nda)

### 3. Eğitimde kullanacağımız araçlar;

Örgün eğitimde sağlık bilgisi kitapları

Yazılı ve görsel basın (Kurban Bayramı öncesinde yoğunlaştırarak)

El ilanları, afişler, broşürler (Kurban Bayramı öncesinde yoğunlaştırarak) Enfeksiyon zincirinde yer alan önemli bir canlı olarak köpeklere yönelik yapılacak girişimleri ise şu şekilde sıralayabiliriz;

## **1. Köpek sayısının kontrol altında tutulması**

Köpek nüfus planlaması (dişi sokak köpeklerinin belediyeler tarafından kısırlaştırılması)

Bütün köpeklerin kayıtlı hale getirilmesi ve sahip değişikliklerinin belediyelere bildirilmesi

Kayıt altına alınan köpeklerin kimlik kaydını ve aşı durumunu gösteren tasmaların kullanılmasının zorunlu hale getirilmesi

Başboş köpeklerin belediyelerce toplanarak barınma evlerinde tutulması

Köpek sahipliliğinin özendirilmesi

## **2. Köpeklerin parazitlerle enfekte olmalarının önlenmesi**

Araçnak olan kasaplık hayvanların kesiminin yalnızca mezbahalarda yapılması

Hayvan kesim yerlerinin kesinlikle veteriner kontrolünde olması

Mezbahalarda kesim sonrası kistli organların uygun biçimde yok edilmesi

Mezbahaların yakın çevresine köpeklerin gelmesinin önlenmesi

Ölen hayvanların cesetlerinin uygun şekilde imhası

## **3. Köpeklerin paraziti bulaştırmasının önlenmesi**

Köpeklerin sebze bahçeleri, çocuk bahçeleri ve parklarda dışkılamalarının önlenmesi

Çocuk yuvalarına, gıda maddesi satan yerlere köpeklerin sokulmasının önlenmesi

(41). Parazitin karmaşık yaşam döngüsü, korunma ve kontrol programlarının yürütülebilmesi için multidisipliner bir yaklaşım gerektirmektedir.

Dolayısıyla ilgili kurum ve kuruluşların bu konu üzerinde bir örgütlenme yapısına girmesi belirli aralıklarla yapılacak durum değerlendirmelerine göre stratejiler belirlemeleri gerekmektedir.

### **3. MATERYAL ve METOT**

Çalışmamızda, Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi ve Şanlıurfa Mehmet Akif İnan Eğitim Araştırma Hastanesine kist hidatik ön tanısı ile operasyona alınan hastalardan elde edilen örnekler (Genel cerrahi, Üroloji, v.b. ) ve DEM-ET mezbahanesinden alınan kistli hayvan organı örnekleri kullanılmıştır. Hayvan ve insanlardan alınan toplam 197 örnek öncelikle mikroskopta kist hidatik yönünden direk olarak incelenmiştir. Pozitif örnekler fertilité yönünden değerlendirilerek fertil olan 113 adet örnek, çalışılana kadar % 70 etil alkol içine konarak -20°C'de saklanmıştır. 197 tanesi sterilite yönünden değerlendirilmiştir. Steril olan 84 örnek çalışmaya alınmamıştır.

#### **DNA Ekstraksiyonu**

DNA ekstraksiyonu için öncelikle standardizasyon yapılmış ve 250 ve üzeri protoskoleks içeren örnekler ekstraksiyona alınmıştır. Genomik DNA ekstraksiyonu firmanın önerilerine göre RTA Dokudan ve Parafine-Gömülü dokudan Genomik DNA İzolasyon Kiti (RTA,Gebze/Kocaeli) kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA miktarları spektrofotometre ile ölçülmüştür.

Daha sonra DNA örnekleri PCR ile BD1 (5' GTC GTA ACA AGG TTT CCG TA 3') ve 4S (5' - TCT AGA TGC GTT CGA (A/T) GTC GAT G 3') primerleri kullanılarak ribozomal DNA internal transcribed spacer gene 1 (rDNA-ITS1) bölgesi çoğaltılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri, Rsa 1, Alu 1, Taq 1 restriksiyon enzimleriyle muamele edilerek %2 lik agaroz jelde yürütülerek ethidium bromide ile boyanmış ve UV transilluminatörde restriksiyon profilleri görüntülenmiştir.

## ÇALIŞMA AKIŞI

1. Örneklerin toplanması

2. Direkt mikroskopik inceleme

3. DNA ekstraksiyonu

a) Ekstraksiyonun standardizasyonu

b) Ekstraksiyon Aşamaları

c) Ekstrakte edilen ürünlerdeki DNA miktarının belirlenmesi

4. Ribozomal DNA ITS1 gen bölgesi kullanılarak PCR-RFLP yönteminin uygulanması

### 3.1. Örneklerin Toplanması

**Öncelikle:** %70 etil alkol: Etil alkol absolute (Merck) / distile su oranı 100 ml/39 ml olacak şekilde hazırlandı.

**1. Örneklerin toplanması:** 18.03.2014- 30.01.2015 tarihleri arasında Şanlıurfa Mehmet Akif İnan Eğitim Araştırma Hastanesine ile Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastaneslerinde elde edilen kist hidatik materyalleri ve DEM-ET mezbahanesinden alınan kistli hayvan organı örnekleri çalışmaya alındı. Alınan örneklerin türü ve kaynağı Tablo 3'de verilmiştir. Yapılan çalışma Harran Üniversitesi Tıp Fakültesinden 17.03.2014 ve 04. oturumla alınan etik kurul raporuyla onaylanmıştır.

İnsan ve hayvanlardan alınan kist sıvısı ve/veya germinal membran örnekleri ikiye bölünerek birer örnek, ayrı ayrı olacak şekilde steril %70 etil alkol içeren tüplere konularak DNA ekstraksiyonu yapılmak üzere -20 °C'de saklandı (39). Diğer örnekler laboratuvarında direk mikroskopik inceleme yapmak üzere etil alkol içermeyen tüplere alındı.

**Tablo-3: İnsan ve Hayvanlardan Alınan Örneklerin Türlerine Dağılımı**

Türler	Kist sıvısı	Germinal membran	Parafin bloklarda saklanan	Toplam
İnsan	7	3	30	40
Sığır	17	-	-	17
Koyun	80	60	-	140
Toplam	104	63	30	197

## **3.2. Direkt Mikroskopik İnceleme**

Mikroskopik inceleme için; 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilen kist sıvısı ve germinal membrandan alınan küçük kesitler lam-lamel arası preparat hazırlanarak, protoskoleks ya da çengel varlığı açısından 10X10 büyütme ile ışık mikroskopunda incelenmiştir. Protoskoleks ve/veya skoleks çengeli bulunan örnekler fertil olarak değerlendirildi.

## **3.3. DNA Ekstraksiyonu**

### **3.3.1. Ekstraksiyonun standardizasyonu**

Bir örneğin ml'sinde bulunan ortalama protoskoleks sayısını belirlemek için mikropipet yardımı ile 10 µl sıvı lam- lamel arasına alınarak mikroskopla protoskoleks sayımı yapıldı. Her örnekten 3 örnekleme yapılarak ortalaması alındı ve 10 µl sıvıdaki ortalama protoskoleks sayısı belirlendi. Daha sonra ortalama 20, 50, 70,100, 140,180, 250, 300, 350 protoskoleks kullanılarak DNA ekstraksiyonları yapıldı. 250 protoskoleksin altında yapılan ekstraksiyondan elde edilen genomik DNA kullanılarak yürütülen PCR'da band elde edilemedi. 250 ve üzerinde protoskoleks taşıyan örneklerden yapılan ekstraksiyondan elde edilen genomik DNA kullanılarak yapılan PCR'da elde edilen bandların aynı olduğu görüldü. Standardizasyon değeri olarak 250 ve üzerinde protoskoleks taşıyan örnekler DNA ekstraksiyonu için kullanıldı.

### **Kullanılan kimyasallar:**

1. Fosfat tampon solüsyonu (PBS) tablet
2. Xylene
3. Etanol (96-100%)

### **3.3.2. Ekstraksiyonun Aşamaları**

**Öncelikle** -20 °C'de saklanan materyaller çıkarılıp çözünmesi beklendikten sonra 5 kez steril PBS ile yıkandı.

Ardından kit üreticisinin önerileri doğrultusunda RTA Dokudan ve Parafine-Gömülü dokudan Genomik DNA İzolasyon Kit kullanılarak DNA izole edildi. Parafine gömülü doku örneği için öncelikle

1. Parafine gömülü doku örneğini 1,5 ml'lik nükleaz-içermeyen mikrosantrifüj tüpünün dibine yerleştirildi.
2. 1 ml xylene eklenip vorteks yapılarak karıştırıldı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Bu işlemi birkaç defa tekrarlandı.
3. 14,000 x rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı. Üst sıvı atıldı.
4. 2-3. basamaklar bir kaç kez daha tekrar edildi.
5. 1 ml etanol (96-100%) eklenip vorteks yapılarak karıştırıldı. 14,000 x rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı ve üst sıvı atıldı.
6. 1 ml etanol (90 %) eklenip vorteks yapılarak karıştırıldı. 14,000 x rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı ve üst sıvı atıldı.
7. 1 ml etanol (85 %) eklenip vorteks yapılarak karıştırıldı. 14,000 x rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı ve üst sıvı atıldı. .
8. 1 ml etanol (70 %) eklenip vorteks yapılarak karıştırıldı. 14,000 x rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı ve üst sıvı atıldı.
9. Çökeltiyi kurutmak için oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
10. 200 µl Solüsyon DL ve 20 ul Proteinaz K eklendi.

### **Doku içinde 2. basamak ile devam edildi.**

1. 20-30 mg doku örneği 1,5 ml'lik nükleaz-içermeyen mikrosantrifüj tüpünün dibine yerleştirildi  
200 µl Solüsyon DL ve 20 µl Proteinaz K eklenir. Hızlı ve verimli liziz için, taze yada donmuş doku hemen parçalandı.
2. Vorteks yapılarak karıştırılır ve 56 °C'de 1 gece doku tamamen sindirilip hiç parça kalmayana kadar inkübe edildi. İnkübasyon sırasında örneklerin karıştığından emin olmak için örnekleri her 10 dakikada bir vorteks ile karıştırıldı.
3. 250 µl Solüsyon B eklenip 20 saniye vurum-vorteks yapılarak karıştırıldı.

4. Kısa santrifüjden sonra her 3 dakikada bir karıştırılarak 65 °C'de 15 dakika inkübe edildi.
5. 200 µl etanol (96-100% ) eklenip, 20 saniye vurum-vorteks yapılarak karıştırıldı.
6. Kısa santrifüjden sonra karışım, toplama tüpünün içine yerleştirilmiş spin kolona aktarıldı.
7. 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Sıvı içeren alttaki tüp atılır ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
8. 700 µl Solüsyon W1 eklendi 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
9. 700 µl Solüsyon W2 eklendi. 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi.
10. 14,000 x rpm'de 30 saniye santrifüj yapıldı.
11. Spin kolon, steril 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpe transfer edildi.
12. 200 µl 70 °C ısıtıldı. Solüsyon E eklendi ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi.
13. 14,000 x rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
14. Spin kolon atıldı, mikrosantrifüj tüpünün içindeki elüsyon tamponunda genomik DNA kaldı. Mikrosantrifüj tüpünde kalan materyal DNA eldesi olarak, kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

### **3.3.3. Ekstrakte edilen ürünlerdeki DNA miktarı belirlenmesi**

Ekstraksiyon sonucu elde edilen ürünlerindeki DNA miktarı spektrofotometreyle ile ng/ul olarak belirlendi.

### **3.4. Ribozomal Deoksiribonükleik Asit "Internal Transcribed Spacer 1" Gen Bölgesi Kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (rDNA ITS1-PCR)**

#### **Kullanılan kimyasallar:**

1. **0,5x TBE tampon solüsyonu:** 10x TRIS borate-EDTA buffer solüsyon (Bioshop canada) distile su ile 1/20 oranında sulandırıldı.



**2. %1 agaroz jel:** 0,5 g agaroz (Sigma, ABD) 0.5x TBE tampon solüsyonu ile 50 ml'ye tamamlandı. Karışım; mikrodalga fırında kaynatıldı, soğuması için bir süre bekletildi, sonra içine 2,5 ul etidyum bromid (10 mg/ml, Sigma, ABD) eklendi.

**3. %2 agaroz jel:** 1 g agaroz (Sigma, ABD) 0,5x TBE tampon solüsyonu ile 50 ml'ye tamamlandı. Karışım; mikrodalga fırında kaynatıldı, soğuması için bir süre bekletildi, sonra içine 2,5 µl etidyum bromid (10 mg/ml, Sigma, ABD) eklendi.

**4.Taq PCR Core kit:** 250 unit(Solis Bio Dyne)

**5.Distile Deiyonize su** (Bioshop canada)

**6.Primerler:** BD1(5' GTC GTA ACA AGG TTT CCG TA 3 ) (Metabion)

4S(5' - TCT AGA TGC GTT CGA (A/T) GTC GAT G 3 ) primerleri

**7.TaqI enzimi** (EURx)

**8. AluI enzimi** (EURx)

**9. RsaI enzimi** (EURx)

**10.DNA boyut markın** (100 bp DNA Ladder; Solis BioDyne) Toplam 40 ul'lik hacim olacak şekilde PCR gerçekleştirildi.

**PCR karışımı:**

**Primer BD1:** 1 µl

**Primer 4S:** 1 µl **Taq PCR Mix:** 8 ul **genomik DNA:** 6 ul Distile su 40 µl'ye tamamlandı.

**PCR şartları:** Amplifikasyon: Ribozomal DNA-ITS1 gen bölgesini çoğaltmak amacıyla termal döngü cihazı şu şekilde programlandı: 35 PCR siklusu

94 °C'de 5 dakika ön denatürasyon

95 °C'de 1 dakika denatürasyon

53 °C'de 1 dakika bağlanma

72 °C'de 1 dakika sentez

72 °C'de 5 dakika son uzama

Tüm PCR uygulamalarında; pozitif kontrol olarak Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD'nda görevli Prof.Dr. Sami ŞİMŞEK'ten temin edilen evcil koyun suşu DNA'sı kullanıldı.

Elektroforez ve değerlendirme: %1'lık Agaroz jelde ilk kuyucuğa 8 µl DNA boyut markırı yüklendi ve diğer kuyucuklara 10 µl PCR ürünü yüklenip jele yüklendi.

Elektroforez tampon solüsyonu olarak 0,5x TBE kullanıldı ve elektroforez cihazında 90 voltta 2 saat süresince yürütüldü. UV ışığı altında DNA boyut markırı ve pozitif kontrole göre uygun yerde bant görülen örnekler çalışmanın devamında kullanıldı.

### **3.5. ITS1-PCR-RFLP Yönteminin Uygulanması:**

ITS-1 geni yönünden pozitif olduğu belirlenen PZR ürünleri *AluI*, *RsaI*, ve *TaqI* enzimleri ile kesim işlemine tabi tutuldu. Reaksiyon içeriği şu şekilde idi

**PCR ürünü:** 15 µl

**10x restriksiyon tamponu:** 5 µl

**BSA:** 0,5 µl

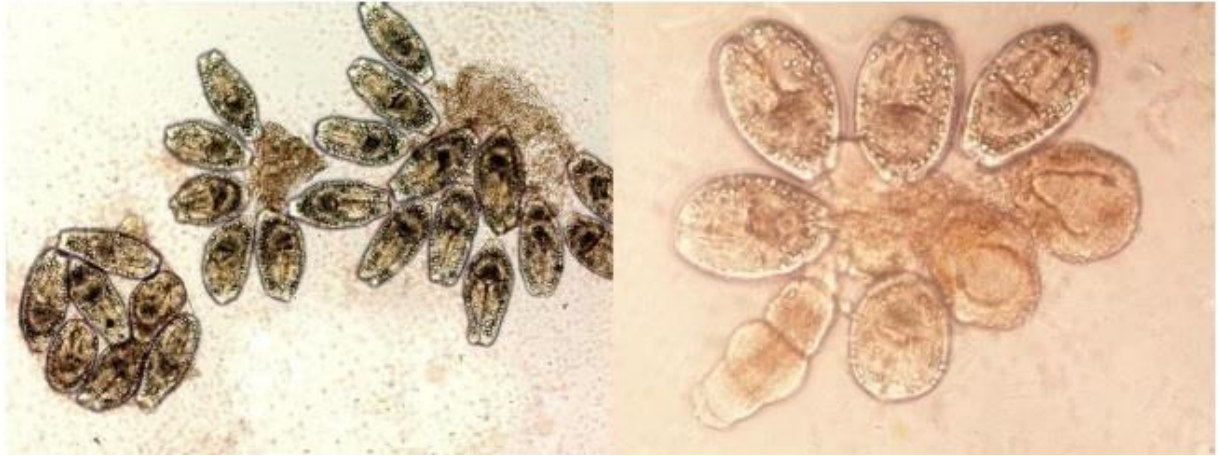
**Restriksiyon enzimi:** 0,4 µl

Steril distile su ile 50 µl'ye tamamlandı. Restriksiyon enzimleri ile ayrı ayrı kesim yapıldı. *AluI*, *RsaI* enzimleri için 37 °C'de ve *TaqI* enzimi için 65 °C'de 1.30 saatlik inkübasyon işlemi uygulandı. Kesim işlemi yapıldı.

Elektroforez ve değerlendirme: İnkübasyon sonunda ürünler %2'lik agaroz jele yüklendi. Agaroz jelde ilk kuyuya 8 µl DNA boyut markırı yüklendi ve diğer kuyucuklara 15 µl kesim ürünleri jele yüklendi. Elektroforez 90 voltta 2 saat süresince elektroforez işlemi uygulandı. Bu süre sonunda agaroz jel UV ışıkta görüntülenip fotoğrafları çekildi.

#### 4. BULGULAR

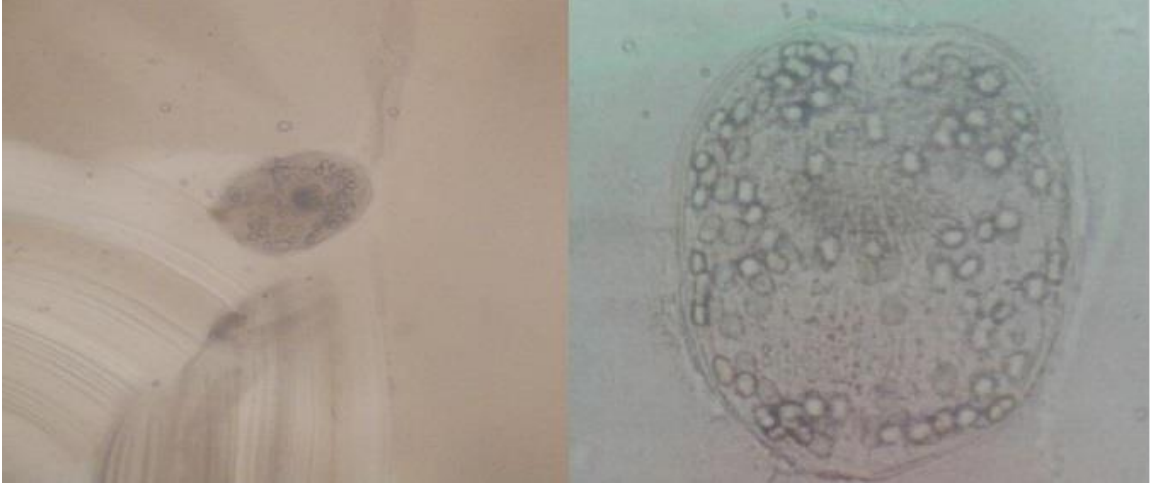
Çalışmada insan ve hayvanlardan alınan toplam 197 örnek incelenmiştir. İncelenen bu örneklerin 113'ü fertil, 84'ü steril olarak bulunmuştur (Tablo 4). Fertil olan 113 örnek ekstraksiyon standardizasyonu ve örnek miktarına göre değerlendirildikten sonra uygun olmayan örnekler çalışma dışı bırakılmıştır. Buna göre moleküler çalışmada kullanılan toplam örnek sayısı 60 olarak tespit edilmiştir. Çalışmaya alınan bu 60 örneğin 13'ü insanlardan, 47'si koyunlardan alınmıştır. İnsanlardan alınan 13 örneğin 10 tanesi parafin bloklarda saklanmış kist örneği, 3 tanesi germinal membran örneği olarak tespit edilmiştir.



Şekil 15 : Fertil Kiste Protoskleks

Tablo-4: İnsan ve Hayvanlardan Alınan Kist Örneklerinin Fertilité durumuna göre Dağılımı

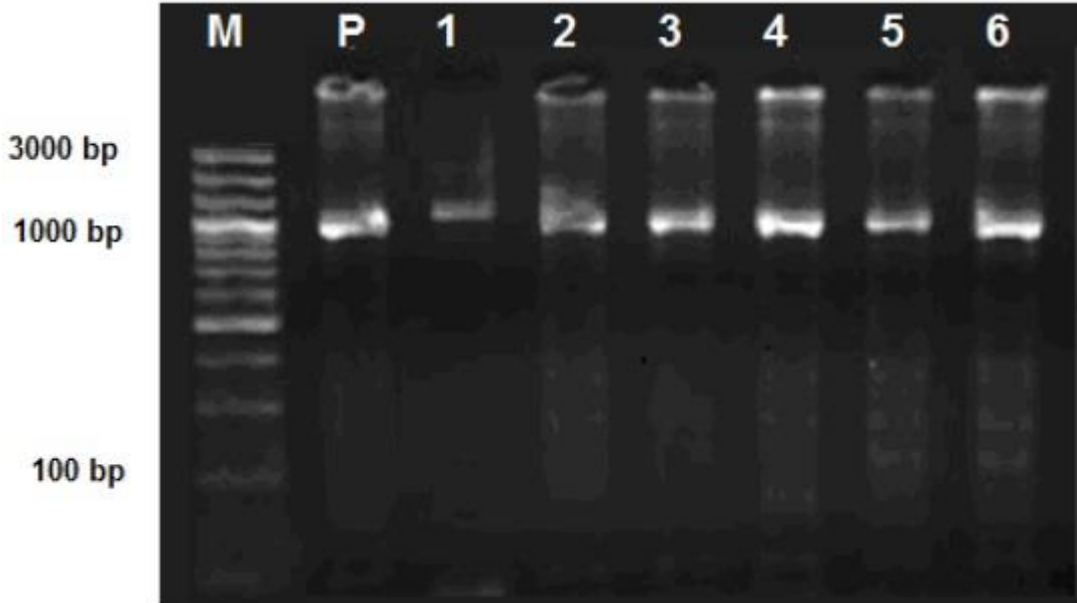
	Fertil kist sayısı (%)	Steril kist sayısı (%)	Toplam
İnsan	33 (82,5)	7 (17,5)	40
Sığır	-	17(100)	17
Koyun	80 (57,14)	60 (42,85)	140
Toplam	113 (57,36)	84 (42,63)	197



**Şekil 16:** Protoskoleks

### ITS-1 PCR Bulguları

Çalışmaya alınan bu 60 örneğin 13'ü insanlardan, 47'si koyunlardan alınmıştır. İnsanlardan alınan 13 örneğin 10 tanesi parafin bloklarda saklanmış kist örneği, 3 tanesi germinal membran örneği olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada 40 örneğin protoskoleks ve germinal membranlardan izole edilen DNA'ların BD1 ve 4S primerleriyle PCR amplifikasyonuna tabi tutulmaları sonucunda bütün örneklerde aynı bandlar elde edilmiştir.

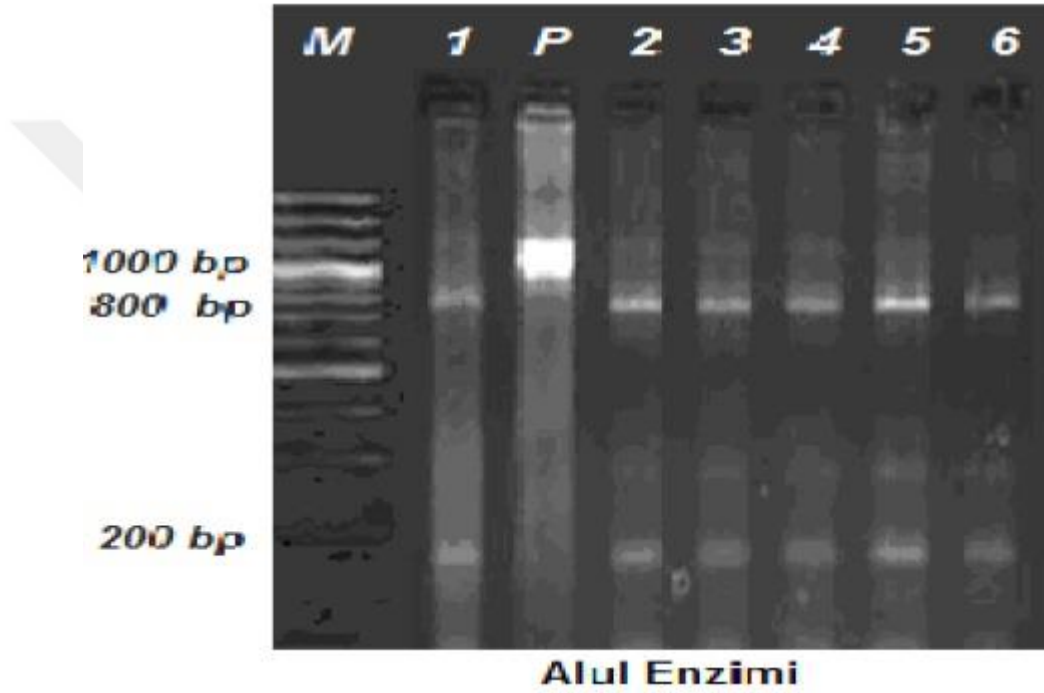


**Şekil 17:** Echinococcus granulosus'un koyun ve insanda elde edilen DNA ürünlerinin ITS-1 bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonucunda oluşan bandların görünümü:

**M:** Deoksiribonükleik asit boyut markırı (100 bp); **P:** pozitif kontrol **1,2,3:** Koyun izolatu; **4,5,6:** insan izolatu

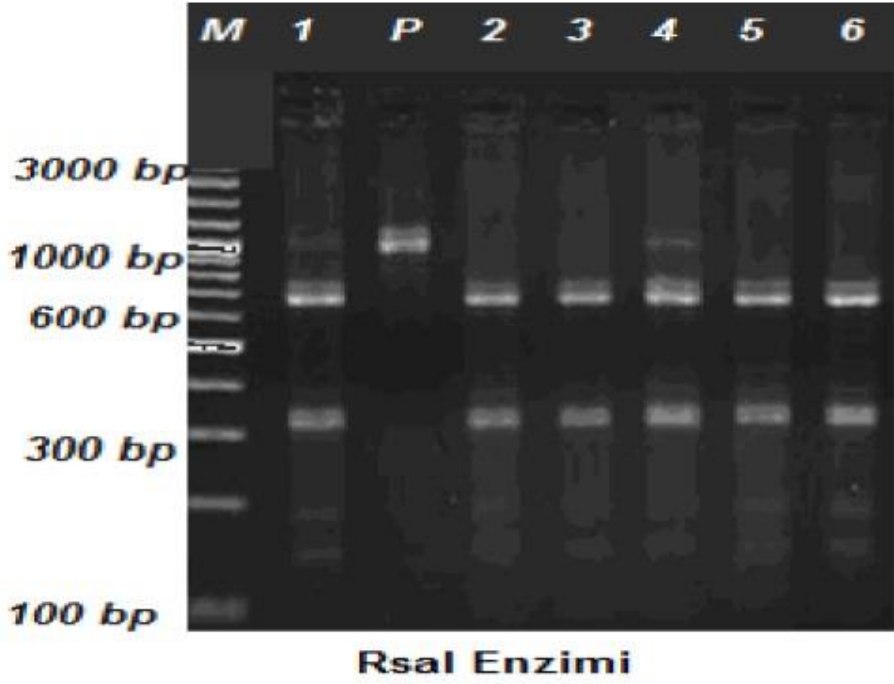
### ITS-1 RFLP Bulguları

Şekil 17'de özetlenen ITS-1 pozitif PCR ürünlerinin *AluI*, *RsaI* ve *TaqI* enzimleri ile kesim işlemi sonucu da Şekil 18, 19, 20 'de görülen band profilleri elde edilmiştir. Adı geçen üç enzim ile de kesimi yapılan bütün örneklerde aynı band profili elde edilmiştir, bu band profillerinin pozitif kontrol ( Koyun suşu-G1) ile kıyaslandığında hepsinin aynı olduğu ve sonuç olarak çalışmaya alınan örneklerin koyun suşu (G-1) olduğu belirlenmiştir.



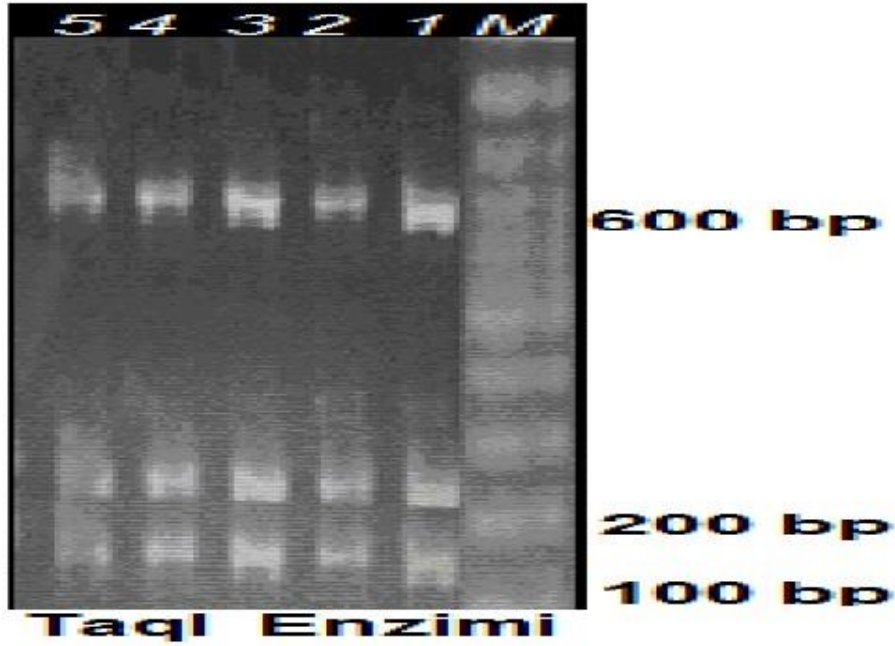
**Şekil 18:** *AluI* ile kesimi yapılan ITS-1 PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jel görüntüsü.

**M:** Deoksiribonükleik asit boyut markırı (100 bp); **P:** PCR ürünü var restriksiyon enzimi yok **1, 2, 3:** Koyun izolatu; **4,5,6:** insan izolatu



**Şekil 19:** RsaI ile kesimi yapılan ITS-1 PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jel görüntüsü.

**M:** Deoksiribonükleik asit boyut markırı (100 bp); **P:** PCR ürünü var restriksiyon enzimi yok **1, 2, 3:** Koyun izolatu; **4,5,6:** insan izolatu



**Şekil 20:** TaqI ile kesimi yapılan ITS-1 PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jel görüntüsü.

**M:** Deoksiribonükleik asit boyut markırı (100 bp); **1,2,3:** Koyun izolatu; **4,5:** insan izolatu

## 5. TARTIŞMA

Hidatidoz insan ve hayvan sağlığının yanı sıra, sebep olduğu ekonomik kayıplar sebebiyle de dđnyanın birçok bölgesinde ve dđlkemizde önemini koruyan zoonoz bir hastalıktır. *Echinococcus* cinsinin dört türü bulunmakta olup bunlardan *E.granulosus* türü içinde de önemli suş varyasyonları bulunmaktadır. Her bir türün kesin konağı bir etçil iken ara konak birçok memeli türünden biri olabilir. Parazitin larval döneminin neden olduğu KE ara konaklarda patojenik ve ekonomik açıdan oldukça önemlidir. Bazı türler sınırlı coğrafik dağılıma sahip olsa da *Echinococcus* cinsi tüm dđnyada bulunur.

Türkiye'de Doğu Anadolu, iç Anadolu ve Marmara bölgelerinde daha sık izlenmektedir. Klinik olarak yerleştii organda basıya bağlı semptomlar gelişebileceği gibi bazı vakalarda rüptür, alerjik reaksiyonlar ve enfeksiyon gelişimi de görülebilmektedir. *Echinococcus granulosus* içerisindeki suşların tanımlanması ve gruplandırılmasında en çok PCR tabanlı yöntemler kullanılmaktadır. PCR, RFLP, PCR-RFLP, RAPD-PCR, SSCP, dideoxy fingerprinting (ddF) ve DNA baz dizi analizi gerek parazitlerin genom araştırmalarında, gerekse tanıya yönelik moleküler çalışmalarda kullanılan temel tekniklerdir (62,68,69).

Tek bir nükleik asidi bile gösterebilecek kadar güçlü birçoğaltma tekniği olan PCR bugün en yaygın kullanılan yöntemidir. DNA dizi analizleri ya da sekanslama ise herhangi bir DNA parçasında bulunan A,G,T,C nükleotid sıralarının belirlenmesi olarak tanımlanabilmektedir (70,71,72 ). Yapılan son moleküler çalışmalar neticesinde *E.granulosus* cinsi içerisinde bugüne kadar 10 suş (G1 -G10) tanımlanmıştır. Moleküler çalışmalar neticesinde *Echinococcus* cinsindeki türler ve bunların suşları ile ilgili olarak elde edilen son veriler şöyle özetlenebilir.

1- *E.granulosus* türü içerisinde çok sayıda suş bulunmaktadır.

Bunlar;

a- Koyun suşu (G1),

b- Tazmanya koyun suşu (G2),

c- Bufalo suşu (G3),

d- At suşu (G4),

e- Sığır suşu (G5),

f- Deve suşu (G6),

g- Domuz suşu (G7),

h- Geyik Suşu (G8),

ı- Vahşi yaşam suşları (Aslan suşu, lagomorph suşu),

k- Domuz suşuna çok benzeyen ancak ondan genetik olarak farklılık gösteren G9 suşu ve Fennoscandian geyik suşu (G10) (13,15,14,16).

Fakat yapılan son moleküler çalışmalarla genetik farklılıklarından dolayı *E.granulosus sensu stricto* (G1-G3), *E.equinus* (G4), *E.ortleppi* (G5) ve *E.canadensis* (G6-G10) ayrı birer tür olarak kabul edilmekte, *E.ortleppi* ve *E.canadensis* ise kardeş türler olarak tanımlanmaktadır. Yeni filogenetik çalışmalarla bu beş suşun (G5-G10) yakınlıklarından dolayı bir grup olarak ele alınması önem kazanmaktadır. Bununla birlikte *E.granulosus* 'un sınıflandırılması devamlı olarak değişiklik göstermektedir. *E.oligarthus* ve *E.vogeli* türlerine bağlı suş ise bulunmamaktadır (14,15,16,45,86,46,47).

Hidatik kistlerde fertilité *E. granulosus* döngüsünün stabilitesini etkileyen önemli bir faktördür. Kistler; coğrafik durum, enfekte konağın cinsi, kistlerin yeri, boyutu ve tipine göre farklı fertilité oranlarına sahip olabilirler (99). Duyarlı ara konakların çok olduğu endemik bölgelerde parazitin fertil kist üretmesi ya o bölgede bulunan suşun geniş bir konak dağılımına sahip olduğunu ya da o bölgede birden fazla suşun bulunduğunu gösterir (42).

*E. granulosus*'un en önemli ve yaygın ara konağı evcil koyunlardır. *E. granulosus*'un koyun suşu (G1) dünya çapında geniş bir dağılıma sahiptir.



Şimdiye kadar insanlardan elde edilen *E. granulosus* materyalinin çoğu, moleküler yöntemler kullanılarak koyun suşu (G1) olarak belirlenmiştir (13,87).

Polimeraz zincir reaksiyonu - restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi yöntemi nükleer genomik rDNA- ITS1 bölgesinin boyu ve dizisini kullanarak *Echinococcus* izolatlarının kolay ve hızlı bir şekilde ayırt edilmesine olanak verir. Ribozomal RNA (rRNA) genleri; yüksek oranda korunmuş kodlanan bölgeler ile bu bölgeler arasında nispeten zayıf olarak korunmuş kodlanmayan aralık bölgelerinin bulunduğu rDNA üniteleri içinde organize olmuşlardır.

Hidatik kistlerde fertilité *E. granulosus* döngüsünün stabilitesini etkileyen önemli bir faktördür. Kistler; coğrafik durum, enfekte konağın cinsi, kistlerin yeri, boyutu ve tipine göre farklı fertilité oranlarına sahip olabilirler (74).

Duyarlı ara konakların çok olduğu endemik bölgelerde parazitin fertil kist üretmesi ya o bölgede bulunan suşun geniş bir konak dağılımına sahip olduğunu ya da o bölgede birden fazla suşun bulunduğunu gösterir (42).

Dinkel ve ark. (73). Dünyanın değişik coğrafik bölgelerinde *Echinococcus* suşlarının PCR-RFLP ve DNA dizi analizi ile belirlenmesine yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır.

PCR tekniğini diğer araştırmacılarından farklı olarak tiplendirme amacıyla kullanmışlardır. Yaptıkları çalışmada; *Echinococcus granulosus*'un G1, G5, G6/G7 suşları için spesifik ve duyarlı PCR/ semi nested PCR sistemi uygulamışlardır. G1 suşunun ve G5/G6/G7 suşlarının tanısında klasik PCR yöntemini kullanmışlardır. *E. ortleppi* (G5) ile G6/G7 suşlarının ayırımında ise semi-nested PCR sistemi kullanmışlardır. *E. multilocularis*, *E. equinus*, *E. ortleppi* ve *E. granulosus*'un G1, G6 ve G7 suşlarını da dahil olduğu 16 türün izolatlarının değerlendirildiği bu çalışmada PCR analizinin spesifitesi %100 olarak bulunmuştur. Bu PCR analizi yaklaşımı ile elde edilen sonuçlar ile ilk defa Batı Afrikada insanda deve suşu enfeksiyonu ortaya konulmuştur. Ayrıca Kenya ve Sudan'da çiftlik hayvanlarında *E. ortleppi* (G5) suşu belirlenmiştir.

Polonya'da domuzlardan elde edilen kist hidatid materyalleri incelendiğinde, bunların at, koyun, sığır ve deve izolatlarından sadece moleküler olarak değil, morfolojik ve biyolojik olarak da ayrılabilirdiği gösterilmiştir (58).

İran'da insan ve hayvanlardan toplanan izolatların tiplendirilmesinde hem morfolojik hem de moleküler (*ITS1* PCR-RFLP) teknikler kullanılmış, koyun ve deve suşlarının sadece çengel morfolojileri ile de birbirinden ayrılabilirdiğini belirtmiştir (75). Tunus'ta develerden elde edilen kist hidatidler morfolojik ve moleküler olarak incelenmiş daha sonra *cox1* gen bölgesinin dizi analizi ile tüm izolatların G1 suşu olduğu tespit edilmiştir (76). İnsan, koyun ve deve izolatlarından elde edilen protoskolekslerin rostellar kanca morfolojileri ve ribozomal *ITS1* gen bölgesinin PCR-RFLP analizi ile koyun ve insan izolatlarının benzer, deve izolatlarının ise farklı olduğu görülmüştür (77). Libya'da ise insan, koyun, sığır ve develerden elde edilen parazitlerin çengel morfolojileri incelenmiş, koyun ve sığır izolatları benzer bulunurken, bunların deve ve insan izolatlarından farklı olduğu bildirilmiş, bunun üzerine aynı izolatların *cox1* gen bölgeleri DNA dizi analizi ile incelendiğinde hepsinin G1 suşu olduğu anlaşılmıştır (78).

Vural ve ark.(53) yapmış olduğu çalışmada Afyon, Ardahan, Erzurum, Siirt, Tekirdağ, Yozgat ve Kars illerinden toplanan 100 koyun ve 12 sığırdan elde edilen *E. granulosus* izolatlarının CO1 gen bölgesinin dizi analizi sonucunda örneklerin 107'si G1, 5'i G3 olarak belirlenmiştir. Şimsek ve Eroksüz (79). Anadolu yaban koyununda (*Ovis gmelinii anatolica*) kist materyalinin moleküler yapısını belirlemek amacıyla mitokondriyal CO1 gen bölgesini çoğaltmışlar ve dizi analizi yapmışlar, G1 suşu olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışma Anadolu yaban koyununda *E. granulosus*'un varlığı ve moleküler karakterizasyonu için ilk rapordur. Snabel ve ark. (51) tarafından; İzmir, Manisa, Denizli ve Uşak illerinden, 12 koyun ve 10 insan izolatının çeşitli gen bölgelerinin (*cox1* uzun ve kısa fragmentler, *atp6*, *nad1*, *rnrS*) dizi analizi yapılmıştır. Bu çalışmada 2 koyun izolatı ile 1 insan izolatının G7, 1 koyun izolatının G3, bir koyun izolatının G1 ve G3 referans dizileri arasında ara diziye sahip olduğu, diğer izolatların G1 suşu olduğunu belirlemişlerdi. Böylelikle Türkiye'de ilk kez G7 suşu rapor edilmiştir. İran'ın Tebriz bölgesinde kesimhanelerden toplanan koyun ve sığır hidatik kistleri ile hastanelerden elde edilen insan izolatlarının ITS1 fragmentleri *RsaI* ve *HpaII* enzimleri ile kesime uğratılmıştır.

Tüm izolatlarda benzer olarak, RsaI ile kesim sonucunda yaklaşık 600 bp ve 300 bp uzunluğunda iki bant; HpaII ile kesim sonucunda yaklaşık 600 bp ve 200 bp uzunluğunda bantlar elde edilmiştir. İzolatların tamamının *E. granulosus*'un o bölgede baskın genotipi olan koyun suşu olabileceği belirtilmiştir (81).

Shartbatkhorı ve ark. (82) İran'da koyun, keçi, sığır ve develerden elde ettikleri 112 *E. granulosus* izolatını AluI enzimini kullanarak PCR-RFLP yöntemi ile incelemişler; 106 izolatı G1, 6 izolatı G6 olarak belirlemişlerdi. İran'da yapılan başka bir çalışmada; insan, koyun ve develerden elde edilen *E. granulosus* izolatlarının ITS1 bölgesinin AluI, HpaII, RsaI ve TaqI enzimleri ile kesimi sonucunda, insan ve koyun kökenli izolatlar ile deve kökenli izolatların farklı RFLP paternleri sergiledikleri gözlenmiştir (77).

Tunus'ta *E. granulosus*'un moleküler epidemiyolojisi hakkında bilgi sağlamak için yapılan ilk çalışmada ITS1 PCR-RFLP ve *cox1* sekans analizi yapılmış, develerde G6; insan, koyun ve sığırdaki ise G1 suşu tespit edilmiştir (83).

Bowles ve ark. (85). Hollanda'dan insan kökenli bir *E. granulosus* izolatında rDNA-ITS-1 bölgesinin PCR-RFLP paternlerini incelemişler ve mitokondriyal CO1 ve ND1 bölgelerinin dizi analizini yaparak bu izolatın sığır suşu olduğunu tespit etmişlerdir. Bu suşun CO1 için % 8.7 ve ND1 için %13.8 oranında koyun suşu dizisinden farklı olduğunu belirtmişlerdir. İtalyanın Sardinya bölgesinde toplanan 91 adet koyun, sığır ve domuz izolatı PCR-RFLP ve DNA dizileme teknikleri ile incelenmiş ve 89 izolatın G1 suşu, 2 adet domuz izolatının ise G7 suşuna ait olduğu belirlenmiştir (93).

Villalobos ve ark.(88) BD1 ve 4S primerlerini kullanarak ribozomal ITS-1 bölgesini çoğaltmış ve G7 genotipi için bu bölgenin 1,0 ve 1,1 kb büyüklüğünde bant verdiğini belirlemişlerdi. Aynı araştırmacılar G1 genotipi için ise 0,9 ve 1,0 kb büyüklüğünde bantlar elde ettiklerini ve sadece ITS-1 bölgesinin bu şekilde çoğaltması ile genotiplendirme yapacağını ve G1 ve G7 suşlarının ayrımının yapılabileceğini ifade etmiştir. Yine Snabel ve ark: (89) BD1 ve 4S primerlerini kullanarak ribozomal ITS-1 bölgesini çoğaltmış ve G7 genotipi için bu bölgenin 1,0 ve 1,1 kb büyüklüğünde bant verdiğini belirlemişlerdi.

Bowles ve McManus (50) yaptıkları çalışmada Türkiye'de 50 koyun ve 10 sığırdan elde edilen protoskolekslerin rostellar çengel morfolojileri incelenmiş ve bunların birbirlerine çok benzer olduğu görülmüştür (49, 84).

Son zamanlarda yapılan izoenzim ve moleküler çalışmalar, insan enfeksiyonlarının çoğunun kaynağının evcil koyun suşu olduğunu göstermiş ve Türkiye'de etkin suşun G1 olduğu; koyun, keçi, sığır, deve, köpek gibi birçok konaktan alınan izolatların incelenmesiyle ortaya konmuştur (50,49,53).

Ribozomal ITS-1 bölgesinin PCR-RFLP analizinde Restriksiyon enzimi olarak farklı çalışmalarda değişik enzimler kullanılmıştır (90).

Cfol, MspI, AluI ; Bowles ve McManus (50) Cfol, RsaI, MspI, AluI ve TaqI; M'rad ve ark (83) Cfol, HpaI ;McManus ve ark (91) HhaI, RsaI, MspI, AluI ve TaqI; Harandi ve ark (75) HhaI, RsaI, MspI, AluI; Maravilla ve ark (92) HhaI, RsaI, AluI ve TaqI; Ahmadi ve ark (77) adlı enzimleri kullanmışlardır.

Bowles ve McManus (49) çeşitli ülkelerden topladıkları *E. Granulosus* izolatlarını *AluI*, *RsaI*, *MspI*, *CfoI* ve *TaqI* restriksiyon enzimlerini kullanarak rRNA-ITS1 bölgesini PCR-RFLP yöntemi ile incelemişler, Türkiye'den iki izolatu da koyun suşu olarak belirlemişlerdir. Ütük ve ark. (52) yaptığı Elazığ, Malatya, Erzurum, Van, Diyarbakır ve Şanlıurfa illerinden toplanan 179 koyun, 19 sığır, 7 keçi, 1 deve, 1 köpek ve 1 insan izolatu içeren bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada sığır, koyun ve keçi izolatları Cfol, MspI, RsaI ve AluI restriksiyon enzimlerinin kullanıldığı PCR-RFLP yöntemleri ile incelenmiş, tüm izolatlar benzer paternleri sergilemiştir. Rastgele seçilen 6 sığır, 4 koyun, 4 keçi ve 1 deve, 1 köpek, 1 insan izolatu'nun mitokondriyal CO1 gen bölgesinin dizi analizi sonucunda 17 izolat da *E.granulosus*'un G1 suşu olarak tanımlanmıştır.

Türkiye'den gönderilen koyun izolatlarının *cox1* gen bölgesini DNA dizi analizi ile incelemişler ve bunların G1 suşu olduğunu belirtmişlerdir. Yine Türkiye'den yurtdışına gönderilen 2 koyuna ait hidatid kist izolatlarının *ITS-1* gen bölgesi PCR-RFLP yöntemi ile incelenmiş ve bunların da G1 suşu oldukları tespit edilmiştir (50).

Türkiye'de yapılan bir başka çalışmada ülkenin farklı bölgelerinden koyun ve sığırlardan elde edilen kistlerin *cox1* gen bölgesinin dizi analizi yapılmıştır. 100 koyundan 98'inde G1, 2'sinde G3 suşuna rastlanırken, 12 sığırdan ise 9'undan G1, 3'ünde ise G3 suşu tespit edilmiştir (53). Ülkemizin batı bölgesinden elde edilen 12 koyun ve 10 insan izolatu üzerine *E.granulosus* suşları içerisindeki ayrımı tanımlayabilmek için *ITS-1* gen bölgesine *Msp1*, *Rsa1*, *Cfo1*, *Alu1* ve *Taq1* enzimlerini kullanarak PCR-RFLP yöntemini uygulamışlardır. Malatya'da bir Anadolu yaban koyununun karaciğerinden elde edilen izolatu *cox1* gen bölgesinin sekanslanması sonucu G1 suşu olduğu tespit edilmiştir(79). Türkiye'de sığır, koyun, keçi, deve, köpek ve insandan alınan izolatların *ITS-1* gen bölgesi *Cfo1*, *Alu1*, *Rsa1*, *Msp1* enzimleri ile PCR-RFLP, *cox1* gen bölgesi de DNA dizi analizi yöntemiyle incelenmiş ve tüm konaklarda G1 suşu tespit edilmiştir (52). Ergin ve ark (80) 46 hastadan elde ettikleri *E. granulosus* izolatu'nun mitokondriyal CO1 gen bölgesinin dizi analizi sonucunda örneklerin tamamının G1 genotipinde olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda 13 insan ve 47 koyun izolatu'nun rDNA ITS-1 gen bölgesi bu çalışmada da restriksiyon enzimi olarak genelde birçok çalışmada kullanılan *Rsa1*, *Alu1* ve *Taq1* adlı enzimleri kullanılarak PCR-RFLP yöntemi ile incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda kullanılan G1 kontrol suşu ile aynı olduğu anlaşıldı.

Çalışmamızın sonuçlarının Türkiye'de *E. granulosus*'un evcil koyun suşunun baskın genotip olduğunu belirten çalışmalar (51,52,53,80) ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızın diğer çalışmalar gibi (16,50,75,83,85,100,101 ) *E. granulosus* genotiplerini ayırabildiği gözlemlendi. *Echinococcus* suşları arasındaki gelişimsel farklılıklar KE'nin kontrol çalışmalarını etkilemektedir. Özellikle bazı suşlarda yumurta üretim süresindeki değişkenlikler (G1 genotipinin köpeklerdeki prepatent periyodu yaklaşık 45 gün iken G7 suşu için bu süre ortalama 34 gündür) nedeniyle genotiplerin saptanması kontrol programlarında önem kazanmaktadır( 39,42,102 ). Verilerimizin ülkemizde KE'nin kontrol çalışmalarına destek olacağına inanıyoruz.

Sonuç olarak; yapılan bu çalışmada *E. granulosus*'un çeşitli ara konaklarından elde edilen hidatik kist materyali PCR-RFLP ile incelenerek Şanlıurfa ilimizin genotip çeşitliliği araştırılmıştır. Araştırma sonucunda Şanlıurfa ilimizin yaygın genotipin evcil koyun suşu olduğu saptanmıştır.

Bu saptama önemli bir halk sağlığı sorunu olan KE'nin kontrolü için bölgemizde alınacak önlemlerin kapsamı ve yöntemi konusunda yönlendirici bir veridir. Ülkemizde KE'nin kontrol altına alınabilmesi için; belirli aralıklarla, geniş kapsamlı olarak epidemiyolojik/moleküler çalışmaların yapılması ve eradikasyon programlarının uygulanması yerinde bir yaklaşım olacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Ammann RW, Eckert J. Cestodes echinococcus. Gastroenterol Clin North Am 1996; 25:655-89.
2. Andersen DH, Hodges RG. Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology. Am J Dis Child. 1946; 72: 62-80.
3. Kolak M, Karpati F, Monstein H-J, Jonasson J. Molecular typing of the bacterial flora in sputum of cystic fibrosis patients. Int. J. Med. Microbiol. 2003; 293, 309-17.
4. Aytaç A, Yurdakul Y, İkizler C, et al. Pulmonary hydatid disease: report of 100 patients. Ann Thorac Surg 1997; 23: 145-513.
5. Şenlik B, Diker AG. Echinococ'ların taksonomisi ve morfolojisi, In: Altıntaş N, Tınar, R Çoker A, editors, Echinococcosis. Hidatidoloji derneği, Yayın No1, izmir: Ege Üniversitesi Matbaası, 2004; 13-30.
6. Umur Ş, Aslantaş Ö. Kars belediye mezbahasında kesilen ruminantlarda hidatidozun yayılışı ve ekonomik önemi. Türkiye Parazit Derg. 1993;17(2):27-34.
7. Tiğın Y, Burgu A, Doğanay A. Hayvanlarda ekinokok türleri (*Echinococcus* sp.). Unat EK, Üner A, Özcel MA. Editörler, İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik (Echinococcosis)'de, İzmir; Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, no: 10, Ege Üniversitesi Ofset Basımevi. 1991; 129-55.
8. Ayaz E, Tınar R. Cestoda. Ed. Tınar R Helminoloji. Fen ve Biyoloji Yayınları Dizisi, Nobel Yayın No:965, 2006. 167-80.
9. Merdivenci A, Aydınlioğlu K. Hidatidoz (Hidatik kist hastalığı) İstanbul: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, 1982:1-279.
10. Sarıözkan S, Yalçın C. Estimating the production losses due to cystic echinococcosis in ruminants in Turkey. Vet Parasitol. 2009;163: 330-4.
11. Budke CM, Deplazes P, Torgerson PR. Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. Emerg Infect Dis. 2006; 12(2): 296-303.
12. Güralp N. Helminoloji. İkinci baskı, Ankara, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, 368/266. 1981; 221-39.

13. Eckert J, Thompson RCA. Intraspesifik variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans.  
*Acta Trop* 1997;64(1-2):19-34.
14. Thompson RCA, McManus DP. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol* 2002; 18(10): 4527-8.
15. Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvela-Koski V, Meri S. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 2003; 127(3): 207-15.
16. Scott JC, Stefaniak J, Pawlowski ZS, McManus DP. Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 1997;114(1):37-43.
17. Altıntaş N. *Echinococcus* sp. ve kist hidatik'in immunoloji. Unat EK, Uner A, Özcel MA. Editörler, İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik'te, İzmir; Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, no: 10, Ege Üniversitesi Ofset Basımevi. 1991; 89100.
18. Altıntaş N, Karababa AO. *Echinococcosis*de korunma ve kontrol. Altıntaş N, Tınar R, Coker A. Editorler, *Echinococcosis*'de, İzmir; Hidatidoloji Derneği Yayın no:1, Ege Üniversitesi Matbaası. 2004; 355-68.
19. Artun P. Hidatik Kist Ön Tanılı Hastalarda Igg-Elısa ve IHA Yöntemleriyle *Echinococcus*'a Özgü Igg Antikorlarının Araştırılması ve Sonuçların Western Blot Yöntemiyle Doğrulanması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2008; 66.
20. Yalav E, Ökten İ. Akciger Kist Hidatiklerini Cerrahi Tedavi Yöntemleri. A.Ü.Tıp Fakültesi,1980: 9-95.
21. Thompson RCA, McManus DP. Aetiology: parasites and life-cycles. İn: Eckert J, Gemmell MA, Meslin F.-X, Pawlowski ZS (Eds.). WHO/OIE manual on *Echinococcosis* in humans and animals: a public health problem of global concern. Paris: World organisation for animal health; 2001; 1-19.
22. Dunn AM. *Veterinary Helminthology*. Second Ed. London, William Heineman Medical Books Ltd. 1978; 119-21.



23. Dilsiz A, Açıkgözoğlu S, Günel E, et. al. Ultrasound-guided percutaneous drainage in the treatment of children with hepatic hydatid disease. *Pediatr Radiol* 1997; 27: 230-3.
24. Gottstein B *Clinical Microbiology Reviews* 1992; 5: 248-61.
25. Thatcher VE, Sousa OE, Echinococcus oligarthrus from a Panamian jaguar *J Parasitol* 1967;53: 1040-5.
26. Toparlak, M. Tüzer, E: Veteriner Helminoloji. İ.Ü. Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, 2000.
27. Ünat, E.K, Yücel, A, Atlaş, K. Samastı, M: Unat'ın Tıp Parazitolojisi (5. Baskı). Cer. Tıp Fak. Vakfı Yay no: 15, İstanbul, 1995.
28. Soulsby EJJ. Helminths, arthropods and of domesticated animals. 7th ed. London: Bailliere Tindall, 1986: 92-136.
29. Merdivenci A. Türkiye'de hidatik kist hastalığı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, 1976:9-112
30. Gottstein B, Reichen J. Echinococcosis/Hydatidosis. In: Cook GC (Ed.). *Manson's Tropical Diseases*. 20th ed. London: WB Saunders Co;1996; 1486-508
31. McGreevy PB, Nelson GS. Larval cestode infections. In: Strickland GT (Ed.). *Hunter's tropical medicine*. 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1991; 843-59.
32. King CH. Cestodes (Tapeworms). In: Mandell, Bennett, Dolin (eds.). *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6th ed. Churchill Livingstone, Elsevier. Chapter 2005; 288-9.
33. Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011; 27893-4.
34. İnsanlarda ve hayvanlarda kist hidatik (echinococcosis). Türkiye parazitoloji derneği yayını, No.10. 1991.
35. Eckert J, Gemmel MA, Matyas Z, Soulsby EJJ 1984. Guidelines for Surveillance, Prevention and Control of Echinococcosis WHO VPH/81.28.
36. Rausch RL Life-cycle Patterns and Geographic Distribution of Echinococcus species. Thomson ed. *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease*. George Allen & Unwin, London 1984; 44-70.
37. D'Alessandro A, Rausch RL, Morales G, Echinococcus vogeli in Man, with a Review of Polycystic Hydatid Disease in Columbia and Neighbouring Countries. *Am J trop Med Hyg* 1978; 28: 303-17.

38. Arman D. Paraziter Akciğer İnfeksiyonları. Solunum Sistemi İnfeksiyonları. Türk Toraks Derneği Yayınları. 2001; 283-309.
39. Thompson RCA, Biology and systematics of *Echinococcus*. In: Thompson RCA, Lymbery AJ, Editors. *Echinococcus and Hydatid Disease*, Wallingford; CAB International. 1995; 1-50.
40. Xiao N, Qiu J, Nakao M, Li T, Yang W, Chen X, Schantz PM, Craig PS, Ito A. *Echinococcus Shiquicus* n. Sp. A taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China, *Int J Parasitol*, 2005; 36: 693 - 701.
41. Zoonozların tanımı, halk sağlığı ve hayvan sağlığı açısından önemi, Zoonozlar, 2009. *Ed: Doğanay, M, Altıntaş, N. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2009; 1216-7.*
42. Thompson RCA, Lymbery AJ. The nature, extent and significance of variation within the genus *Echinococcus*. *Adv Parasitol* 1988;27 : 209-58.
43. Aletros H, Symbos PN. Hydatid disease of the lung. In: Shields TW, Lo Cicero J III, Poon RB eds. *General Thoracic Surgery*. Philadelphia: Lippincott Williams and Williams; 2000;1113-22.
44. Thompson RCA, Lymbery AJ. *Echinococcus*: biology and strain variation. *Int J Parasitol*. 1990;20(4): 457-70.
45. Lavikainen A, Lehtinen MJ, Laaksonen S, Agren E, Oksanen A, Meri S. Molecular characterization of *Echinococcus* isolates of cervid origin from Finland and Sweden. *Parasitology* 2006; 133(5): 565-70.
46. Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS, Ito A. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* 2007;134(5):713.
47. Moks E, Jogisalu I, Valdmann H, Sarma U. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5G10. *Parasitology*. 2008;135:647-654.
48. Bowles J, McManus DP. Molecular variation in *Echinococcus*. *Acta Trop* 1993; 53(3-4): 291-305
49. Bowles J, Blair D, McManus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasit*. 1992; 54: 165-174.

50. Bowles J, McManus DP. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. *Mol Biochem Parasit.* 1993;57: 231-40.
51. Snabel V, Altintas N, D'Amelio S, Nakao M, Romig T, Yolasigmaz A, Gunes K, Turk M, Busi M, Hüttner M, Sevcova D, Ito A, Altintas N, Dubinsky P. Cystic echinococcosis in Turkey: genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country. *Parasitol Res.* 2009;105(1):145-54.
52. Ütük AE. *Echinococcus granulosus*'un Doğu ve Güney Doğu Anadolu Bölgesi izolatlarının moleküler ayrımı. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Elazığ, 2008
53. Vural G, Baca AU, Gauci CG, Bağcı O, Gıcık Y, Lightowlers MW. Variability in the *Echinococcus granulosus* Cytochrome C oxidase 1 mitochondrial gene sequence from live stock in Turkey and a re-appraisal of the G1 -3 genotype cluster. *Vet Parasitol.* 2008;154:347-50.
54. Kumaratilake LM, Thompson RCA, Dunsmore JD. Comparative strobilar development of *Echinococcus granulosus* of sheep origin from different geographical areas of Australia *in vivo* and *in vitro*. *Int J Parasitol.* 1983;13 : 151-6.
55. Thompson RCA, Kumaratilake LM, Eckert J. Observations on *Echinococcus granulosus* of cattle origin in Switzerland. *Int J Parasitol.* 1984;14(3):283-91.
56. Gill US, Rao BV. On the biology and morphology of *E. granulosus* (Batsch, 1786) of buffalo-dog origin. *Parasitology.* 1967;57 : 695-704.
57. Pednekar RP, Gatne ML, Thompson RCA, Traub RJ. Molecular and morphological characterisation of *Echinococcus* from food producing animals in India. *Vet Parasitol.* 2009; 165: 58-65.
58. Eckert J, Thompson RCA, Lymbery AJ, Pawlowski ZS, Gottstein B, Morgan UM. Further evidence for the occurrence of a distinct strain of *Echinococcus granulosus* in European pigs. *Parasitol Res.* 1993;79(1):42-48.
59. Pawlowski ZS. Critical Points in the Clinical Management of Cystic Echinococcosis. *Compendium on Cystic Echinococcosis.* Anderson FL, CHAI J, LIU F (eds). Brigham Young University Print services, USA, 1993; 119-31.

60. Craig PS, Bailoy W, BAILOY W, Nelson GS. A Specific Test for the Identification of Cystic Fluid Samples from Suspected Human Hydatid Infection. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1986; 80: 256-7.
61. Eckert J. Guidelines for Treatment of Cystic and Alveolar Echinococcosis in Humans. *Bull WHO* 1996; 74: 3, 331-42.
62. Hokelek M, Arıkoğlu H. Echinococcus türlerinin biyokimyasal, fizyolojik özellikleri ve moleküler biyolojisi. Altıntaş N, Tınar R, Coker A. Editorler, Echinococcosis'de, İzmir; Hidatidoloji Derneği Yayın no:1, Ege Üniversitesi Matbaası. 2004; 87-106.
63. Arda M. Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler). Kükem Derneği Bilimsel Yayınları. No: 2 İkinci baskı. Ankara, 1994.
64. Arda M. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın serisi:45, İkinci baskı. Ankara, 2000.
65. Şimşek S, Köroğlu E, Dumanlı E, Aktaş M, Şaki CE, Altay K, Ütük AE. Seroprevalence of cattle hydatidosis in some districts in the East Anatolian Region of Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2005;29: 1305-10.
66. Gonzalez LM, Daniel-Mwambete K, Montero E, Rosenzvit MC, McManus DP, Garate T, Cuesta-Bandera C. Further molecular discrimination of Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Exp Parasitol*. 2002; 102 : 46-56.
67. Zarlenga DS, Higgins J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Vet Parasitol*. 2001;101:215-30.
68. Gasser RB, Zhu XQ, McManus DP. Dideoxy fingerprinting: application to the genotyping of *Echinococcus*. *Int J Parasitol*. 1998; 28: 1775-9.
69. Yolasığmaz A, Altıntaş N. Echinococcosisde genetik farklılaşmalar. Altıntaş N, Tınar R, Coker A. Editorler, Echinococcosis'de, İzmir; Hidatidoloji Derneği Yayın no:1, Ege Üniversitesi Matbaası. 2004; 45-54.97.
70. Gasser RB, Zhu X, McManus DP. Display of sequence variation in PCR-amplified mitochondrial DNA regions of *Echinococcus* by single-strand conformation polymorphism. *Acta Trop*. 1998b;71: 107-15.

71. Yumurtacı A. DNA dizi analizi. Floresan Temelli Yeni Nesil Genetik Analiz Uygulamaları: DNA Dizi Analizi, Moleküler Markör Uygulamaları ve Çoklu Gen Anlatım Analizleri Uygulamalı Eğitimi Kitabı'nda. TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Yayını, Gebze-Kocaeli. 2009; 62-6.
72. Gasser RB. Mutation scanning methods for the analysis of parasite genes. Int J Parasitol. 1997;27 12: 1449-63.
73. Dinkel A, Nickisch-Rosenegk M, Bilger B, Merli M, Lucius R, Romig T. Detection of *Echinococcus multilocularis* in definitive host: Coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. J Clin Microbiol 1998; 36: 1871-6.
74. Dalimi A, Motamedi G, Hosseini M, Mohammadian B, Malaki H, Ghamari Z et al. Echinococcosis/hydatidosis in western Iran. Vet Parasitol 2002;105(2):161-71
75. Harandi MF, Hobbs RP, Adams PJ, Mobedi I, Morgan-Ryan UM, Thompson RCA. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Iran. Parasitology. 2002;125:367-73.
76. Lahmar S, Debbek H, Zhang LH, McManus DP, Souissi A, Chelly S, Torgerson PR. Transmission dynamics of the *Echinococcus granulosus* sheep-dog strain (G1 genotype) in camels in Tunisia. Vet Parasitol. 2004;121:151-6.
77. Ahmadi N, Dalimi A. Characterization of *Echinococcus granulosus* isolates from human, sheep and camel in Iran. Infect Genet Evol. 2006;6 : 85-90.
78. Tashani OA, Zhang LH, Boufana B, Jegi A, McManus DP. Epidemiology and strain characteristics of *Echinococcus granulosus* in the Benghazi area of eastern Libya. Ann Trop Med Parasit. 2002;96(4):369-81.
79. Simsek S, Eroksuz Y. Occurrence and molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in Turkish mouflon (*Ovis gmelinii anatolica*). Acta Trop 2009;109(2):1679-80.
80. Ergin S, Saribas S, Yuksel P, Zengin K, Midilli K, Adas G et al. Genotypic characterisation of *Echinococcus granulosus* isolated from human in Turkey. Afr J Microbiol Res 2010;4(7): 551-5.
81. Jamali R, Ghazanchaei A, Asgharzadeh M. Identification and characterization of *Echinococcus granulosus* by PCR-RFLP technique in Tabriz district. Dist J Parasitic Dis 2004;28:69-72.

82. Sharbatkhori M, Mirhendi H, Harandi MF, Rezaeian M, Mohebali M, Eshraghian M et al. *Echinococcus granulosus* genotypes in livestock in Iran indicating high frequency of G1 genotype in camels. *Exp Parasitol* 2010;124(4):373-9.
83. M'rad S, Filisetti D, Oudni M, Mekki M, Belguith M, Nouri M, Sayadi T, Lahmar S, Candolfi E, Azaiez R, Mezhoud H, Babba H. Molecular evidence of ovine (G1) and camel (G6) strains of *Echinococcus granulosus* in Tunisia and putative role of cattle in human contamination. *Vet Parasitol.* 2005;129:267-72.
84. Yıldız K, Gürcan IS. The detection of *Echinococcus granulosus* strains using larval rostellar hook morphometry. *Türkiye Parazitol Derg.* 2009;33(2):199-202.
85. Bowles J, Knapen FV, McManus D. Cattle strain of *Echinococcus granulosus* and human infection. *The Lancet* 1992;339(8805):1358-9.
86. Naidich A, McManus DP, Canova SG, Gutierrez AM, Zhang W, Guarnera EA, Rosenzvit MC. Patent and pre-patent detection of *Echinococcus granulosus* genotypes in the definitive host. *Mol Cell Probe.* 2006; 20: 5-10.
87. Thompson RCA, Lymbery AJ. The nature, extent and significance of variation within the genus *Echinococcus*. *Adv Parasitol* 1988;27: 209-58.
88. Villalobos N, Gonzalez LM, Morales J, de Aluja AS, Jimenez MI, Blanco MA, Harrison LJS, Parkhouse RME, Garate T. Molecular identification of *Echinococcus granulosus* genotypes (G1 and G7) isolated from pigs in Mexico. *Vet Parasitol.* 2007;147:185-9.
89. Snabel V, D'Amelio S, Mathiopoulos K, Turcekova L, Dubinsky P. Molecular evidence for the presence of a G7 genotype of *Echinococcus granulosus* in Slovakia. *J Helminthol* 2000 74(2): 177-81.
90. Bowles J, Van Knapen F, McManus DP. Cattle strain of *Echinococcus granulosus* and human infection. *Lancet*, 1992 ; 39:1358.
91. McManus DP, Ding Z, Bowles J. A molecular genetic survey indicates the presence of a single, homogeneous strain of *Echinococcus granulosus* in north-west China. *Acta Trop.* 1994; 56: 7-14.

- 92.** Maravilla P, Thompson RCA, Palacios-Ruiz JA, Estcourt A, Ramirez-Solis E, Mondragon-de-la-Pena C, Moreno-Moller M, Cardenas-Mejia A, Mata-Miranda P, Aguirre-Alcantara M, Rodriguez CB, Flisser A. *Echinococcus granulosus* cattle strain identification in an autochthonous case of cystic echinococcosis in central Mexico. *Acta Trop.* 2004; 92: 231-236.
- 93.** Varcasia A, Canu S, Lightowers MW, Scala A, Garippa G. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* strains in Sardinia. *Parasitol Res* 2006; 98(3): 273-7.
- 94.** Vidinel İ. Akciğerin paraziter hastalıkları. A.Vidinel (ed). Akciğer Hastalıkları (3.baskı) İzmir, E.Ü. Matbaası, 1981: 203-204.
- 95.** Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of Echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev* 2004;17(1):107-35.
- 96.** Yazar S, Taylan Özkan A, Hökelek M, Polat E, Yılmaz H, Özbilge H et al. Türkiye'de 2000-2005 yılları arasında kistik ekinokokkozis. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2008;32(3):208-20.
- 97.** McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. Echinococcosis. *Lancet* 2003;362(9392):1295-304.
- 98.** Alkan Z, Özbel Y, Özensoy S, Atambay M. Moleküler biyolojik yöntemler. Özcel MA, Altıntaş N. Editörler, Parazit Hastalıklarında Tanı'da, İzmir; Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, no:15, Ege Üniversitesi Basımevi. 1997; 373-411.
- 99.** Dalimi A, Motamedi G, Hosseini M, Mohammadian B, Malaki H, Ghamari Z et al. Echinococcosis/hydatidosis in western Iran. *Vet Parasitol* 2002;105(2):161-71.
- 100.** Wachira TM, Bowles J, Zeyhle E, McManus DP. Molecular examination of the sympatry and distribution of sheep and camel strains of *Echinococcus granulosus* in Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48(4):473-79.
- 101.** Sharbatkhori M, Mirhendi H, Harandi MF, Rezaeian M, Mohebbali M, Shraghian M et al. *Echinococcus granulosus* genotypes in livestock in Iran indicating high frequency of G1 genotype in camels. *Exp Parasitol* 2010;124(4):373-9.
- 102.** Zhang L, Eslami A, Hosseini SH, McManus DP. Indication of the presence of two distinct strains of *Echinococcus granulosus* in Iran by mitochondrial DNA markers. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59(1):171-4.

- 103.** McManus DP, Bryant C. Biochemistry, Physiology and Molecular Biology of Echinococcus. Thompson RCA, Lymbery AJ, Editors. Echinococcus and Hydatid Disease. CAB International. UK 1995; 135-181.
- 104.** Yağcı A. Restriction Fragment Length Polymorphism ve Polimeraz Zincir Reaksiyon Bazlı Tiplendirme Yöntemleri. Durmaz R, Editor. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, 2.baskı, İnönü Üniv. Tıp Fak. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Malatya, 2001; 149-160.
- 105.** Xue HC, Qiu LS, Zhu CW. RFLP analysis of DNA from Echinococcus granulosus collected from four provinces/autonomous region in China. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi 1993; 11(3): 201-203.
- 106.** Bowles J, Blair D, McManus DP. Molecular genetic characterization of The cervid strain (" northern form") of Echinococcus granulosus. Parasitology 1994; 109(2): 215-221.
- 107.** Theophilus BDM. Principles and medical applications of the polymerase chain reaction. In: Walker JM , Rapley R, editors. Medical Biomethods Handbook. Totowa; Humana Press. 2005; 63-72.
- 108.** Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 1990;18(22):6531-5.
- 109.** Scott JC, McManus DP. The random amplification of polymorphic DNA can discriminate species and strains of *Echinococcus*. Trop Med Parasitol 1994;45(1):1-4.
- 110.** Turcekova L, Snabel V, D'Amelio S, Busi M, Dubinsky P. Morphological and genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in the Slovak Republic. Acta Trop 2003;85(2):223-9.
- 111.** 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.
- 112.** Leung KH, Yip SP. Single strand conformation polymorphism. In: Walker JM, Rapley R (Eds.). Molecular biomethods handbook. 2 ed. New Jersey: Humana Pres; 2008.p.117-31.



- 113.** Sarkar G, Yoon HS, Sommer SS. Dideoxy fingerprinting(ddF): A rapid and efficient screen for the presence of mutations. *Genomics* 1992;13(2):441-3.
- 114.** Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. İnsan moleküler genetiği için araçlar (çeviri: E. Yılmaz). Thompson and Thompson tıbbi genetik'de. Ankara: Güneş Kitabevi; 2005.s.33-50.
- 115.** Schantz PM. Larval cestodiasis. In: Hoeprich PD, Jordan MC (Eds.). *Infectious diseases*. 4th ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Co; 1989.p.829-41.
- 116.** Plorde JJ. Cestodes. In: Ryan KJ, Ray CG (Eds.). *Sherris medical microbiology anintroduction to infectious diseases*. 4th ed. New York: Mc Graw Hill Co; 2004.p.791-802.
- 117.** Bostan H, Yücel AF, Şahin DA. Ameliyat sırasında oluşan şokun nadir bir sebebi: Karaciğer hidatik kist rüptürüne bağlı anaflaksi. *Olgu sunumu. J Surg Arts* 2010;1: 1-4.
- 118.** Miman Ö, Atambay M, Aydın NE, Daldal N. Kistik ekinokokkozis nedeniyle opere edilmiş , 91 olguda klinik, morfolojik ve serolojik irdelemeler. *Türkiye Parazitoloj Dergi* 2010;34(3):179-83.
- 119.** Inan M, Ayvaz S, Baser M, Karaayvaz A, Ciftci A, Hatipoglu AR et al. Hepatic hydatid disease in children and adults living in different areas in Turkey. *Saudi Med J* 2007;28(4):555-8.
- 120.** Işıtmangil T, Görür R, Yiyit N, Erdik O, Yıldızhan A, Candaş F ve ark. Toraksta kisthidatik hastalığı nedeniyle cerrahi tedavi uygulanan 308 hastanın değerlendirilmesi. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2010;18(1):27-33.
- 121.** Çakan A, Çağırıcı U, Veral A, Bilkay Ö. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde akciğer kist hidatid hastalığının cerrahi sağaltım sonuçları. *Türkiye Ekopatoloji Dergisi* 2001;7(1-2):7-10.