

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



***ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*'UN SIĞIR
VE KOYUN İZOLATLARINDAKİ ANTİJEN
B (AgB) GEN POLİMORFİZMİNİN
BELİRLENMESİ VE SEROLOJİK TANI
ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Harun Kaya KESİK

2018

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.




Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK

Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK




Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

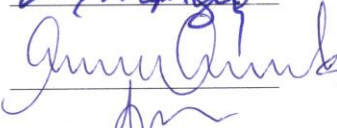
Prof. Dr. Ergün KÖROĞLU



Prof. Dr. Abdurrahman GÜL



Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK



Prof. Dr. Cem Ecmel ŞAKİ



Doç. Dr. Armağan Erdem ÜTÜK





ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Adı Soyadı: Harun Kaya KESİK

Tarih: 29.06.2018

İmza:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Harun Kaya KESİK'.

Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK

Parazitoloji Anabilim Dalı

ELAZIĞ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimi sürecine başlamam ile birlikte bu serüvenimde hem ders hem de tez aşamasında her türlü desteği ve imkanı sağlayan, beni hiç yalnız bırakmayan, bilimsel anlamda sonsuz katkılar sunmanın yanısıra örnek kişiliği ve duruşu ile çok şey öğrendiğim saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK'e sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Yaptığım bütün çalışmalarında yakın ilgi ve alakasını gördüğüm hiçbir şekilde desteklerini esirgemeyen engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Anabilim dalımızın kıymetli hocaları Prof. Dr. Nazir DUMANLI, Prof. Dr. Ergün KÖRÖĞLU, Prof. Dr. Münir AKTAŞ ve Prof. Dr. Cem Ecmel ŞAKI'ye teşekkür ederim. Tezimin her aşamasında katkılarını her daim hissettiğim mesai arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Sezayi ÖZÜBEK ve Arş. Gör. Şeyma GÜNYAKTI KILINÇ'a, saha çalışmalarında bana yardımcı olan Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ali Osman Çeribaşı'na, Arş. Gör. Burak KARABULUT'a, Veteriner Hekim Ersin KANMAZ'a, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Yasin BAYKALIR ve Arş. Gör. Hasan ABAYLI'ya teşekkür ederim.

Sadece Doktora sürecinde değil bu yaşıma kadar beni yetiştiren maddi ve manevi olarak her zaman dimdik arkamda duran annem Hakime KESİK ve babam Yusuf Ziya KESİK'e teşekkür ederim.

Yakın ilgi ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim, bu süreçte bütün desteğiyle yanımda olan ve zorluklara birlikte göğüs gerdiğimiz nişanlım Hayrunnisa ORHANOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Son olarak bu tez çalışmasına maddi destek sağladığı için TÜBİTAK'a
(Proje No: 117O884) teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	ii
ETİK BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
TABLO LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. <i>Echinococcus</i> Cinsinin Morfoloji ve Biyolojisi.....	6
3.1.1. <i>Echinococcus</i> Cinsinin Morfolojisi.....	6
3.1.2. <i>Echinococcus</i> Cinsinin Biyolojisi	8
3.2. Kistik Ekinokokkosis'in Dünya'da ve Türkiye'deki Yaygınlığı	10
3.2.1. Kistik Ekinokokkosis'in Dünya'daki Yaygınlığı.....	10
3.2.1.1. Kistik Ekinokokkosis'in Dünya'daki Moleküler Epidemiyolojisi.....	12
3.2.2. Kistik Ekinokokkosis'in Türkiye'deki Yaygınlığı.....	17
3.3. Kistik Ekinokokkosis'in Ekonomik Önemi	19
3.4. Kistik Ekinokokkosis'in Tanısı	21
3.5. Kistik Ekinokokkosis'in Tedavisi.....	23
3.6. Kistik Ekinokokkosis'de Koruma ve Kontrolü.....	24
3.7. <i>Echinococcus</i> Türlerinin Tanımlanmasında ve Teşhisinde Kullanılan Moleküler ve Serolojik Yöntemler	26
3.7.1. Moleküler Yöntemler	26
3.7.1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	26
3.7.1.2. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).....	27
3.7.1.3. Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP).....	27
3.7.1.4. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR)	28
3.7.1.5. PCR-Single Stranded Conformation Polimorphism (PZR-SSCP).....	28
3.7.1.6. DNA Baz Dizi Analizi (Sequencing)	29
3.7.2. Serolojik Yöntemler	29

3.7.2.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	29
3.7.2.2. Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).....	30
3.7.2.3. Western Blot (Immunoblot).....	31
3.8. Echinococcus Cinsinin Sınıflandırılması.....	32
3.9. Suşlar.....	33
3.10. <i>Echinococcus granulosus</i> 'un Suşları.....	34
3.10.1. <i>Echinococcus granulosus sensu stricto</i> (G1-G3).....	37
3.10.2. <i>Echinococcus equinus</i> (G4).....	37
3.10.3. <i>Echinococcus ortleppi</i> (G5).....	38
3.10.4. <i>Echinococcus canadensis</i> (G6-G10).....	39
3.10.5. <i>Echinococcus felidis</i> (Aslan suşu).....	40
3.11. Türkiye'de Yapılan Genotiplendirme Çalışmaları.....	41
3.12. Kistik Ekinokokkozis'de İmmünite, Antijenik Yapı, Hidatik Antijenler ve Antijen B.....	46
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	59
4.1. Örneklerin Toplanması.....	59
4.2. Laboratuvar Çalışmaları.....	59
4.2.1. Genomik DNA İzolasyonu.....	59
4.2.2. 12S rRNA Geninin PZR ile Çoğaltılması.....	61
4.2.3. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz Subunit 1 (mt-CO1) Geninin PZR İle Çoğaltılması.....	62
4.2.4. AgB1 Genindeki Polimorfizmin Belirlenmesi.....	63
4.2.6. DNA Dizi Analizi.....	64
4.2.7. Serolojik Analizler.....	64
4.2.7.1. Kısmi Pürifiye Kist Sıvısı Antijeninin Hazırlanması.....	64
4.2.7.2. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	65
4.2.7.3. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis).....	66
4.2.7.3.1. Tampon ve Solüsyonlar.....	66
4.2.7.3.2. Testin Uygulanışı.....	69
4.2.7.3.2.1. SDS-PAGE İle Proteinlerin Ayırıştırılması.....	69

4.2.7.3.2.2. Örneklerin Kuyucuklara Yüklenmesi ve Jelin Elektroforezi	70
4.2.7.3.2.3. Jelin Boyanması	70
4.2.7.4. Western Blot.....	71
4.2.7.4.1. Tampon ve Stok Solüsyonlar	71
4.2.7.4.2. Ayrışan Proteinlerin Nitrosellüloz Membrana Transferi (Blotting)	72
5. BULGULAR	75
5.1. 12S rRNA-PZR Bulguları	76
5.2. Mitokondrial CO1-PZR Bulguları	77
5.3. mt-CO1 Geninin Dizi Analizi, Alignment ve Filogenetik Analiz Bulguları .	78
5.4. AgB1 Gen Bölgesi PZR Bulguları.....	81
5.6. AgB1 Gen Bölgesi Alignment ve Filogenetik Analiz Bulguları	81
5.7. ELISA Bulguları	87
5.8. SDS-PAGE ve Western Blot Bulguları	88
6. TARTIŞMA	96
7. KAYNAKLAR	112
8. ÖZGEÇMİŞ	141
9. YAYINLAR	142

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Kuzey Amerika’da <i>Echinococcus granulosus</i> genotiplerinin ülkelere göre dağılımı	13
Tablo 2: Güney Amerika’da <i>Echinococcus granulosus</i> genotiplerinin ülkelere göre dağılımı	14
Tablo 3: Doğu Avrupa’da <i>Echinococcus granulosus</i> genotiplerinin ülkelere göre dağılımı.	14
Tablo 4: Güney Avrupa’da <i>Echinococcus granulosus</i> genotiplerinin ülkelere göre dağılımı.	15
Tablo 5: Asya’da <i>Echinococcus granulosus</i> genotiplerinin ülkelere göre dağılımı	16
Tablo 6: Afrika’da <i>Echinococcus granulosus</i> genotiplerinin ülkelere göre dağılımı.	17
Tablo 7: <i>Echinococcus granulosus</i> genotiplerinin Dünya’daki yayılımı.....	36
Tablo 8: Türkiye’nin farklı coğrafik bölgelerinden bildirilen <i>E. granulosus</i> suşları	44
Tablo 9: Elazığ ilinden toplanan hidatik kist örneklerinin hayvan gruplarına ve lokalize olduğu organa göre dağılımı.	76
Tablo 10: Erzincan ilinden toplanan hidatik kist örneklerinin hayvan gruplarına ve lokalize olduğu organa göre dağılımı.	76
Tablo 11: Polimorfik 13 örnekteki nükleotid değişimleri.....	82
Tablo 12: Submit edilen sekanslara ait accession numaraları.....	87
Tablo 13: Çalışmada Elazığ’dan toplanan 60 örneğe ait PZR, DNA Dizi Analizi, ELISA ve WB bulguları.	91
Tablo 14: Çalışmada Erzincan’dan toplanan 60 örneğe ait PZR, DNA Dizi Analizi, ELISA ve WB bulguları.	93

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1:** Türkiye'nin farklı illerinden bildirilen *Echinococcus granulosus* suşları ve yapılan genotiplendirme çalışmaları 45
- Şekil 2:** Mezbahaneden toplanan hidatik kistli akciğer (A) ve karaciğer (B)'in görünümü 75
- Şekil 3:** *Echinococcus granulosus*'un sığır ve koyun izolatlarının 12S rRNA gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucunda oluşan band profillerinin görünümü. 77
- Şekil 4:** *Echinococcus granulosus*'un sığır izolatlarının mt-CO1 gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucunda oluşan bandların görünümü 78
- Şekil 5:** mt-CO1 gen bölgesinin sekanslarına ait alignment sonuçları. 79
- Şekil 6:** Sığır izolatlarına ait mt-CO1 gen sekansları ile referans sekanslar kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç görünümü. 80
- Şekil 7:** *Echinococcus granulosus*'un sığır ve koyun izolatlarının AgB1 gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucunda oluşan bandların görünümü 81
- Şekil 8:** AgB1 gen bölgesinin sekanslarına ait alignment sonuçları 85
- Şekil 9:** *Echinococcus granulosus*'un sığır ve koyun izolatlarına ait AgB1 gen sekansları ile referans sekansların (JN050886 ve AY773092) oluşturduğu filogenetik ağaç görünümü 86
- Şekil 10:** SDS-PAGE jel separasyonu sonucu oluşan band profilleri 89
- Şekil 11:** Sığır ve koyun örneklerinin Western blot analizi sonucunda elde edilen spesifik band profillerinin görünümü 90

KISALTMALAR LİSTESİ

AE	:	Alveoler Ekinokokkozis
AgB	:	Antijen B
APS	:	Amonyum Persülfat
BT	:	Bilgisayarlı Tomografi
cm	:	Santimetre
DAB	:	Diaminobenzidine
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
dNTP	:	Deoksiribonükleotit trifosfat
ELISA	:	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EIA	:	Enzyme Immun Assay
gDNA	:	Genomik DNA
IHA	:	İndirekt Heamaglutinasyon Testi
IFAT	:	İndirekt Floresan Antikor Testi
IL	:	İnterlökin
IFN	:	İnterferon
KE	:	Kistik Ekinokokkozis
kg	:	Kilogram
mm	:	Milimetre

mt-CO1	:	Mitokondriyal sitokrom c oksidaz subunit 1
MR	:	Manyetik Rezonans
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
NADH	:	Nikotinamid Adenin Dehidrogenaz
OD	:	Optik Dansite
OPD	:	o-phenylenediamine
pmol	:	Pikomol
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
pH	:	Potansiyel Hidrojen
RNA	:	Ribonükleik
RFLP	:	Restriction Fragment Length Polymorphism
RE	:	Restriksiyon Enzimleri
RAPD	:	Random Amplified Polymorphic DNA
SSCP	:	Single Stranded Conformation Polymorphism

SDS-PAGE	:	Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TEMED	:	Tetramethylethylenediamine
TNF	:	Tümör Nekroz Faktörü
µm	:	Mikrometre
USG	:	Ultrasonografi
UV	:	Ultraviole
µl	:	Mikrolitre
TBS	:	Tris Buffer Saline
WB	:	Western Blot

1. ÖZET

Kistik Ekinokokkozis (KE), *Echinococcus granulosus*'un larval formu tarafından meydana getirilen, dünya çapında yaygın bir helmint hastalığıdır. Antijen B (AgB), *E. granulosus* larvasının bir ekskret-sekret ürünü olup, bu antijen parazitin larval formu tarafından bol miktarda salgılanmakta ve KE'nin serolojik teşhisi amacıyla antijen kaynağı olarak kullanılmaktadır. AgB, bir multigen ailesi tarafından kodlanmakta olup, konakçı immun sisteminden kaçma ile ilgili görevlerinin de olduğu ileri sürülmektedir. Bu tezin amacı; sığır ve koyunlardan elde edilen *E. granulosus*'un farklı izolatları arasında genetik farklılığı belirlemek ve AgB1 genindeki polimorfizmi DNA dizi analiziyle tespit ederek ELISA ve Western Blot testini kullanarak serolojik yanıtla olan ilişkisini araştırmaktır. Bu amaçla; Elazığ ve Erzincan illerindeki mezbanelerde kesim sonrası, her bir ilden 30 sığır ve 30 koyundan hidatik kistlere ait germinal membranlar ve bu hayvanlara ait kan serum örnekleri toplanmıştır. Total genomik DNA izolasyonundan sonra genetik karakterizasyon amacıyla tüm izolatların 12S rRNA geni PZR metoduyla çoğaltılmış, band elde edilemeyen örneklerin mt-CO1 gen bölgesi DNA sekans analiziyle incelenmiştir. Daha sonra gDNA'lar AgB1 spesifik primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmış ve DNA dizi analiziyle genetik varyasyon araştırılmıştır. Son aşamada bütün serum örnekleri kısmi pürifiye kist sıvısı antijeni kullanılarak ELISA ve Western Blot testleri ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak; toplam 120 izolatın 114 (%95)'ünün 12S rRNA-PZR, 6 izolatın da mt-CO1-PZR ve takiben yapılan DNA dizi analizi neticesinde *E. granulosus sensu stricto* olduğu belirlenmiştir. Takiben yapılan DNA dizi analiziyle 120 örneğin 13 (%10.8)'ünde AgB1 geninde nükleotid değişimleri belirlenmiştir. Bu çalışma ile DNA dizi analizi

kullanılarak AgB1 geninde polimorfizm tespit edilen 13 hidatik kistli örneğin 9 (%69.2)'u ELISA ile 6 (%46.1)'sı da WB ile pozitif bulunmuştur. Öte yandan AgB1 geninde herhangi bir polimorfizm saptanmayan 107 örneğin 80 (%74,7)'i ELISA ile 75 (%70,9)'i de WB ile pozitif bulunmuştur.

Sonuç olarak *E. granulosus sensu stricto*'nun AgB1 geninde değişik oranlarda varyasyon belirlenmiş ve bunun serolojik yanıt üzerinde kısmi etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kistik Ekinokokkozis, Antijen B1, PZR, ELISA, Western Blot.

2. ABSTRACT

Determination of Antigen B (AgB) Gene Polymorphism in Cattle and Sheep Isolates of *Echinococcus granulosus* and Investigation of its Effectiveness on Serological Diagnosis

Cystic Echinococcosis (CE) is a worldwide common of helminth disease caused by the larval form of *Echinococcus granulosus*. Antigen B (AgB) is an excretory-secretory product of *E. granulosus* larvae, which is secreted in abundance by the larval form of parasite and is used as antigen source for the serological diagnosis of CE. AgB is encoded by a multigen family, and it is suggested that there are also tasks related to escape from the host immunity system. The aim of this thesis is to determine the genetic difference between the different isolates of *E. granulosus* obtained from cattle and sheep and to detect the polymorphism in AgB1 gene by DNA sequence analysis and to investigate the relationship with serological response using ELISA and Western Blot test. For this purpose, the germinal membranes of hydatid cysts belong to 30 cattle and 30 sheep of each from Elazığ and Erzincan provinces and blood serum samples of these animals were collected. After the isolation of total genomic DNA, 12S rRNA of all isolates was amplified by the PCR method for genetic characterization, and mt-CO1 gene region of the samples which can not obtain bands was analyzed by DNA sequence analysis. Subsequently, gDNAs were amplified with PCR using AgB1 specific primers and genetic variation was investigated by sequence analysis. At the last step, all sera samples were analyzed by ELISA and Western Blot tests using partially purified cyst fluid antigen. As a result 114 (95%) of the total 120 isolates were identified as 12S rRNA-PZR, 6 isolates were identified as mt-COI-PCR and DNA sequencing that all of them were *E. granulosus sensu stricto*. Following DNA sequencing,

nucleotide changes in the AgB1 gene were determined in 13 (10.8%) of the 120 samples. In this study, 9 (69.2%) of the 13 hydatid cysts with polymorphism in the AgB1 gene using DNA sequencing were found to be positive with ELISA and 6 (46.1%) by WB. On the other hand, 80 (74.7%) of the 107 cases with no polymorphism in the AgB1 gene were found positive by ELISA and 75 (70.9%) with WB.

As a conclusion, variation was found in the AgB1 gene of *E. granulosus sensu stricto* at various ratios and it was determined that it had a partial effect on the serological response.

Keywords: Cystic Echinococcosis, Antigen B1, PCR, ELISA, Western Blot.

3. GİRİŞ

Kistik Ekinokokkozis (KE), *Echinococcus granulosus*'un neden olduğu hem insan hem de hayvanları etkileyen dünyadaki en önemli zoonozlardan birisi olup, özellikle az gelişmiş ülkelerde, kırsal bölgelerdeki insan ve hayvanlarda sıkça rastlanmakta ve bu bölgelerde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (1). Erişkin parazitler köpek, çakal, kurt ve diğer kanidelerin ince bağırsaklarında, larvası olan hidatik kist ise koyun, keçi, sığır, domuz ve diğer birçok evcil ve yabani memelide ayrıca insanlarda başta karaciğer ve akciğer olmak üzere çeşitli organ ve dokularda bulunmaktadır (2).

Echinococcosis, eski çağlardan kalma köklü ve uzun bir tarihi serüvene sahip olup, günümüzde dünyanın birçok bölgesinde insanları ve hayvanları etkileyen, dikkate değer sosyoekonomik etki gösteren zoonotik bir enfeksiyondur (3). Hidatik kist, çok eski zamanlardan beri bilinmektedir. Hippocrates (M.Ö. 460-377) sığır ve domuzda hidatik kist varlığını belirlemiş ve insan karaciğerinde saptadığı hidatik kisti “su ile dolu kese” olarak tanımlamıştır (4). Galen M.Ö. 129-200 yılları arasında hidatik kistin kesim hayvanlarındaki oluşumundan bahsederek başlıca yerinin karaciğer olduğunu vurgulamıştır (5). Yaklaşık olarak M.S. 50 yıllarında Aretaeus'un, hidatik kist ile ilgili çalışmalar yaptığı ve bu alan üzerine gittiği bildirilmiştir (6). Takip eden periyotlarda 16. ve 17. yüzyıllarda insan ve hayvanlardaki hidatik kistlerin yaygınlığı tekrarlanarak bildirilmiştir. Francesco Redi, 1626-97 yılları arasındaki çalışmaları ile *Taenia türlerinin* metasestodlarını tanımlayan gözlemlerinde hidatik kistin doğal yapısının ilk göstergelerini ortaya koymuştur (7). Carl Asmund Rudolphi 1801 yılında hayvan bilimine “*Echinococcus*” adını ilk kez tanıtan bilim insanı olmuştur (8).

Türkiye’de *Echinococcus*’un tarihi, insan ve hayvanlarda hidatik kistin tanımlanması ilk kez Prof. Dr. Ekrem Kadri Unat tarafından rapor edilmiştir (9). Osmanlı Devleti periyoduna bakıldığı zaman “Kist Hidatik *multiloculare*” olarak ilk kez bir Osmanlı fizikçisi olan Katibian tarafından bahsedilmiştir (10). *Echinococcus* üzerine ilk kitap Dr. Abdullah Bey (1799-1874) tarafından yazılmış, 1876 yılında ölümünün ardından Miralay Ahmet Bey tarafından yayınlanmıştır (11). *Echinococcus granulosus* varlığı ilk kez İstanbul’da 1928 yılında Prof. İsmail Hakki Çelebi (1873-1939) tarafından köpeklerde rapor edilmiş ve parazitin erişkin formu gösterilmiştir (11). Cumhuriyet döneminde ise 1940’larda Veteriner Hekimler Hasan Şükrü Oytun, Ahmet Nevzat Tüzdil ve Hasip Kurtpınar *Echinococcus* ile ilgili çalışmalar yürütmüşlerdir (9, 11).

3.1. *Echinococcus* Cinsinin Morfoloji ve Biyolojisi

3.1.1. *Echinococcus* Cinsinin Morfolojisi

Echinococcus cinsi Taeniidae ailesindeki cinslerden farklı olarak bazı özellikler taşımaktadır. Erişkin bir *Echinococcus* diğer Taeniid sestodlara benzememekte olup, sadece birkaç mm uzunluğunda ve genellikle üç veya dört halkaya sahiptir. *Echinococcus granulosus*, köpek, tilki, dingo, çakal ve sırtlan gibi son konakların ince bağırsaklarına yerleşir. Metasestod olarak bilinen larval formları ise ara konaklar olan sığır, koyun, keçi, deve, domuz, manda gibi memelilerin ve insanların başta karaciğer ve akciğer olmak üzere değişik organ ve dokularına yerleşmektedir (3).

Echinococcus granulosus ortalama 1.2-6 mm uzunluğa sahip olup baş (skoleks), boyun (proliferasyon) ve strobila denilen halkalar olmak üzere üç

kısımdan oluşmaktadır. Erişkin parazitin halkalarından başa en yakın olanı genç halka, ortadaki olgun, sondaki ise gebe halka olarak adlandırılmaktadır. Genç halkada üreme organ faaliyetleri henüz işlevsel olmazken, olgun halkada üreme organları işlevsel özelliktedir. Gebe halkalarda ise içi yumurta ile dolu uterus bulunmaktadır. *Echinococcus granulosus*'un seksüel siklusu yaklaşık olarak 3-4 haftayı bulmakla birlikte yumurta üretimi türlere ve suşlara bağlı olarak 28. günde başlamaktadır (12, 13).

Echinococcus granulosus yumurtaları elipsoidal şekilde, çok katmanlı ve içerisinde gelişmiş 6 çengelli bir onkosfer (embriyo) taşımaktadır (14). Bu yumurta *E. multilocularis* ve diğer Taeniid türlerinin yumurtalarına benzememekte olup, morfolojik olarak ayırt edilemedikleri yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (15, 16). Yumurtalarda, en dışta yer alan onkosferi veya embriyoyu korumak ile görevli ve yumurtanın fiziksel dayanıklılığında önemli paya sahip olan embriyofor bulunmaktadır. Embriyofor, keratin benzeri bir proteinden oluşan geçirgen özelliği olmayan yumurtaya spesifik radial çizgileri veren ve embriyoyu koruyan en önemli tabakadır (16, 17).

Echinococcus granulosus'un kistleri makroskobik açıdan iki tipte görülmektedir. Bunlar uniloküler tipteki kistler ile multiveziküler (multikistik) tipteki kistlerdir. Uniloküler tipteki kistler büyükçe bir keseden ibaret olan ve içerisinde çok sayıda kız kese ihtiva eden kistler olarak bilinirken, multiveziküler tipteki kistler ise tek bir kistin eksojen olarak dışa doğru çok sayıda kız kese ihtiva eden birbirine yapışık birçok küçük ve bağımsız kistler topluluğudur (18, 19).

Kist hidatik yapısal olarak;

1. Dışta fibröz (kütiküler) tabaka,

2. Ortada laminar tabaka,
3. İte germinal tabaka,
4. Germinal tabakaya bağlantılı protoskoleksler,
5. Germinal tabakadan kopmuş serbest halde yuzen protoskoleksler,
6. Germinal tabakaya bağlantılı ureyici kapsuller,
7. Germinal tabakadan kopmuş serbest yuzen ureyici kapsuller,
8. Serbest ureyici kapsullerin gelişmesi sonucu oluşan kız keselerdir (18, 19).

3.1.2. *Echinococcus* Cinsinin Biyolojisi

Echinococcus cinsine ait turlerin yaşam doringleri, son konak etillerin dişkiları ile dişariya atılan içi yumurta ile dolu gebe halkaların parçalanmasıyla serbest kalan yumurtaların arakonaklar tarafından buyuk çoğunlukla ağız, çok nadiren de solunum yoluyla alınmaları ile başlamaktadır. Yumurtalar ince bağırsakta sindirim enzimlerinin etkisi ile parçalanarak, embriyo veya u çift çengelli onkosfer halinde serbest kalmaktadır (19, 20).

Embriyonun parçalanması iki aşamada meydana gelmektedir:

a) Embriyofordaki keratin blokların parçalanıp onkosfer zarının serbest kalması: Embriyoforun parçalanması işleminde pepsin ve pankreatin gibi proteolitik enzimler rol almaktadır. Embriyofor paralanmadıka onkosfer aktif hale geçememektedir. Onkosfer membranının açığa çıkması ile birlikte safra tuzlarının etkisi sonucu membran geçirgenliğinde değişiklikler olmakta ve onkosfer aktif hale geçmektedir. Memelilerdeki safra tuzlarının bileşim farklılıklarının arakonak seçiminde rol oynadıkları duişunulse de yumurtaların bağırsak dişında da aılabildikleri göz onunde bulunduruluğunda safranın yumurtaların açılması için

gerekli olmadığını ortaya çıkarmaktadır. Koyunlarda solunum yoluyla alınan yumurtaların akciğerde açılması ve kemirgenlerde deneysel olarak periton içi yolla verilen yumurtaların enfeksiyon meydana getirmesi de bu tezi desteklemektedir (21).

b) Aktif hale geçen onkosferin bağırsak duvarını delmesi: Onkosfer serbest kaldığında ritmik hareketlerle bağırsak duvarına tutunmakta ve onkosfer salgılarının yardımıyla 30-120 dakika içerisinde lamina propria'ya kadar ulaşmaktadır (21). Daha sonra serbest kalan üç çift çengelli onkosfer bağırsak duvarını delerek kan dolaşımı veya lenf yolunu izleyerek çoğunlukla vena porta ile karaciğere gelmektedir. Onkosferlerin büyük bir çoğunluğu kan ve besin yönünden zengin olan karaciğere tutunurken diğerleri sağ kalbe, akciğerlere veya genel kan dolaşımına girerek vücudun değişik organ ve dokularına yayılmaktadırlar (19). Hidatik kistler yavaş büyüyen bir karektere sahiptir. Öyle ki, bu kistler şekillenmeye başladıktan aylar hatta yıllar sonra dahi tespit edilememektedirler (22). Açığa çıkan bu onkosfer penetre olduğu organ ya da salgıladığı enzim vasıtasıyla etrafındaki dokuyu yıkımlayarak o bölgede bir vezikül oluşturmaktadır. Bu vezikül üçüncü hafta sonunda 250 µm büyüklüğüne ulaşmakta ve etrafında adventisyal tabaka şekillenmektedir. Bu büyüme oranı ilk 5-7 ay içerisinde 5-15 mm çapa ulaşp kistin içerisinde germinal tabaka teşekkül etmektedir. Enfeksiyonun şekillenmesinden bir yıl sonra hidatik kistlerin çapı 2 cm'yi geçebilmekte, ilerleyen süreçlerde ise bu kistler 20-30 cm çapa ulaşabilmektedirler. Bu kistlerin büyüme oranları konağa, konağın yaşına, yerleştiği organa göre değişiklik göstermektedir. Onkosferlerin yerleşip gelişmelerini devam ettirebildikleri organ lokalizasyonuna ulaştıkları zaman metosestod evresine

geçmiş sayılmaktadırlar. İçerisinde protoskoleks bulunduran veya üreten kistlere “fertil kist”, protoskoleks olmayan veya üretemeyen kistlere ise “steril kist” denilmektedir. Sığırlarda genellikle steril kist karaktere sahip kistler göze çarparken, koyunlarda daha çok fertil kist karakterine sahip kistler bulunmaktadır. Uygun son konaklar köpek ve diğer karnivorlar bu protoskoleks taşıyan fertil kistleri yiyerek enfeksiyona yakalanırlar. Alınan protoskoleksler midedeki pepsin enzimi, duodenumun üst bölümündeki pH değişikliklerinin ve safra etkileşimlerinin etkisi ile son konaklarda evagine olup bağırsak mukozasına tutunabilmektedirler. Daha sonra da halkalar oluşturup 5-8 hafta içerisinde içi yumurta ile dolu gebe halkaları dışkı ile çevreye atmaktadırlar (19, 21, 23).

3.2. Kistik Ekinokokkosis’in Dünya’da ve Türkiye’deki Yaygınlığı

3.2.1. Kistik Ekinokokkosis’in Dünya’daki Yaygınlığı

Echinococcus granulosus, Dünya’nın hemen hemen her bölgesinde tespit edilmiş olup, yapılan çalışmalarla geniş bir yayılım alanına sahip olduğu ortaya konulmuştur (24).

Amerika Birleşik Devletleri’nin Maine bölgesinde yapılan bir araştırmada 54 hayvanın %39’unda hidatik kist bulunmuştur (25). Kanada’da hidatik kist yaygınlığı ile ilgili raporlar başlıca geyikler ve özellikle de ren geyikleri ile Amerikan bizonu ve karibular ile ilgilidir (26-28). Ekinokokkosis oranı son konak olan kurtlarda %6-24 arakonak olan geyiklerde %42-47, ren geyiklerinde ise %1-21 olarak bildirilmiştir (26-29). Arjantin’de 2011 yılında yapılan bir çalışmada KE’nin prevalansının koyunlarda %3, domuzlarda %1.6, sığırlarda %2.9, köpeklerde ise %2.5 olduğu bildirilmiştir (30). Brezilya’da en efektif bölge Rio

Grande do Sul bölgesi olup, bu bölgede *E. granulosus*'un köpeklerde %11, sığırlarda %12 ve koyunlarda ise %17 yaygın olduğu, diğer bölgelerde düşük seviyelerde (%0.1) görüldüğü bildirilmiştir (31). İskandinavya'nın kuzeyindeki geyik popülasyonunda *E. canadensis* gözlenmiştir (32). Kistik Ekinokokkozis, Finlandiya'da %1.2, İsveç'te %1.6 oranında yaygın olup yine Finlandiya'da kurtlarda %10-46 oranında *E. granulosus* prevalansı tespit edilmiştir (32). İngiltere ve İrlanda'da *Echinococcus* türlerinin prevalansı için veriler sınırlıdır. Fakat İngiltere'de *E. granulosus*'un G1-G3 suşları ortaya konmuş, İrlanda'da ise köpek ve atlarda KE'ye sebep olan *E. equinus* tespit edilmiştir (33-35). Yunanistan'da 1998 verilerine göre koyunlarda %31.3, keçilerde %10.3 ve domuzlarda %0.6 yaygınlık bildirilmiştir (36). İtalya'nın Güney bölgelerinde koyunlarda %33-75, sığırlarda %10.4, mandalarda %10.5, en yüksek prevalansa sahip yerler olan Sicilya ve Sardinya'da sığırlarda sırası ile %41.5 ve %67.1 oranlarında pozitiflikler saptanmıştır (37-40). Rusya'da Kafkas bölgesinde KE prevalans oranı sığır ve koyunlarda %20-30 arasında bildirilmiştir (41-43). Özbekistan'da koyunlarda %45-62, Kazakistan'da koyunlarda %24-48, sığırlarda %7, Kırgızistan ve Tacikistan'da koyunlarda sırası ile %64, %50 oranlarında pozitiflikler saptanmıştır (44-47). Suudi Arabistan'da batı Al-Baha bölgesinde koyunlarda %12.6, sığırlarda %8.3, keçilerde %6.6, develerde ise %32.9 pozitiflik bulunmuştur (48). İran'da çiftlik hayvanlarında çeşitli çalışmalarda koyunlarda %1.3-74.4, keçilerde %0.4-37.8, sığırlarda %1.3-40.1, mandalarda %4.3-31.9, develerde %8.8-35.5, eşeklerde ise %2 oranında yaygınlık bulunmuştur (49-52). Çin'de Qinghai bölgesinde yüksek bir prevalans dikkat çekmekle birlikte yaklarda %78, Gansu'da koyunlarda %11, yaklarda %20, köpeklerde %23, Batı Sichuan'da yaklarda %51, Ningxia'de

koyunlarda %52, keçilerde %3, sığırlarda %81, domuzlarda %24 ve develerde %19 oranında pozitiflik bildirilmiştir (53-56). Tunus'da köpeklerde *E. granulosus* oranı %20'nin üzerinde iken koyunlarda %16.4, sığırlarda % 8.56, keçilerde % 2.8 oranlarında KE pozitifliği bildirilmiştir (57). Fas'da sığırlarda KE oranı %37.6-42.9, koyunlarda ise % 10.9-31.65, Cezayir'de köpeklerde %15.5-42, sığırlarda ise farklı bölgelerde olmak üzere Tebessa'da %89.7, Djelfa'da %70'dir (58-61).

3.2.1.1. Kistik Ekinokokkosis'in Dünya'daki Moleküler Epidemiyolojisi

Çin'de 22 vilayette KE önemli bir halk sağlığı problemi olarak ortaya çıkmakta olup, DNA teknikleri ile yapılan araştırmalarda Çin'in kuzey batısında en baskın suşun yaygın koyun suşu (G1) olduğu ifade edilmiştir (62, 63). Kenya'nın Massai ve Turkana bölgelerindeki iki kırsal toplulukta oldukça yüksek bir prevalans gözlenmiş, moleküler analizler koyun (G1) ve deve (G6) suşlarının varlığını göstermiş olup, Turkana bölgesinde ise deve suşu (G6) daha yaygındır (64). Arjantin'de insanlarda ve koyunlarda yaygın koyun suşu (G1) ve Tazmanya koyun suşunun (G2), domuzlarda domuz suşunun (G7) ve insanlarda deve suşunun (G6) varlığı gösterilmiştir (65, 66). Nepal'de KE'nin hayvanlarda koyun (G1), sığır (G5) ve deve (G6) suşlarının varlığı bildirilmiş olup, iki insan izolatında ise deve suşu (G6) rapor edilmiştir (67). İran'da son yapılan kapsamlı moleküler bir çalışmada 200 izolatta yaygın suşu (G1) belirlenmiştir (68). Avustralya'da ise KE'nin iki ana bulaşma döngüsü olup bunlar pastoral ve silvatic döngülerdir. Bu döngüler farklı suşları belirlemeye olanak tanısa da yapılan izoenzim, DNA analizleri ve morfolojik çalışmalar yaygın koyun suşunun (G1) olduğunu göstermektedir (69-71). Libya'da 10 koyun, 5 deve, 3 insan ve 12 sığır olmak üzere toplamda 30

örneğin mt-CO1 gen bölgesinin dizi analizi yapılmış ve yaygın koyun suşunun (G1) belirlendiği bildirilmiştir (72).

Echinococcus granulosus genotiplerinin ülkelere göre dağılımları Tablo 1-6'da gösterilmiştir. Bu tablolardaki sınıflandırma şu şekilde yapılmıştır: *Echinococcus granulosus* (G1-G3), *Echinococcus equinus* (G4), *Echinococcus ortleppi* (G5), *Echinococcus canadensis* (G6/G7) ve *Echinococcus canadensis* (G8/G10)

Tablo 1: Kuzey Amerika'da *E. granulosus* genotiplerinin ülkelere göre dağılımı (24).

Ülke	İnsan	Köpekgiller	Geyikler	Domuz	Kaynak
Kanada	-	G8/G10	G8/G10	-	27, 73-76
ABD	G8	-	G8/G10	Eradike edildi	76-78
Meksika	G5	G7	-	G1/G7	79-82

Tablo 2: Güney Amerika’da *E. granulosus* genotiplerinin ülkelere göre dağılımı (24).

Ülke	İnsan	Köpek	Koyun	Sığır	Keçi	Domuz	Kaynak
Arjantin	G1/G2/G5/ G6	G1/G6	G1/G2/ G3	G1	G1/ G6	G1/G7	83-87
Brezilya	G1/G3/G5	G1/G3/ G5	G1	G1/G5	-	G1/G7	85, 88-91
Şili	G1/G6	-	-	G1/G3	-	-	85, 92, 93
Peru	G1/G6	-	G1	G1	G6	G1/G7	94-97
Uruguay	-	-	-	G1/G5	-	-	83, 85
Bolivya	G1	-	-	-	-	-	85

Tablo 3: Doğu Avrupa’da *E. granulosus* genotiplerinin ülkelere göre dağılımı (24).

Ülke	İnsan	Köpek	Vahşi Kanideler	Sığır	Domuz/Yaban domuzu	Koyun/ Geyik	Kaynak
Polonya	G7/G1	-	-	-	G7(Domuz)	-	98, 100
Estonya	-	G1	G8/G10	-	-	G8/G10 (Geyik)	99, 101
Letonya	-	-	G10	-	-	-	99
Litvanya	G7	G7	-	G7	G7 (Domuz)	-	99, 102
Ukrayna	-	-	-	-	G7 (Domuz, Yaban Domuzu)	-	103
Moldova	-	-	-	G1/G3	-	G1/G3 (Koyun)	104
Slovakya	G7 G1-3	-	-	-	G7 (Domuz)	-	105

Tablo 4: Güney Avrupa’da *Echinococcus granulosus* genotiplerinin ülkelere göre dağılımı (24).

Ülke	İnsan	Köpek Kurt	Koyun Keçi	Sığır Manda	At	Domuz Geyik	Kaynak
Fransa	G5	G6/7	Koyun (G1-3)	Sığır (G1-3) Sığır (G5)	-	Domuz ve Geyik (G6-G7)	106-109
Yunanistan	-	-	Koyun (G1-3) Koyun (G7) Keçi (G1-3) Keçi (G7)	Manda (G1-3)	-	Geyik (G1-3)	110-112 126
İtalya	G1-3	Kurt (G1-3)	Koyun (G1-3) Keçi (G3)	Sığır (G1-3) Sığır (G5) Manda (G1-3)	G4	Domuz (G1), (G7) Geyik (G1)	113-120
Portekiz	G1-3	Kurt (G6-7)	Koyun (G1-3) Keçi (G1-3)	Sığır (G1-3) Sığır (G7) Sığır (G1)	-	-	121-123
İspanya	G1	Kurt (G1)	Koyun (G1) Keçi (G1, G7)	Sığır (G1)	G4	Domuz ve Geyik (G1,G7)	124-126

Tablo 5: Asya’da *Echinococcus granulosus* genotiplerinin ülkelere göre dağılımı (24).

Ülke	İnsan	Köpek, Kurt, Kedi	Koyun, Keçi	Sığır, Manda, Deve	At	Domuz, Geyik, Yak	Kaynak
Rusya	G1-3	Kurt	G1-3	-	-	Geyik	127-129
	G6	G6, G10				G6,G8,	
	G10	Kedi				G10	
		G1					
İran	G1	G1,G2,G3,	Koyun	Sığır, Deve	G1,G6,	-	130-147
	G2	G6	G1,G3	G1,G3,G6	G4		
	G3		Keçi				
			G1,G6,				
			G7				
Hindistan	G1,G3,	G1	G1,G2,	G1-3,G5,	-	Domuz	148-153
	G5,G6		G3	G2		G3,G5	
Pakistan	G1	-	G1,G3	Deve	-	-	154, 155
				G1			
				Sığır			
				G1,G3			
Çin	G1,G3,	Köpek	Koyun	Deve		Yak	156-167
	G10	G1,G1-3,G6	G1	G1,G6		G1	
			Keçi	Sığır			
			G6	G1,G6			

Tablo 6: Afrika’da *Echinococcus granulosus* genotiplerinin ülkelere göre dağılımı (24).

Ülke	İnsan	Köpek, Kurt, Kedi	Koyun, Keçi, Antilop	Sığır Manda Deve	At	Domuz Geyik Yak	Kaynak
Fas	G1	-	Koyun G1,G2,G3 Keçi G1	Sığır G1,G2,G3 Deve G1	G1	-	168-170
Cezayir	G1,G2	-	Koyun G1,G2	Sığır G1 Deve G1,G2	-	-	168-173
Tunus	G1,G3, G6	Köpek G1	Koyun G1 Keçi G1 Antilop G1	Sığır G1 Deve G1,G6	G1,G4	Domuz G1	173-185, 194
Libya	G1	Köpek G1	Koyun G1	Sığır G1,G6 Deve G1,G6	-	-	72, 185, 186,
Mısır	G1,G6, G7	-	Koyun G1,G6	Sığır G6 Deve G1,G5,G6	G4	Domuz G6,G7	187-193

3.2.2. Kistik Ekinokokkosis’in Türkiye’deki Yaygınlığı

Kistik Ekinokokkosis, ülkemizin hemen her bölgesinde yaygınlık göstermektedir (9). Erzurum’da mezbaha muayenesine ile yapılan bir çalışmada %19.5-90, Kars’da %24.7-50, Van’da ise %19.4-37.8 oranında yaygın bulunmuştur (195-199). Türkiye’de köpeklerde *E. granulosus*’un %24 oranında görüldüğü, KE’nin koyunlarda %51.9, sığırlarda %39.7 ve keçilerde ise %22.1 oranında yaygın olduğu ifade edilmiştir (200-202).

Türkiye’de KE’nin sığırlardaki yaygınlık oranı incelendiğinde, Erzurum’da %46.41, Sivas’ta %39.7-35.7, Erzurum’da %33.9, Kars’da %31.25,

Afyonkarahisar'da %29.47, Samsun'da %21.1, Kırıkkale'de %14.16, Burdur'da %13.5, Trakya'da %11.6, Ankara'da %9.4, Manisa'da %8.96, Malatya'da %7.6, Konya'da %5.6, Kars'ta %5.3 ve Kayseri'de %3 olduğu bildirilmiştir (203-217).

Türkiye'de KE'nin koyunlardaki yaygınlığına bakıldığında, Erzurum'da %70.91, Kars'ta %63.85, Konya'da %51.98, Bursa'da %50.7, Kars'ta %48.35, Sivas'ta %32.49, Bursa'da %30, Burdur'da %26.6, Manisa'da %15.98, Malatya'da %9.1, Ankara'da %5.9, Trakya'da %3.5 olduğu bildirilmiştir (197, 202, 203, 207, 212-214, 218-221).

Keçilerdeki yaygınlık oranı, Kars'ta %25.11, Burdur'da %21.11, Ankara'da %1.6 olarak bildirilmiştir (197, 202, 212).

Mandalarda ise, Ankara'da %41.1, Samsun'da %29.6, İstanbul'da %22.32, Kars'ta %16.66, Samsun, Ordu ve Amasya'da %10.24 oranında yaygınlık bildirilmiştir (197, 222-225).

Son konak köpeklerde *E. granulosus*'un yaygınlık oranı, Ankara'da %44, Bursa'da %36, Kars'ta %40.5, Sivas'ta %28, Konya'da %28.33, Adana'da %24.72, Kayseri'de %24, Sivas'ta %16, Muş'ta %9, Antakya'da %8.86, İzmir'de %5.5, Elazığ'da %3.33, Ankara'da %0.94, İstanbul'da %0.8 olarak bildirilmiştir (205, 226-237).

Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki 8 farklı ilde ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ve IFAT (İndirekt Floresan Antikor Tekniği) testleriyle 597 sığır serumuna hidatidosis seroprevalansı açısından bakılmış sırasıyla %63.3 ve %54.7 oranlarında seropozitiflik bulunmuştur (200). İl bazında ise Elazığ'da %59.9, Malatya'da %54.1, Muş'ta %81.3, Bingöl'de %64.6, Van'da %69.5, Erzincan'da %57.3, Erzurum'da %43.9, Kars'ta ise %43.3 pozitiflik saptanmıştır

(200). Başka bir çalışmada koyun hidatiosisinde ELISA'nın sensitivite ve spesifitesinin sırasıyla %60 ve %94 olduğu bulunmuştur (201). Bursa yöresinde 300 koyunda hidatidozisin tanısında IFAT'ın sensitivite ve spesivitesinin sırasıyla %78.95 ve %92.57 olduğu belirlenmiştir (238). Antakya ilindeki köpeklerde koproantijen ELISA ile bakısı yapılan 79 köpeğin 7'sinde (%8.86) seropozitiflik bulunmuştur (233).

3.3. Kistik Ekinokokkosis'in Ekonomik Önemi

Kistik Ekinokokkosis hem insanlarda hem de hayvanlarda önemli derecede ekonomik kayıplar meydana getirmektedir (239). Özellikle çiftlik hayvanlarının başlıca karaciğer olmak üzere diğer bazı iç organlarını etkileyerek verim kayıplarına sebep olmaktadır (240). Enfeksiyonun hayvanlarda neden olduğu ekonomik kayıplar, meydana gelen verim kayıpları, imha edilen organların değeri ile birlikte dikkate alınarak hesaplanmakta olup hastalığın hayvanlar tarafından iyi tolere edilmesi sebebiyle genellikle kesimden sonra mezbahalarda tespit edilebilmektedir (241). Enfeksiyonun çoğunlukla klinik bir belirti göstermeksizin üretim bazında düşünülen çiftlik hayvanlarında et ve süt veriminde azalma, yün kalitesindeki düşüş, kısırılık oranında yükselme, kilo kaybı ve en önemlisi de mezbahanelerde kesilen hayvanların karaciğerlerinin imha edilmesidir (239). KE'li organlar dünyanın birçok yerinde imha edilirken Uruguay gibi bazı ülkelerde farmasötik endüstrisinde değerlendirilmektedir (239). Hidatik kistli hayvanların bağışıklık düzeyleri düştüğü için salgın hastalıklara yakalanmaları ve verim kayıpları ciddi seviyelerde yükselmektedir. Ancak KE'nin genel anlamda %30 oranında verim kaybına neden olduğu tahmin edilmektedir (242).

Dünya’da KE’nin ekonomik etkilerine ve kayıplarına bakıldığı zaman, Çin’de insan ve hayvanların ekonomik kayıplarının kombine edilip değerlendirildiği bir araştırmada yıllık toplam kaybın 218,676 USD (189,850-247,871) civarında olduğu bildirilmiştir (243). Koyun, keçi ve yaklarda sadece karaciğer kaybından ötürü yıllık 185,635 USD oranında, verim ve karkas kaybından ötürü ise yıllık 903,649 USD değerinde bir ekonomik kayıp olduğu bildirilmiştir (243). Çin’de yine KE’ye bağlı olarak karkas ağırlığında sığır başına 7,21 kg, koyun başına 1,15 kg kayıp olduğu rapor edilmiştir (244). Portekiz’de KE’den ileri gelen süt, et ve yapağı kaybının yaklaşık olarak sırasıyla %7-10, %5-20, %10-40 olduğu tahmin edilmektedir (245). İspanya’da KE’nin neden olduğu ekonomik kaybın koyunlarda karkas ağırlığında %5, süt veriminde ise %10 olduğu bildirilmiş ve bu kayıpların maliyetinin 15,532,242 Avro olduğu tahmin edilmektedir (243). Hindistan’da çiftlik hayvanlarının verim kayıpları üzerine yapılan bir çalışmada koyunlarda 2,107,168 USD, keçilerde 986,571 USD, sığırlarda 103,700,420 USD ve mandalarda ise 85,039,732 USD, toplam kaybın ise 202,832,967 USD olduğu belirtilmiştir (246). İran’da KE’nin ülke ekonomisine yaptığı kaybın araştırılmasına yönelik çalışmada hem insanlarda hem de hayvanlardaki zararın ortalama 232.3 milyon USD olduğu, çiftlik hayvanlarındaki kaybın ise yıllık 132 milyon USD olduğu hesaplanmıştır (247). Peru’da KE’in çiftlik hayvanlarında yaptığı ekonomik etkilerin araştırılmasında sadece karaciğer imhası ile ilişkili kayıpların yıllık 196,681 USD, bunun yanında yün ve yapağı, kilo kayıpları, et ve süt üretimindeki kayıpları ile birlikte toplam 3,846,754 USD olduğu belirtilmiştir (248). Dünya çapında çiftlik hayvanlarında KE’den meydana gelen yıllık verim kayıplarının 141,605,195 USD, karkas kayıplarının 241,525,979 USD, yün ve yapağı

kayıplarının 34,871,148 USD, süt üretimindeki azalmanın 378,722,717 USD, fertilitite kayıplarının 453,141,617 USD olduğu tahmin edilmektedir (249).

Türkiye’de KE’den kaynaklanan yıllık ekonomik kayıp sığırlar için 32,4 milyon USD (26,2-39,1), koyunlar için 54,1 milyon USD (43,8-65,5) ve keçiler için 2,7 milyon USD (2,2-3,3) olarak tahmin edilmektedir. Türkiye’de KE’ye bağlı şekillenen toplam verim kaybı ise 2008’de 89,2 milyon USD (72,2-107,9) olarak hesaplanmıştır. Toplam kayıplar açısından bakılacak olursa ilk sırayı sığırlardaki süt verim kaybı (%60) oluşturmakta, bunu koyun (%36) ve keçilerdeki (%30) fertilitite kaybı izlemektedir (250). Burdur’da 2000-2001 yılları arasında yapılan KE’nin ekonomik etkisine yönelik bir çalışmada karaciğer ve akciğer kaybı ile birlikte verim kayıplarının her bir keçi için 2.9 USD, koyun için 3.2 USD, sığır için ise 7.5 USD olduğu bildirilmiştir (202). Erzurum’da yapılan bir çalışmada KE’li karaciğerlerin tamamının imha edilmesi halinde 3.320 TL ekonomik kaybın olacağı bildirilmiştir (251). Kayseri’de üç farklı mezbahada yapılan çalışmada KE tespit edilen koyun karaciğer ve akciğerlerinden ötürü oluşan ekonomik kaybın 368 TL (240 USD), sığır karaciğerlerine bağlı olarak oluşan ekonomik kaybın ise 252 TL (165 USD) olduğu, hayvansal üretim kayıpları ve insan sağlığı harcamaları haricinde bir yılda KE’ye bağlı olarak meydana gelen ekonomik kayıpların 48.000 TL (31.372 USD)’ye ulaştığı bildirmiştir (217).

3.4. Kistik Ekinokokkozis’in Tanısı

Kistik ekinokokkoziste tanı, klinik bulguların yanısıra görüntüleme teknikleri, serolojik ve moleküler tekniklerle elde edilen bulguların değerlendirilmesi ile yapılmaktadır (252, 253).

Köpeklerde *Echinococcus* enfeksiyonlarının tanısı, kontrol programları ve epidemiyolojik yaygınlık açısından önem arz eder (254). Ekinokok türleri ile enfekte son konaklarda neredeyse hiç klinik belirti görülmemesi ile birlikte canlı hayvanlarda teşhis için dışkı bakısı, arekolin pürgasyon yöntemi, serumda antikor ve dışkıda antijen aranması yöntemleri uygulanabilmektedir. Bu teşhis yolları arasındaki en güvenilir yöntem ise nekropsi yapılarak parazitin aranmasıdır (255). Dışkı muayenesi yöntemi ile kanidelerde *E. granulosus* enfeksiyonlarının saptanması kolay değildir. Dışkının flotasyon yöntemi ile muayenesi neticesinde yumurtalar tespit edilebilmekte ancak *Taenia* spp. yumurtalarının morfolojik olarak ayırt edilememesi nedeniyle kesin tanı yapılamamaktadır. Bundan dolayı tanı amacıyla dışkıdaki gebe halkalar da aranabilir ve eğer halkaların yapısı bozulmamışsa doğru bir morfolojik tanı konulabilmektedir. Ancak oldukça küçük olan bu halkaların muayene sırasında gözden kaçırılabilmesi de unutulmamalıdır (256). Arekolin pürgasyon yöntemi ile de *E. granulosus*'un tanısı yapılmakta olup bu metod ile köpeklere arekolin uygulandıktan sonra pürgasyon neticesinde atılan dışkı incelenerek parazitler aranmaktadır (257). Son konaklardaki teşhis yöntemlerinden birisi de serumda spesifik antikorların aranmasıdır. Bu yöntem bireysel olarak enfeksiyonun tanısında güvenilir olmadığı ancak popülasyon taramalarında kullanılabileceği bildirilmektedir (258, 259). Dışkıda koproantijenlerin aranması da sonkonaklarda kullanılan bir teşhis yolu olup, en kolay ve en iyi testin ELISA olduğu, bu amaçla Western blot tekniğinin de uygulanabildiği bilinmektedir (255). Yukarıdaki yöntemlerin yanında en güvenilir yöntem ise nekropsi yapılarak parazitin aranması olup, bağırsakların direk muayenesi, sedimentasyon ve sayım tekniği ile gerçekleştirilmektedir (257).

KE'de hastalığın arakonak hayvanlarda klinik teşhisi zor olup, tanıda serolojik testlerden faydalanılmasına rağmen kesin tanı nekropsisi ile konulmaktadır (254). Tanıda radyografi, ultrasonografi (USG), bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MR), X-ray (röntgen) gibi görüntüleme yöntemleri kullanılmasının yanı sıra ELISA, Indirekt Heamaglutinasyon Testi (IHA), IFAT, Western Blot (WB) gibi serolojik yöntemler ve PZR tabanlı moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır (255). İnsanlarda sık başvuru olan bu görüntüleme yöntemlerine, hayvanlarda nadiren de olsa başvurulmaktadır (260).

3.5. Kistik Ekinokokkosis'in Tedavisi

Kistik ekinokokkosisin tedavisi son konaklarda erişkin parazitlere, arakonaklarda ise larva formuna karşı çeşitli tedavi uygulamalardan ibarettir. Son konak enfeksiyonlarının sağaltımı, hastalığın insanlara bulaşmasının önlenmesi açısından kritiktir. Hayvanlarda, tanıdaki güçlükler ve ekonomik olmaması nedeniyle sağaltıma gerek duyulmamaktadır (261). Bu nedenle son konakların tedavi edilmesi ve bunların kistli organlara ulaşmalarının engellenmesi gerekmektedir. Son konaklarda uzun yıllar boyunca arekolin hidrobromid kullanılmıştır. Bu ilacın letal etkisi bulunmamakla birlikte iki aşamada etki göstermektedir. Bunlardan ilki, parazitte bir felce sebep olmak ikincisi ise bağırsak hareketlerini artırarak parazitin atılmasını sağlamaktır. Köpeklere 1,75-3,5 mg/kg dozda oral yolla verilir, köpekler ilaç uygulanmadan önce aç bırakılmalıdır (262). Günümüzde ise tedavide kullanılan en yaygın ilaç praziquantel'dir. Bu ilaç ağız veya derialtı yolla uygulanabilir. Köpek ve kedilere ağız yoluyla 5 mg/kg, derialtı ise 5,5 mg/kg dozda uygulanmaktadır (263, 264). Bu dozlarda uygulandığında *E.*

granulosus ve *E. multilocularis*'in genç ve erişkin formlarına oldukça etkilidir. Praziquantel gebe hayvanlarda güvenli bir şekilde kullanılabilir ve köpeklerde yüksek dozları dahi tolere edilebilir. Prepatent süre göz önüne alınarak 6-8 haftalık periyodlarla uygulanmalıdır. Yapılan çalışmalarda tek doz oral uygulamanın %100 etkili olduğu bildirilmiştir (264). Son yıllarda geliştirilen başka bir ilaç ise epsipirantel olup, praziquantele yapı olarak benzeyen bu ilaç köpeklere 5,5 mg/kg dozda kullanılmalıdır. Kedi ve köpeklerde iyi tolere edilir ve az miktarda emilir ve bundan dolayı sestodlara karşı direkt etkisinin olduğu bilinmektedir (265). Nitroskanat ve benzimidazol türevleri gibi ilaçlar da *E. granulosus*'a karşı etki göstermelerine karşın etki düzeyleri praziquantel ve epsipirantelin kadar değildir (264).

Arakonakların sağaltımında ise normalde nematodlara karşı kullanılan benzimidazol grubu ilaçların yüksek düzeyde etki ettiği belirtilmektedir. Benzimidazollerin etki dozlarının çok yüksek olması ve uzun süre uygulanması ekonomik anlamda işletmeleri zorlamaktadır. Bu yüzden çiftlik hayvanlarda rutin tedavi genellikle yapılmamaktadır. Cerrahi yöntemler ile tedavi veteriner hekimlikte ekonomik olmadığı için fazla tercih edilmemektedir (261).

3.6. Kistik Ekinokokkosis'de Koruma ve Kontrolü

Dünya'nın pekçok ülkesinde kontrol programlarının uygulanması sonucunda parazitin eradikasyonu ile ilgili başarılı sonuçlar alınmıştır. İzlanda, Yeni Zelanda, Tazmanya, Falkland Adaları ve Kıbrıs'da yapılan kist hidatik kontrol programları başarılı sonuçlar vermesine karşın Şili, Arjantin ve Uruguay'da ise uygulanan kontrol programlarının hepsinde başarı elde edilememiştir (266, 267).

Kistik ekinokokkosisin koruma ve kontrolünün sağlanması bazı stratejilere, üzerinde durulması gereken noktalara ve başlıklara bağlıdır. Bunların yanında en temel kural hijyenik faktörlere dikkat edilmesidir. Bu hijyenik kurallara kişisel ve toplumsal olarak uyulması ve alınacak önlemler ile hastalığın yaygınlığı da azaltılabilmektedir. Alınabilecek tedbirler şöyle sıralanabilmektedir:

Halkın sağlık açısından eğitimi, son konakların rutin olarak antihelmintik ilaçlar ile tedavisi ve takibi, sokak köpek popülasyonunun kontrolü, kesimhanelerin denetimi ve kasaplık hayvanların yetiştirildikleri ortamların düzenlenmesi (268). Hastalık genellikle verimsiz kırsal alanlardaki sürüler ile bu sürüleri gütmek ve korumak amacıyla bulunan köpekler ve bu köpekler ile birlikte yaşayan insanlarda görülmektedir (267). Endemik bölgelerde parazitin eradike edilmesine yönelik kontrol çalışmaları dört aşamaya ayrılmaktadır. Bunlar planlama, saldırı (Girişim), takviye (Güçlendirme) ve eradikasyonun devam ettirilmesi aşamalarıdır (269). Bu aşamalara bakıldığında planlama evresinde bir epidemiyolojik araştırma yapılarak endemik bölgelerde kontrol çalışmalarının yapılmasıdır. Girişim evresinde, risk altındaki tüm konakların kontrolünün sağlanmasıdır. Güçlendirme evresinde, riskli görülen bölgelere yasal düzenlemeler ile kontrol ve karantina tedbirleri alınır. Eradikasyon evresinde ise hayvan giriş çıkışları sınırlarda kontrol edilerek hijyen şartlarının artırılmasıdır (269).

Kistik ekinokokkosisden korunmak amacıyla atılan önemli adımlardan birisi de aşı geliştirme çalışmalarıdır. Avustralya ve Yeni Zelanda'da Taeniid sestodların larval formlarına karşı sığır ve koyunlarda onkosfer antijenlerinin kullanıldığı aşular geliştirilmiş durumdadır (270, 271). Başlangıçta kist sıvısı, kist membranları ve protoskoleksleri içeren antijenler kullanılmış fakat onkosfer

antijenlerinin daha yüksek seviyelerde koruma sağladığı belirtilmiştir. Onkosferden klonlanan Eg95 aşısının, immunitiyi en yüksek düzeyde uyardığı ve KE'ye karşı aşılama çalışmalarında başarı ile kullanılabileceği bildirilmiştir. Eg95 aşısının koyunlarda yüksek derecede koruma sağladığı ve uygulanan hayvanlarda kist sayısını yaklaşık olarak %90-100 oranında azalttığı ortaya konmuştur (272). Yaklaşık olarak %80 oranında yüksek derecede bir bağışıklığın reenfeksiyon oluşmadığı takdirde 6 ay boyunca devam ettiği ve kuzulamadan önce aşılanmış gebe koyunlarda yüksek antikör seviyelerinin kolostrum yoluyla yavrulara geçtiği bildirilmiştir (273).

3.7. *Echinococcus* Türlerinin Tanımlanmasında ve Teşhisinde Kullanılan Moleküler ve Serolojik Yöntemler

3.7.1. Moleküler Yöntemler

3.7.1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Parazitin tür ve suş tanısında kullanılan yöntemlerden biri olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), izole edilen hedef genetik materyallerin (DNA, RNA), oligonükleotid primerler kullanılarak deoksiribonükleotit trifosfat (dNTP) ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri (Taq) yardımıyla enzimatik olarak çoğaltılmasına dayanan bir metoddur. Reaksiyon başlıca denatürasyon, (DNA'nın çift sarmal yapısının ayrılıp tek iplikçik hale gelmesi) primerlerin bağlanması (annealing) ve amplifikasyon (extension) olmak üzere üç aşamada gerçekleşmektedir. PZR'nin üç aşamadan oluşan ilk çoğaltma aşamasının, 30-35 kez tekrarlanması sonucunda, hedef DNA'nın 2^{30} kopyası elde edilmektedir. Çoğaltma aşamasından sonra elde

edilen ürünler, agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılıp, ethidium bromide ile boyanarak görünür hale getirilmektedir (274).

3.7.1.2. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Restriction fragment length polymorphism (RFLP), DNA'nın belirli bir gen bölgesinin restriksiyon enzimleri (RE) aracılığı ile kesilmesi ve kesilmiş olan bu DNA'nın agaroz jel elektroforezinde yürütülüp jelde oluşan bandların yer, sayı ve büyüklüklerine göre karşılaştırılıp yorumlanmasına dayanan bir yöntemdir. Restriksiyon enzimlerinin mantığı çift sarmal yapıdaki DNA'nın her iki sarmalında kesilme özelliğine sahip olması ve DNA'nın belli bölgelerinden kesim yaparak bir genin veya gene sahip DNA segmentinin çıkarılmasıdır (275, 276).

3.7.1.3. Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

Hem PZR hem de RFLP'nin içinde bulunduğu bu yöntem ile genomik DNA'nın spesifik bir bölgesi bu bölgeye özgü primerler ile çoğaltılmaktadır. Takiben PZR ürünleri bir veya daha fazla sayıda restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmektedir. Daha sonra ürünler agaroz jel elektroforezinde yürütülüp ultraviyole ışığı altında görüntülenir. PCR-RFLP yönteminin *Echinococcus* spp.'nin suş ve türlerinin belirlenmesinde etkili bir metod olduğu bildirilmektedir (275, 276).

3.7.1.4. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR)

Arbitrary primed PCR (AP-PCR) veya RAPD olarak da isimlendirilen Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PZR), genomun belli bir bölgesinin PZR ile çoğaltılmasının aksine genellikle tekli halde olan rastgele primerler kullanılarak DNA'nın isteğe bağlı herhangi bir bölgesinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Diğer DNA tekniklerine göre RAPD-PZR'nın avantajı, hız ve basitliktir. Bunun yanında yöntem, az miktarlardaki genomik DNA'yı bile çoğaltabilme yeteneği olan ve DNA dizi bilgisi gerektirmeksizin basit bir yaklaşım ile tüm genomu tarayabilme fırsatı sunmaktadır (277).

3.7.1.5. PCR-Single Stranded Conformation Polimorphism (PZR-SSCP)

Single Stranded Conformation Polimorphism (SSCP); sekans farklılığı gösteren tek sarmal yapısındaki genomik DNA'ların tanımlanmasında kullanılan basit, hassas ve başarılı bir yöntemdir. Sekans farklılıklarının belirlenmesinde kullanılan diğer yöntemlerin aksine oldukça avantajlı bir yöntemdir. PZR-RFLP veya RAPD-PZR teknikleri DNA dizilerinin sayı ve büyüklüklerine göre agaroz jelde ayrımı esasına dayanan analizler olmalarına rağmen aynı büyüklükte olan ancak sekans çeşitliliği gösteren diziler agaroz jel elektroforezinde birlikte yürüyüp belki de yanlışlıkla tek bir sekans olarak düşünülecektir. SSCP analizinde ise böyle bir durum söz konusu değildir. Çünkü bu yöntemin temel esası tek sarmallı DNA'nın şekil ve büyüklüğüne bağlı olarak, uygun büyüklükteki bir dizideki tek bir nükleotid farklılığını dahi tanımlamaya olanak sağlamaktadır (276, 278, 279).

3.7.1.6. DNA Baz Dizi Analizi (Sequencing)

Yöntemin dayanağı DNA iplikçığının dizisini tanımlayarak komplementlerinin sentezlenmesidir. Sentezlenen DNA iplikçığıne dNTP ilave edildiğinde uzama sürerken ddNTP ilave edildiğinde uzama durmaktadır. Gelişen teknolojik sistemlerin genelinde reaksiyon başlangıç safhasında floresans veren madde ile işaretli primer veya nükleotidler kullanılarak baz dizilimi gösterilmektedir. Bu metod ile her iki DNA zincirinin dizi analizi yapılarak, artefakt ve farklı olarak başka faktörler ile alakalı hatalar minimize edilmelidir (275, 277, 280).

3.7.2. Serolojik Yöntemler

3.7.2.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Enzim ile işaretli antiglobulinin antijen-antikor kompleksine ilave edilip ardından da substrat konulması sonucu renk değişiminin oluşup oluşmamasını temel alan bir yöntem olan ELISA, Enzyme Immun Assay (EIA) olarak da isimlendirilmektedir. Renk oluşumu enzim aktivasyonuna bağlı olup, enzim ile etkilenen substratın spektrofotometrik değeri (optik dansite: OD) antijen-antikor kompleksi ile orantılıdır (281, 282).

ELISA işleminde polistren pleytlere emdirilmiş antijen molekülleri ve anti-immünglobulin eklenmiş enzimin bulunduğu ortama şüpheli serum eklenir. Eğer şüpheli serumda antikor bulunuyorsa antijen-antikor-antiimmünglobulin kompleksi oluşur ve enzim substrat ile birleşir. Test sonucu spektrofotometre ile değerlendirildiği zaman kriter olarak absorbans ölçümleri esas alınır ve cut-off denilen eşik değerinin üstü pozitif olarak kabul edilir. KE'nin teşhisinde kullanılan

yöntemlerden biri olan ELISA yöntemi, yüksek duyarlılık gösterip, çok az miktar seruma gereksinim duyulması, kesin kantitatif sonuca imkan vermesi ve kısa sürede çok fazla sayıda örneğin işlenmesine imkan sağlaması açısından rutin kullanıma uygun, duyarlı, özgül ve ekonomik bir teşhis yöntemidir (283).

Parazitolojik açıdan teşhiste ise ELISA yöntemi şüpheli örneklerde antikor ya da antijen aramak amacıyla kullanılmaktadır. Parazite özgü antikor aramak iki yolla olmaktadır. İlki katı ortamda sandviç yöntemi ikincisi ise sandviç inhibisyon yöntemidir. Diğer taraftan şüpheli materyalde parazit antijeni aranacak ise direkt ELISA tek basamaklı sandviç yöntemi, indirekt ELISA, kompetatif ELISA ve dot-ELISA yöntemleri kullanılmaktadır (281).

3.7.2.2. Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Bu yöntemin temel prensibi, protein karışımlarının poliakrilamid jeldeki analizine dayanmakta olup, mikrogramla ifade edilecek bir hassasiyete sahiptir. Bilinen elektroforetik metodlar içerisinde çok farklı jel sistemleri bulunmasına rağmen SDS-PAGE bunların en yaygın kullanılanlarından biridir. Çok sayıda protein karışımlarının analizine imkan sağlaması bu yöntemin en önemli avantajlarından birisidir (284).

Proteinlerin analizi için en sık kullanılan yöntem SDS-PAGE'dir. Elektroforez, elektrik yüklü bir alanda iyonların göç olayıdır. Proteinlerin elektroforezinde proteinlerin şekli, moleküler kütlesi, ortamın pH'sı gibi özellikler nedeniyle farklı proteinler farklı göç hızı göstererek birbirlerinden ayrı noktalara göç ederler. Bu işlemde, proteinler SDS ile reaksiyona girerek negatif yüklü

kompleksler oluştururlar. Protein tarafından bağlanan SDS miktarı ve dolayısıyla kompleks üzerindeki yük, protein büyüklüğü ile doğru orantılıdır. Proteinler SDS'e bağlanmaktan ötürü denatüre olurlar ve çözünürlük kazanarak Şekillerini değiştirirler. Böylece proteinler negatif yüklenmiş kompleksler olarak büyüklüklerindeki farklılığa dayanarak polyakrilamid jelin matriksinde elektroforez ile ayrışırlar. Bu teknik, protein separasyonunun yanında moleküler ağırlığı bilinen standart proteinlerle bağlantılı olarak elektroforetik değişikliklerin kıyaslanması ile bilinmeyen proteinlerin moleküler ağırlığını teşhis etmekte oldukça geniş bir Şekilde kullanılan gcl bir yöntemdir (285).

Bu yöntemin aşağıdaki amaçlar için kullanılmakta olduğu bildirilmektedir (284) :

- 1) Proteinin saf olup olmadığının belirlenmesi,
- 2) Proteinin moleküler ağırlığının belirlenmesi,
- 3) Proteinin konsantrasyonunun doğrulanması,
- 4) Protein bileşiklerinin tanısı,
- 5) Protein modifikasyonunun belirlenmesi,
- 6) Antikor retimi için protein antijenlerinin konsantrasyonu ve separasyonunun yapılması,
- 7) Radyoaktif olarak işaretlenmiş proteinlerin separasyonu,
- 8) Western blot'ın birinci safhasını oluşturmasıdır.

3.7.2.3. Western Blot (Immunoblot)

Ayrıştırılan proteinlerin jelden membrana transferi Western blot veya immunoblot olarak adlandırılır ve bu yöntem bir membran üzerine sabitleştirilmiş proteinleri tanımlamak ve bunların daha sonra immunolojik yöntemlerle

görüntülenmesini sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Çünkü elektroforez ile jel içinde ayrıştırılan proteinlerin transfer edildikleri nitrosellüloz membran üzerindeki band örnekleri, orijinal jel üzerindeki örneklerin tam olarak kopyasıdır. İmmunoblot iki aşamada gerçekleştirilmektedir. Bunlardan birincisi proteinin jelden nitrosellüloz membrana transfer edilmesi, diğeri de spesifik antikor ile proteinin gösterilmesidir. İmmunoblot için en fazla kullanılan membran nitrosellülozdur. Por genişliği 0.45 µm olan nitrosellüloz yaygın olarak kullanılmakla birlikte, çok düşük moleküler ağırlıktaki polipeptidlerin bağlanmadan geçmesi nedeniyle böylesi düşük moleküler ağırlıklı proteinlerin transferinde 0.1 µm çaplı membranlar önerilmektedir. Proteinlerin membrana fikse edilmesinin bir diğeri avantajı da yıkama ve inkubasyon safhalarında yıkanıp gitmesini önlemektir (284, 285).

3.8. Echinococcus Cinsinin Sınıflandırılması

Echinococcus cinsinin sınıflandırılması kapsamlı bir şekilde gözden geçirildiğinde uzun bir geçmişe sahip olduğu görülmektedir. Günümüze kadar birçok tür tanımlanmış ve birçoğu da taksonomik gerekçelerle geçersiz kılınmıştır. (286). *Echinococcus* cinsinin sınıflandırması uzun zamandan beri hem erişkin hem de larval safhaların morfolojik tanısal karakterlerinin yetersizliğinden dolayı tartışmaya açıktır. Bu alanda özellikle moleküler anlamdaki çalışmalar gün geçtikçe hızını artırarak devam etmekte olup yeni tür ve suşlar bulunup farklı fikirler değerlendirilmektedir. Günümüzde ise *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* ve *E. vogeli* olmak üzere kabul gören dört tür bulunmakta *E. shiquicus*, *E. granulosus sensu stricto* (G1-3), *E. equinus* (G4), *E. ortleppi* (G5), *E. canadensis*

(G6/7), *E. canadensis* (G8/10) ve *E. felidis*'in de yeni sınıflandırmada yer aldığı görülmektedir (287-289).

3.9. Suşlar

Echinococcus cinsinin larva ve erişkinlerinin tür ayrımı, birtakım morfolojik, biyolojik ve epidemiyolojik kriterlere göre yapılmaktadır. Ancak suş ayrımı daha kompleks birçok parametrenin birlikte değerlendirilmesiyle yapılmaktadır (290). Morfolojik ve biyolojik çalışmalar suş tespitinde önemli veriler sağlamasına rağmen, bunların genetik düzeydeki farklılığı tam olarak yansıtmayacağı unutulmamalıdır. Halbuki, moleküler teknikler parazit genomunun direkt analizini sağlarken, konak ve çevre ile ilgili faktörlerden etkilenmemektedir (290). *Echinococcus* cinsine ait farklı suşların tanımlanması KE'nin epidemiyoloji ve kontrolü açısından oldukça önemlidir.

Suş; bir veya daha fazla sayıda özelliği bakımından birbirinden ayırt edilebilen tür toplulukları, morfolojik ve biyolojik özellik olarak farklılık gösteren lokal popülasyonlar ve değişik konak türleri ile sınırlı tür içi çeşitlilikler olarak ifade edilmiştir. Fakat *Echinococcus* türleri için en bilinen suş tanımı aynı türün diğer gruplarından gen frekansları yönünden istatistiksel olarak farklılık gösteren çeşitlilikleri şeklinde yapılabilir. Gen frekanslarındaki farklılıklar nedeniyle suşlar arasında sınırlı da olsa bir gen akışı bulunmaktadır. Sınırlı dahi olsa bu gen akışı, suşların tespitinde pratik öneme sahip olan özelliklerdeki farklılıkların ortaya konulmasında bir belirteçtir. Burada önemli olan enfeksiyonun epidemiyoloji ve kontrolünde öneme sahip bir veya daha fazla özellik bakımından farklılığın bulunup bulunmamasıdır (291, 292).

Echinococcus cinsi, içerisindeki tür içi değişiklikler nükleik asit dizilerindeki değişikliklerden kaynaklanmakta ve kendisini, parazitin hayat döngüsü, konak spesifitesini, gelişme hızını, patojenitesini, antijenite ve ilaçlara duyarlılığını, bulaşma şekillerini, hastalığın epidemiyoloji ve kontrol yöntemlerini etkileyen fenotipik özellikler olarak göstermektedir. Bu nedenle endemik bir bölgedeki baskın suş ve/veya suşların ortaya konması parazitin kontrolü ve olası eradikasyonu açısından oldukça önemlidir (290).

3.10. *Echinococcus granulosus*'un Suşları

1990'lı yıllarda, çeşitli moleküler düzeydeki çalışmalar özellikle mitokondriyal sitokrom c oksidaz subunit1 (mt-CO1) DNA dizilerinin *Echinococcus* izolatlarına uygulanması ile *Echinococcus* türlerinin moleküler düzeydeki sınıflandırılması, genetiği, epidemiyolojisi ve fenotipik varyasyonu ile ilgili birçok bilgi elde edilmiştir. Bowles ve ark. (293), *Echinococcus* türlerini tanımlamak için gerçekleştirdikleri bir çalışmada, mt-DNA'nın haploid özellik göstermesi sebebiyle daha net bir şekilde tanımlanabilmesi, evrim hızının nükleer DNA'ya göre 10-20 kat daha fazla olması, homoplazmik oluşu, rekombinasyon özellik göstermemesi gibi avantajları nedeniyle mt-CO1 gen bölgesini seçtiklerini bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalar ışığında, *E. granulosus* içerisinde on farklı suşun (G1-G10) bulunduğu, suş içi genetik varyasyonların olabileceği ve bu farklılıkların bazı suşların tür olarak adlandırılması gerektiğini ortaya koymaktadır (294). *Echinococcus granulosus*'un türleri içerisindeki genetik varyasyonları barındırması ile 10 farklı suş tespit edilmiştir. Bunlar;

- G1=Yaygın koyun suşu

- G2= Tazmanya koyun suşu
- G3= Manda suşu
- G4= At suşu
- G5= Sığır suşu
- G6= Deve suşu
- G7= Domuz suşu
- G8= Amerikan Geyik suşu
- G9= İnsan-domuz suşu
- G10= Fenoskandian geyik suşu

olarak belirtilmiştir (292, 295-297). Bu genotipler KE'nin epidemiyolojisi düşünüldüğünde moleküler sınıflandırma için standart olarak kullanılırlar. Yalnız yukarıdaki genotiplerden G9 genotipinin statüsü hala belirsizliğini korumaktadır (298).

Suş içi genetik farklılaşmadan dolayı son yapılan taksonomik çalışmalarda *E. granulosus* türü içerisinde birbirinden farklı dört türün bulunduğu ortaya konulmuştur. G1-G3 grubunun artık *E. granulosus sensu stricto* ismi altında birleştiği, G4 olarak bilinen at suşunun *E. equinus*, G5 olan sığır suşunun *E. ortleppi*, G6-G10 aralığında bulunan suşların ise *E. canadensis* ismiyle tek bir tür adı altında birleştirildiği rapor edilmektedir (101, 295, 298). Aslan suşu olarak bilinen *E. felidis*, *E. granulosus*'un kardeş sınıfı olarak değerlendirilmiştir (287). Benzer periyodlarda Tibet'te bulunan *E. shiquicus*, Xiao (287) tarafından *E. multilocularis*'in kardeş türü olarak tanımlanmıştır (287). Son zamanlarda ise, *E.*

granulosus sensu stricto, *E. ortleppi* ve *E. canadensis* türleri arasında meydana gelen genetik bilgi akışının olasılığı üzerinde durulmaktadır (298).

Echinococcus granulosus'un Dünya'daki genotip dağılımları Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7: *Echinococcus granulosus* genotiplerinin Dünya'daki yayılımı (298)

Türler	Yaygınlık	Sonkonak	Arakonak	İnsan enfeksiyonu
<i>E. granulosus sensu stricto</i> (G1-G3)	Dünya çapında	Köpek	Koyun, keçi, sığır	Yaygın
<i>E. felidis</i>	Afrika	Aslan	Bilinmiyor	Bilinmiyor
<i>E. equinus</i> (G4)	Sporadik	Köpek	At, eşek, katır, zebra	Bilinmiyor
<i>E. ortleppi</i> (G5)	Sporadik	Köpek	Sığır	Yaygın değil
<i>E. canadensis</i> (G6/G7)	Sporadik	Köpek	Domuz, deve, sığır, koyun, keçi	Yaygın değil
<i>E. canadensis</i> (G8)	Kuzey kutup bölgesi	Kurt	Geyik	Yaygın değil
<i>E. canadensis</i> (G10)	Kuzey kutup bölgesi	Kurt ve köpek	Geyik ve Ren geyiği	Yaygın değil

3.10.1. *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1-G3)

Bu tür ilk kez 1992 yılında Bowles ve ark. (293) tarafından yapılan moleküler çalışmalarda mt-CO1 ve NADH1 genlerinin dizi analizleri sonucunda tanımlanmıştır. Geçmiş yıllarda yapılan sınıflandırmalar göz önüne alındığında, bu türün birçok eş anlamlısı bulunmaktaydı. Önceleri G1, G2, G3 genotipleri olarak değerlendirilirken, günümüzde *E. granulosus sensu stricto* adı altında tek tür olarak kabul görmektedir. *Echinococcus granulosus* şu anda kriptik bir tür kompleksi olarak görülmektedir. *Echinococcus granulosus sensu stricto*, *E. granulosus*'un eski sınıflandırmalarda mevcut bulunan koyun suşuna tekabül eden yeni bir tür olarak da tanımlanmaktadır (298).

Günümüzde yapılan moleküler çalışmalar, mt-DNA sekans analizleri bu üç genotipin birbirine çok benzer olduğunu, sekans uyumsuzluklarının oldukça düşük olduğunu, bunun için tam ayrımının yapılamadığını ve çok sayıda haplotipin olduğunu göstermiştir (298, 299). Bu türün Ortadoğu'dan kaynaklanıp diğer bölgelere yayıldığı ve ara konağının koyun olmasına rağmen pek çok çiftlik hayvanı türünde (keçi, sığır, buffalo, deve, domuz, at, eşek, katır, tibet sığırı) ve otobur vahşi hayvan türlerinde bulunduğu ifade edilmektedir (300). Dünya'nın birçok bölgesinde sığırlarda G1 genotipi bulunmuştur, fakat kistleri steril olduğu için enfeksiyonu bulaştırma oranının düşük olduğu bildirilmiştir (269).

3.10.2. *Echinococcus equinus* (G4)

Echinococcus granulosus'un at suşu olarak bilinen bu türle ilgili ilk ve en kapsamlı çalışma Williams ve Sweatman (301) tarafından 1963 yılında yapılmıştır. Bu çalışma, at suşunun diğer suşlardan gerek morfolojik gerekse biyolojik anlamda

farklılıklarını ortaya koymuştur. Bu çalışma ile at suşunun morfolojisi, biyolojisi, fizyolojisi, biyokimyası, metabolizması, moleküler biyolojisi, konak spesifitesi ve epidemiyolojisi kapsamlı bir şekilde araştırılıp incelenmiş ve diğer suşlarla karşılaştırılmıştır (301). Önceden *E. granulosus equinus* alttürü olarak tanımlanan bu suş (G4), son yıllarda yapılan moleküler çalışmalar sonucunda tür bazında *E. equinus* olarak isimlendirilmiştir (292). Bu tür Avrupa, Orta Doğu, Güney Afrika, Yeni Zelanda ve Amerika'da görülmektedir. Yegane sonkonağı köpekler olup, kırmızı tilkilerin de biyolojik çemberdeki rollerinin olduğu kesin olmamakla birlikte söylenmektedir. Bu suşun arakonağı sınırlı olup, sadece at ve diğer tek tırnaklıların arakonak olduğu görülmektedir. Kistler daha çok karaciğere yerleşmekle beraber akciğer ve diğer iç organlarda da görülebilmektedir (291, 292, 294).

3.10.3. *Echinococcus ortleppi* (G5)

Echinococcus ortleppi, 1934 yılında Ortlepp tarafından Güney Afrika'daki köpek örneklerinin tanımlanması ile bulunmuştur. Daha sonrasında Lopez-Neyra ve Soler Planas tarafından 1943 yılında bu çalışma esas alınarak yeniden değerlendirilmiştir. Rausch ve Nelson ise 1963'de *E. granulosus*'un eş değeri olarak gördüğü *E. ortleppi* üzerinde durmuştur. Verster 1965 yılında ise gerek orijinal materyaller kullanılarak gerekse deneysel enfeksiyon oluşturularak yapılan çalışmalar sonucunda kapsamlı bir morfolojik tanımlama ile bu parazite *E. granulosus ortleppi* ismi verilmiştir (298). İlerleyen zaman dilimlerinde *E. granulosus*'un alt türleri *E. g. ortleppi* de dahil geçersiz kılınınca Dünya çapında *E. granulosus*'un sığır suşu olarak adlandırılmaya başlanmıştır. İsviçre'deki deneysel

çalışmada, bu suşun morfolojik farklılıklarının yanı sıra biyolojik ve biyokimyasal açıdan da diğer suşlara nazaran belirgin farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Daha çok akciğere yerleşip fertil kist karakteri göstermektedir. Geniş bir coğrafik yayılıma sahip olan *E. ortleppi* (G5), Nepal, İsviçre, Hollanda, Brezilya ve Hindistan'da bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile epidemiyolojik yönlerin yanısıra morfolojik ve mt-DNA sekans analizleri sonucunda G5 suşu, *E. ortleppi* adıyla farklı bir tür olarak isimlendirilmiştir (291, 298).

3.10.4. *Echinococcus canadensis* (G6-G10)

Filogenetik ve moleküler çalışmalardan elde edilen veriler, günümüze kadar G6-G10 suşlarının çeşitli varyantları ve farklı ara konakları olmasına rağmen birbirinden net olarak ayırt edilemediklerini göstermiştir. Gelişim evreleri ve morfolojileri açısından birbirinden farklı olan G6 ve G7 suşlarının mt-CO1 sekans analizleri karşılaştırıldığında birbirine yüksek oranda benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. Yapılan son çalışmalarda örneklerin spesifik genotiplere ayrıştırılmadığı, bu yüzden G6/G7 suşu olarak adlandırıldığı belirtilmiştir (298). Oysa Arjantin'de G6 genotipi ile enfekte keçilerden elde edilen izolatların mt-CO1 gen dizi analizlerinde hepsinde G6 genotipi, domuzların hepsinde ise G7 genotipi tespit edilmiştir. Bu iki genotipin simpatrik türleşme ile oluşup oluşmadığı hala açık değildir. Orta ve Doğu Avrupa'da G7 suşu için domuzlar ara konak olarak bildirilmiştir (300). G8 genotipi ABD'de geyiklerde, G10 genotipi ise Finlandiya ve İsviçre'de geyiklerde G8 genotipine benzemekle birlikte farklılıkları olan ayrı bir suş olarak tanımlanmıştır (298). Konak farklılıkları ve coğrafik dağılıma bakıldığında G6 ve G7 genotiplerinin farklı bir tür olarak ayrılması ve *E.*

intermedius adını alması önerilmiştir (140). Fakat mitokondriyal gen dizi analizlerine göre, G10 genotipi G6/7 genotipine G8'den daha fazla benzerlik göstermektedir. G8'in G6/7/10 suşundan farklı bir suş olarak düşünülebileceği de bildirilmiştir (298). Yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda geyik suşu (G8), Fennoscandian geyik suşu (G10), deve suşu (G6) ve domuz suşu (G7) oldukça yakın bir ilişkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Bundan ötürü G9 genotipi ile birlikte bu beş genotipin (G6-G10) bir grup olarak düşünülmesi ortaya konmuş ve sınıflandırmada *E. canadensis* içerisinde yer almıştır (101, 298).

3.10.5. *Echinococcus felidis* (Aslan suşu)

Afrika'daki aslanlarda görülen bu suş, önceleri *E. granulosus*'un alt türü *E. granulosus felidis* olarak isimlendirilmiştir. Doğu Afrika'da *E. granulosus*'un son konağı av köpeği, sırtlan ve çakallarda saptanmış, metasesodlar bazı vahşi tırnaklılarda da bulunmuştur. Bu durum yaşam döngüsünün vahşi hayvanlar arasında bağımsız olarak devam ettiğinin kanıtı olmasına rağmen bazen evcil hayvanlarla da ilişki görülebilmektedir. Kedigiller genellikle *E. granulosus*'a duyarlı olmamakla birlikte, bu suş Güney Afrika'da vahşi kedilerde rastlanmıştır (292). Genetik analizler için materyal azlığından dolayı bir genotip olarak G-isimlendirme sisteminde yoktur. Uganda aslanlarından elde edilen ve Güney Afrika'da saklanan erişkinlerle yapılan moleküler çalışmalarda aslanların son konak olduğu saptanmıştır. Uganda'da bir Afrika domuzunda saptandığı bilgisi dışında ara konakları ile ilgili kesin bir bilgi bulunmamaktadır (302-304). İnsanda ve çiftlik hayvanlarında hastalık oluşturduğuna dair bir bildirim de yapılmamıştır.

Aslan suşunun mitokondriyal genomunun *E. granulosus* s.s. suşu ile oldukça benzer olduğu için G1-G3 suşuna ait olabileceği de önerilmiştir (298).

3.11. Türkiye’de Yapılan Genotiplendirme Çalışmaları

Türkiye’de *E. granulosus*’un genotiplerini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda; 2008 yılında Erzurum, Elazığ, Malatya ve Diyarbakır illerinden elde edilen 19 sığır, 179 koyun, 7 keçi, 1 deve, 1 insan orjinli kistler ile bir köpekten elde edilen erişkin *E. granulosus* örneklerinin tanımlanması için ribozomal ITS-1 gen bölgesinin PZR-RFLP analizi ve mt-CO1 sekans analizi kullanılmış, sadece yaygın koyun suşu (G1) belirlenmiştir (305). 2009 yılında ölü bulunan bir yaban koyununa (*Ovis gmelinii anatolica*) nekropsi yapılmış, bu hayvana ait hidatik kist materyali Türkiye’de ilk kez mt-CO1 sekans analizi ile incelenmiş ve bunun da yaygın koyun suşu (G1) olduğu saptanmıştır (306). İzmir ve Manisa illerindeki mezbahalardan toplanan 12 koyun ve ameliyat materyali alınan 10 insan izolatu üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise bu izolatlara mt-CO1, atp6, nad1,rrnS sekans analizleri yapılmış ve Türkiye’de ilk kez domuz suşu (G7) saptanmıştır (307). Türkiye’nin farklı illerinden elde edilen 100 koyun ve 12 sığır izolatu mt-CO1 gen bölgesi DNA dizi analiziyle incelenmiş ve 98 koyun ile 9 sığır izolatu G1 2 koyun ve 3 sığır izolatu da G3 suşu olarak belirlenmiştir (308). Erzurum ilinden 2010 yılında elde edilen 220 sığır hidatik kist materyalinde yapılan bir çalışmada 12S rRNA gen bölgesi PZR ile çoğaltılmış ve şüpheli örneklerin mt-CO1 bölgesi sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Neticede 12S rRNA gen bölgesi analizine göre 147 örneğin G1-G3 complex (*E. granulosus sensu stricto*) olduğu, bunların 28’inin DNA dizi analiziyle G1 olduğu teyid edilmiştir. Kalan 73 örneğin 7’sinde ise DNA

dizi analiziyle G3 suşu belirlenmiştir (251). Diğer bir çalışmada ise 39 koyun izolatından elde edilen protoskolekslerde *E. granulosus* actin genleri analiz edilmiş ve *EgactI* geninin *EgactII* geninden daha polimorfik olduğu tespit edilerek *EgactI* geninin üç alleli tanımlanmıştır. Bütün örneklerde parsiyal *EgactI* geninin 6. pozisyonunda nükleotid değişikliği saptanmış ve bu Anadolu haplotipi olarak adlandırılmıştır (309). Öte yandan, Erzurum ve Elazığ illerinden elde edilen 31 koyun ve 23 sığır izolatı PZR-SSCP metoduyla genotiplendirilmiş ve örneklerin hepsi *E. granulosus sensu stricto* (G1-G3) olarak tanımlanmıştır. Takiben DNA dizi analiziyle G1 ve G3 suşları birbirinden ayrılabilmiş, SSCP analizinin G5 ve G7 suşları için farklı band profilleri verdiği belirlenmiştir (310). Histolojik olarak KE olduğu teyit edilmiş 70 hastaya ait parafinli bloklardan yapılan kesitlerden DNA izolasyonu yapıp 12S rRNA geninin direkt PZR'si ve mt-CO1 geninin dizi analiziyle genotiplendirme yapılmıştır. Araştırmacılar (311), 12S rRNA geninin direkt PZR'si ile 70 örneğin 26'sında *E. granulosus sensu stricto* (G1-G3) belirlemişlerdir. Kalan 44 örneğin mt-CO1 gen bölgesinin DNA dizi analizi neticesinde bir örnekte G3 ve iki örnekte de G6 suşunu belirlemişlerdir (311). Başka bir çalışmada 2013 yılında bir at hidatik kist materyalinde mt-CO1 geninin dizi analizi yapılmış ve at izolatında *E. granulosus sensu stricto* (G1-G3) belirlenmiştir (312). Yine bir dağ keçisinde akciğerinde hidatik kist belirlenmiş ve bu materyalin DNA ekstraksiyonunun ardından PZR'si yapılarak mt-CO1 gen bölgesi sekanslanmış ve yaygın koyun suşu (G1) ortaya konmuştur (313). Kırıkkale ilinde 24 koyunda hidatik kist örneklerinin moleküler karakterizasyonunu belirlemek amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada ise RAPD-PZR ile koyun izolatlarına bakılmış ve hepsi G1 suşu olarak belirlenmiştir (314). Kırıkkale'de yapılan bir

başka çalışmada ise 20 sığır hidatik kist örneği mt-CO1 geni PZR ile çoğaltılmış ve sekans analizi yapılmıştır. Sonuçlara göre 20 sığır izolatının hepsinde *E. granulosus sensu stricto* (G1-G3) belirlenmiştir (315). İstanbul'da hidatik kistli 46 insan izolatında genotipik karakterizasyon amacıyla yapılan bir çalışmada ise mt-CO1 gen bölgesinin dizi analizi yapılmış ve tüm izolatlarda yaygın koyun suşu (G1) bulunmuştur (316). Karadeniz bölgesinde yapılan bir çalışmada ise mandalarda KE'nin moleküler karakterizasyonu ve prevalansı üzerinde durulmuştur. Çalışmada 9 manda izolatu incelenmiş ve bu izolatların 6'sında yaygın koyun suşu (G1), diğer 3 izolatta ise *E. granulosus sensu stricto* (G1-G3) belirlenmiştir (225). Trakya bölgesinde 42 insan, 13 sığır ve 3 koyun izolatında yapılan çalışmada PZR-RFLP ve PZR-SSCP metotları kullanılarak ITS-1 ve NAD1 gen bölgeleri kullanılarak sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda koyun ve sığır izolatlarının tümünde yaygın koyun suşu (G1), insan izolatlarında ise G1 ve G7 suşları belirlenmiştir. Bu rapor, bölgedeki ilk G7 suş bildirimidir (317). Kilis ilinde 19 koyundan elde edilen 28 hidatik kist izolatının hepsi *E. granulosus sensu stricto* (G1-G3) olarak belirlenmiştir (318). Manisa ilindeki sığırlarda yapılan başka bir çalışmada ise 2010-2012 yılları arası toplanan toplam 18 sığır izolatının hepsinin *E. granulosus sensu stricto* (G1-G3) olduğu tespit edilmiştir (319). Elazığ'da yapılan bir çalışmada bir katırın karaciğerinden alınan hidatik kist materyalinin moleküler karakterizasyonu yapılmış ve G4 suşu belirlenmiştir. Bu çalışma Türkiye'de katırlardaki G4 suşunun ilk raporudur (320).

Türkiye'nin farklı illerinden bildirilen *Echinococcus granulosus* suş/türleri ve yapılan genotiplendirme çalışmaları Tablo 8 ve Şekil 1'de gösterilmiştir.

Tablo 8: Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden bildirilen *Echinococcus granulosus* suşları

Şehir	İzolat (Sayı)	Hedeflenen gen bölgesi/Metot	Suş (Genotip)	Kaynak
Elazığ, Erzurum, Malatya, Diyarbakır, Van, Şanlıurfa	Koyun (179), Sığır (19), Keçi (7), Deve (1), Köpek (1), İnsan (1)	PCR-RFLP, mt-CO1 sekans analizi	G1	305
Malatya	Yaban koyunu (1)	mt-CO1 sekans analizi	G1	306
İzmir, Manisa	Koyun (12), İnsan (10)	atp6, nad1, rrnS, mt-CO1 sekans analizi	G1, G7	307
Türkiye'nin farklı illeri	Koyun (100), Sığır (12)	mt-CO1 sekans analizi	G1, G3	308
Erzurum	Sığır (220)	12S rRNA-PZR, mt-CO1 sekans analizi	G1-G3	251
Konya	Koyun (39)	Actin-PZR	G1 (Anadolu haplotipi)	309
Elazığ, Erzurum	Koyun (31), Sığır (23)	CO1-PZR SSCP	G1-G3	310
Elazığ	İnsan (70)	12S rRNA-PZR, mt-CO1 sekans analizi	G1-G3, G6	311
Ankara	At (1)	12S rRNA-PZR, mt-CO1 sekans analizi	G1-G3	312
Antalya	Dağ keçisi (1)	12S rRNA-PZR, mt-CO1 sekans analizi	G1	313
Kırıkkale	Koyun (24)	RAPD-PZR	G1	314
Kırıkkale	Sığır (20)	12S rRNA-PZR, mt-CO1 sekans analizi	G1-G3	315
İstanbul	İnsan (46)	mt-CO1 sekans analizi	G1	316
Karadeniz bölgesi	Manda (9)	PZR, mt-CO1 sekans analizi	G1-G3	225
Trakya	İnsan (42), Sığır (13), Koyun (3)	PZR-RFLP, PZR-SSCP, mt-CO1 sekans analizi	Koyun (G1) İnsan (G1,G7)	317
Kilis	Koyun (19)	12S rRNA-PZR, rrnS, mt-CO1 sekans analizi	G1-G3	318
Manisa	Sığır (18)	mt-NAD1 mt-CO1 sekans analizi	G1-G3	319
Elazığ	Katır (1)	12S rRNA-PZR, mt-CO1 sekans analizi	G4	320
Elazığ	Koyun (4), Sığır (4)	12S rRNA-PZR, mt-CO1 sekans analizi	G3	321
Elazığ	Koyun (3), Sığır (1)	12S rRNA-PZR, mt-CO1 sekans analizi	G1, G3	322
Elazığ	Koyun(31), Sığır (38)	12S rRNA-PZR, nad1, mt-CO1 sekans analizi	E.g.s.s. (G1)	323

3.12. Kistik Ekinokokkozis’de İmmünite, Antijenik Yapı, Hidatik Antijenler ve Antijen B

Echinococcus granulosus, konakta humoral ve hücreyel olmak üzere iki tip immünolojik cevaba sebep olmaktadır (324). *Echinococcus granulosus* ile enfekte konakların kan serumlarında IgG, IgM, IgA ve IgE antikorları mevcut durumdadır. Fakat bu antikorların ne kadar zaman içerisinde ne kadar süre ile kaldığı hakkında geçmişte çok belirgin bilgiler olmamasına rağmen son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar ışığında mekanizmalar daha açık ve anlaşılır bir hal kazanmıştır (324).

İnsan ve hayvanlarda *E. granulosus* enfeksiyonlarında meydana gelen immün yanıtın tipi, patojenite ve immün mekanizmaların durumuna göre farklılık göstermektedir. İmmün mekanizma ve patolojik değişiklikleri etkileyen unsurlar; kistlerin lokalizasyonu, büyüklüğü, enfeksiyon gelişim hızı, genetik faktörler ve T hücre şekilleri olarak tanımlanabilmektedir. Etkili bir immün yanıt parazitin ölümüne neden olabilirken, yetersiz immün yanıt durumunda parazit gelişimi devam etmektedir (325).

KE’de enfeksiyonun ilerleyişini etkileyen faktörlerin başında, bağışıklık sisteminin antijenik özelliklere göre stimüle ettiği T hücreleri vasıtasıyla harekete geçirilen bağışık yanıtın tipi gelmektedir. Bu hücrelerden özellikle CD4+ yüzey reseptörünü taşıyan ve yardımcı T lenfositleri olarak bilinen hücreler konağın savunma mekanizmasında belirleyici rol oynamaktadır. İmmünolojik olaylarda lenfosit ve makrofajlardan sitokin ve interlökinler salgılanmaktadır. T ve B hücreleri tarafından salgılanan bu sitokine lenfokinler adı verilmektedir. Sitokinler yangıyı veya bağışıklığı, lökositlerin gelişmelerini, hareketlerini ve farklılaşmalarını sağlayarak düzenlemektedirler. Interlökin-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-

6, IL-10, tümör nekroz faktörü (TNF) ve interferon (IFN)'lar başlıca önemli sitokinlerdir. Th hücreleri aldıkları uyarıların tipine bağlı olarak tam olarak bilinmeyen birtakım faktörlerin de etkisi ile değişik sitokinleri salgılayan alt gruplara ayrılmaktadır. IL-2, IFN- γ ve lenfosit salgılayan Th1 hücreleri konağın savunma durumunu daha güçlü hale getirirken, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 sentezleyen Th2 hücreleri konağı enfeksiyonlara karşı daha duyarlı hale getirmektedirler (325).

Kistik ekinokokkozis enfeksiyonlarında, immün yanıt çalışmaları sonuçlarına göre Th1 tip sekresyonu tarafından hücresel bağışıklık oluşturulmakta ve metasestodun daha ilk döneminde parazitin gelişmemesinde etkili olmaktadır. Bununla birlikte, konağın immünogenetik durumu da parazitin gelişiminin önlenmesinde önemli bir faktördür (326). KE'nin serolojik teşhisinde parazitin antijenlerine karşı şekillenen IgG, IgM, IgA ve IgE antikoları rol oynamaktadır. Kistin yerleştiği organa ve gelişme durumuna göre bu antikoların kandaki seviyeleri değişiklik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda karaciğer ve peritonda gelişen kistlerin akciğer, beyin ve göz gibi organlarda gelişen kistlerle kıyaslandığında daha yüksek bir antikor yanıt oluşturduğu bildirilmiştir (327).

KE'de serolojik tanı, konağın parazite karşı verdiği hücresel ve humoral immün yanıtın belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Serolojik testlerin, hasta serumunda bulunan spesifik antikoları belirleme kapasitesi (sensitivite) ve enfekte olanları diğer parazitik ve klinik hastalığı olanlardan ayırma kapasitesi (spesifite); kullanılan antijenin özelliği, değişik pozitiflik kriterleri, kistin canlılığı ve lokalizasyonu, parazitin suşu gibi birçok nedene bağlıdır (328). Serolojik tanıda en sık kullanılan antijen kaynakları, çoğunlukla fertil kistlerden elde edilen kist sıvısı ve daha az oranda da kist membranı ve protoskolekslerdir. İnsan ve koyun

kistlerinde sığır ve domuz kistlerine, karaciğer kistlerinde ise akciğer kistlerine oranla daha fazla antijenik protein olduğu ve en yüksek antijen konsantrasyonunun koyun karaciğer kistlerinde bulunduğu bildirilmektedir (329). Canlı fakat steril kistlerin sağlıklı germinal membranlarının tanısasal testler için kullanılabilmesi, antijenik kapasitenin sadece kist fertilesiyle ilgili olmadığı, protoskoleks sayısı ile kist sıvısının antijenik kapasitesi arasında olumlu bir ilişki bulunduğu ve protoskolekslerin hidatik antijenitenin tek olması da en önemli kaynağı olduğu bildirilmiştir. Hidatik kist sıvısı içerisinde konağa ait proteinlerin bulunması ve hidatik antijenlerin bir kısmının diğer helmintlerin yapısında da bulunması nedeniyle KE tanısında kullanılan serolojik testlerde yanlış pozitif reaksiyonlar da şekillenebilmektedir. Serolojik testleri daha etkili bir teşhis metodu haline getirmek için pürifiye kist sıvısı veya rekombinant antijenler kullanılmaktadır. Bu amaçla en çok tercih edilen iki önemli hidatik kist sıvısı antijeninin; ısıya dayanıksız (termolabil) bir lipoprotein olan Antijen 5 ve ısıya dayanıklı (termostabil) bir protein olan Antijen B olduğu bildirilmiştir (329, 330).

Antijen 5 ilk defa at hidatik kist sıvısından immünoelektroforez yöntemiyle elde edilmiş ve KE'nin tanısında kullanılabilirliği üzerinde durulmuştur. Bu antijenin protoskolekslerin parankiminde ve bunların salgılarında bulunduğu da ortaya konulmuştur. Antijen 5, hidatik kist sıvısında ve kistin somatik dokularında bulunan 10 veya daha fazla antijenden biri olup, immünoelektroforetik çalışmalar bu antijene karşı oluşmuş antikorların hasta serumunda bulunmasının KE'nin teşhisinde kesin bir kriter olabileceğini göstermiştir (331). Bu antijene *Taenia hydatigena* sistiserkusları içindeki sıvıda da rastlandığı ve bu yüzden sistiserkozis ile çapraz reaksiyona neden olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, Antijen 5'in KE'nin

tanısındaki spesifikliği düşük bulunmuştur (332). Immunodiffüzyon ve Immunoelektroforezis teknikleri kullanılarak test edilen koyun, at ve sığır kaynaklı kist sıvılarının antijenik bileşimlerinde farklılıklar ortaya çıkmış, fakat bazı antijenlerin her zaman bulunduğu bunlardan birisinin de Antijen 5 olduğu, moleküler ağırlığının 100-300 kDa olduğu, pH'sının 4-7 arasında değiştii ve 56 °C'nin üstünde stabil olduğu bildirilmiştir (333).

İkinci önemli hidatik antijen lipoprotein yapısında, ısıya dayanıklı ve moleküler ağırlığı 12000 Dalton (120 kDa) olan Antijen B (AgB)'dir. İlk kez Oriol ve ark. (330), tarafından tanımlanan bu antijen hasta kanında ölçülebilmekte ve bu da AgB'nin parazitin biyolojisinde ve konakla olan ilişkisinde önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte AgB'nin SDS-PAGE yöntemiyle ortaya konulan moleküler ağırlıkları yaklaşık olarak 8-12, 16 ve 24 kDa olan üç alt üniteden oluştuğu bildirilmiş ve 8 kDa olan en küçük alt ünitesinin ekinokok spesifik olduğu gösterilmiştir. AgB, kist sıvısı kaynatıldıktan sonra geriye kalan en önemli antijenik yapı olduğu, kist membranının geçirgenliği AgB için Antijen 5'e göre 10 kat daha fazla olduğu bildirilmektedir (329, 330).

Hidatik kist enfeksiyonlarının arakonak hayvanlardaki serolojik tanısına yönelik yapılan çalışmalar insanlarda yapılanlarla kıyaslandığında daha sınırlı sayıdadır. Hayvanlarda hidatik kist hastalığının serolojik teşhisindeki en büyük problem doğal enfekte hayvanlarda enfeksiyona karşı çok düşük düzeylerde antikor yanıtının oluşmasıdır. Bu nedenle enfekte hayvanlarda çoğunlukla yanlış negatif cevap şekillenmektedir. Enfekte hayvanlarda özellikle *T. hydatigena* ve *T. ovis* gibi diğer parazitlerle hidatik kistler arasında çapraz reaksiyonlar nedeniyle serolojik tanıda güçlükler yaşanmaktadır (254, 260). Ekinokok antijenlerinin sadece

sestodlarla değil, trematod ve nematodlarla da çapraz reaksiyon verdikleri, bunun sebeplerinden birisinin hidatik kist sıvısında, protoskolekslerde ve laminar membranda bulunan P1 aktivitesi olduğu belirlenmiştir. Kist hidatikli hastalarda bulunan anti-P1 aktivitesi *Fasciola hepatica* ve diğer parazitlerde de bulunduğundan dolayı sıklıkla çapraz reaksiyonlar ortaya çıkmaktadır (334).

Kistin şekillenmesi konağın doğal immünolojik aktivitesi ve bunun gelişmesi ile parazitin anti-komplementar aktivitesi, immün sistemi baskılaması, sitotoksik faktörleri salgılaması, konak hücrelerine karşı bariyer oluşturması gibi parazitin immünevassif stratejilerini içeren mücadeleye bağlıdır (22). Kistik ekinokokkozisde ortaya çıkan immün mekanizmalar kist oluşumu öncesi ve sonrası dönemde farklı özellikler göstermektedir. Bu durum enfeksiyon başlangıcından 2-4 hafta sonra meydana gelmektedir (335).

Enfeksiyonun başlangıç dönemlerinde, fare ve koyunlarda hidatik kist sıvısına karşı ortaya çıkan IgG cevabının en erken iki ile 14 hafta sonra, bazı maymun türlerinde ise dört hafta sonra meydana geldiği gözlenmiştir (336, 337). Erken oluşan enfeksiyon döneminde başlıca eozinofil, lenfosit ve makrofajların artışı patolojik değişikliklere sebebiyet verdiği ve bu durumun ciddi hücresel yanıtla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Koyunlarda enfeksiyondan sonraki 3-5 gün içerisinde nötrofil ve makrofajların infiltrasyonu ile onkosferler ile etrafındaki hücrelerin nekrozu şekillenir. İlerleyen zaman evrelerindeki özellikle 25-30 gün içinde de eozinofil, lenfosit ve makrofajların meydana getirdikleri artan derecede lökositozis tablosunun şekillendiği bildirilmiştir. İn vitro ortamda yapılan çalışmalarda nötrofillerin aynı zamanda onkosferlerinin ölümüne de yol açabileceği ve neticede antikora bağlı hücresel immün cevabın enfeksiyonun erken evresinde

etkin olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır (254, 338). Aktive edilmiş makrofajların protoskolekslerin etkisiz hale getirilmesinde önemli bir rolünün olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur. İn vitro çalışmalarla protoskolekslerin etkisiz hale getirilmesinden sorumlu olan makrofajların sitokinler tarafından modifiye edildiği, IFN-γ tarafından artırıldığı, parazit tarafından stimüle edilen lenfositlerden salgılanan tanımlanmamış sitokinler (muhtemelen IL-10 veya IL-4) tarafından da azaltıldığı tespit edilmiştir (22). Deneysel olarak farelerde oluşturulan sekonder enfeksiyonlarda periton içi verilen protoskolekslerin etrafının aktive olmuş makrofaj hücreleri de dahil üç gün içerisinde hücresel infiltrasyonla sarıldığı ve daha sonra nötrofil, eozinofil ve lenfositler tarafından çevrelendiği bildirilmektedir. Dalak hücreleri tarafından IL-10, IL-4 ve IL-5 sentezinin ilk haftayı takiben sonlandığı, IL10'un enfeksiyon süresince mevcut olan en kuvvetli sitokin olduğu dikkat çekici bulunmuştur (254). Kist oluşumu sırasında şekillenen immünolojik reaksiyonlarda, kistin oluşmaya başlamasıyla birlikte eozinofiller, nötrofiller, makrofajlar ve fibrositleri içeren bir hücresel infiltrasyon oluşmaktadır. Fakat bu durum şiddetli derecede bir yangısal cevap oluşturmamakla beraber kistin etrafını fibröz tabaka ile sararak kistin laminar tabakasını konak dokusundan ayırma eğilimindedir. Kanda eozinofil ve IgE seviyesinin yükselmesi helmint enfeksiyonlarının genel sonucudur. Eozinofili, özellikle parazitin kisti fagosite edilemeyecek kadar büyük olduğu durumlarda konağın savunma amaçlı verdiği yanıt olarak gelişmektedir. IgE bağımlı mast hücre reaksiyonu, öncelikle kiste yakın eozinofillere lokalize olup daha sonrasında anti-parazitik fonksiyonlarını sergilemektedirler. Eozinofiller nötrofillerden daha az fagositik olmalarına rağmen, nötrofiller gibi parazitin larval safhasını hem bağımlı hemde bağımsız

mekanizmalar ile öldürebilmekte, bu aktivitelerinin sitokinler tarafından artırıldığı söylenmektedir. Diğer helmint enfeksiyonlarında olduğu gibi KE’de de Th1 ve Th2 hücreleri sitokin sentezine neden olmaktadır (254).

Kist gelişiminin önlenmesi sırasında görülen immünolojik reaksiyonlar nedeniyle sıklıkla kistin gelişme döneminde bağışık yanıtta etkilenmediği kabul edilmektedir. Buna karşın koyunlarda meydana gelen doğal enfeksiyonlarda bazı kistlerin gelişimleri sırasında etkisiz hale getirilebildiği ve bu durumunda kendisini kalsifiye veya nekrotik kist şeklinde gösterdiği ortaya konulmuştur. Bu tür kistlerin immünolojik bir durumdan kaynaklı olduğuna dair doğrudan bir kanıt olmamasına rağmen, büyük bir olasılık ile bu şekilde olduğunu akla getirmektedir. Kistin tahrip edilmesindeki ilerleme ile bağışıklık yanıtının, parazitin etkisiz hale getirilmesinde rol aldığı tahmin edilmektedir. Bu durum kistin ilerlemesi ile immünolojik uyarımın arttığı anlamına gelebilmektedir. Kist büyüdükçe IgG1 ve IgG4 seviyelerinde artış meydana gelmekte, öte yandan özellikle kistlerin kalsifiye olduğu durumlarda IgG1 ve IgG4 seviyeleri azalmaktadır. Bu durum IgG4 antikor yanıtının enfeksiyonun ilerlemesi ve kistin büyüüp gelişmesi ile ilişkili olduğunu, IgG1, IgG2 ve IgG3 yanıtlarının kistlerin konak bağışıklığı tarafından yok edilmesi sonucunda meydana geldiğini göstermektedir. Deneysel enfeksiyonlarda protoskolekslerin %10’dan daha az bir kısmının kist haline gelebildiği, enfeksiyondan sonraki iki hafta içinde parazit ölümünün meydana geldiği ifade edilmektedir. Aktive olan makrofajların protoskolekslerin öldürülmesinde görev aldığı bilinmekte olup, yapılan in vitro çalışmalarda potoskolekslerin aktive edilmiş makrofajlar tarafından öldürülmesinin IFN- γ tarafından artırıldığı ve lenfositlerden salınan bazı sitokinler (IL-10, IL-4) tarafından da azaltıldığı gösterilmiştir (254).

Hidatik kistler bazı durumlarda yıllarca bile tespit edilemeyen ve yavaş gelişen karakter göstermektedirler. Dolayısıyla hidatik kistlerdeki bu devamlılık konak bağışık yanıtından yeterince etkilenmediklerine işaret etmektedir (22). Konağın immün yanıtını olumsuz yönde etkileyen iki mekanizma vardır. Bunlardan biri parazitin hidatik kist oluşturarak immün yanıtın zararlı etkilerinden korunması anlamına gelen pasif kaçış; diğeri ise immünomodülasyondur ki bu durumda parazit konak yanıtının etkisini azaltmak için konağın immün sistemiyle aktif bir etkileşime girmektedir (254).

Kistik ekinokokkozis tanısında serolojik yöntemlerin uygulanması, 1906 yılında Ghedini'nin kompleman birleşmesi testini kullanması ile başlamıştır. Günümüzde ise KE'in immunolojik tanısında bilinen ve güvenilir sonuçlar veren hemen bütün serolojik testler kullanılmaktadır. *Echinococcus* türleri için spesifik antikor ve antijenlerin saptanması, rekombinant antijenlerin kullanılması ve daha yeni tanı araçlarının geliştirilmesi, hem KE hem de Alveoler ekinokokkozis (AE)'in serolojik tanısını güçlendirmiştir (339).

Kistik ekinokokkozis tanısının günümüzde radyolojik tanı yöntemleri ile konulmaya çalışılmasına rağmen; kistin tümör, apse, basit kist gibi diğer olgularla ayırıcı tanısının yapılabilmesi ve operasyon sonrası nükslerin daha sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilmesi için ön tanının mutlaka serolojik tanı yöntemleriyle desteklenmesi gerekmektedir. Ancak serolojik test sonuçlarının yorumlanmasında da bazı zorluklar dikkati çekmektedir. Bazı konaklarda kistin büyüklüğü, lokalizasyonu, yapısı, canlılığı ve konağın immun sistem aktivitesine bağlı olarak antikor oluşmadığı, bu nedenle de negatif serolojik test sonuçları alınmaktadır. Pratik olarak testler, KE'in tanısında spesifik serum antikorlarının teşhisinde,

özellikle dolaşımdaki antijenlerin teşhisinin daha az mümkün olduğu durumda, oldukça önemlidir. Yüksek sensitivitesi olan testlerin kullanılmasında dahi (IgG-ELISA) KE'li hastaların belli bir kısmında antikorlar teşhis edilememektedir. Beyinde veya gözde yerleşen kistler ile kalsifiye olmuş kistler genellikle çok düşük, hatta hiç antikor oluşturamamaktadır. Antikor yanıtı bazı insan popülasyonlarında ve çocuklarda da düşük olabilmektedir. Ayrıca diğer helmint hastalıkları olan kişilerde de yanlış-pozitif yanıtlar oluşabilmektedir (340).

Antijen B (AgB), *E. granulosus*'un larval dönemlerinde hem kistin germinal membranından hem de protoskolekslerden salgılanan önemli bir antijendir (341). Lipoprotein yapıda, 8 kDa'luk monomerlerden ibaret olup yüksek derecede polimorfizm göstermektedir. Son yapılan moleküler çalışmalar, AgB'nin bir multigen ailesi tarafından kodlandığını ve en az 5 gen lokusunun olduğunu göstermektedir (342). Bunlar, AgB1, AgB2, AgB3, AgB4 ve AgB5 olarak isimlendirilmektedir (343-347). AgB'nin konak parazit ilişkisinde anahtar bir rol oynadığı ileri sürülmesine rağmen parazit biyolojisindeki rolü halen tam olarak bilinmemektedir. Bu antijenin konak proteazları üzerinde inhibitör etkisinin olabileceği, immunomodulator etkisinin varlığı ve lipid bağlama kapasitesinin olduğu ileri sürülmektedir (343, 348, 349). AgB, ara konaklarda hem hücresel hem de humoral immun yanıtı ortaya çıkarmaktadır. Bu antijen immunoregulator molekül olarak kistin oluşması ve kronik olaylarda uzun süre canlı kalması üzerinde etkilere sahiptir (350). Yine bu molekül, polimorf nükleer hücrelerin kist bölgesine toplanmasını engelleme, Th1 ve Th2 dengesini koruyucu olmayan Th2 yanıtı yönünde değiştirme ve H₂O₂ üretimini azaltma gibi fonksiyonlara sahiptir (343, 348). Farelerin onkosferle enfekte edilmesini takiben çok kısa sürede AgB'ye karşı

antikorların ortaya çıkması, AgB'nin kist oluşumunda ve gelişiminde önemli bir rolünün olduğuna işaret etmektedir (351). Rekombinant AgB kullanılarak yapılan çalışmalarda bu antijenin hastalar arasında farklı humoral cevaplara neden olduğu gösterilmiştir (352). Buna ek olarak, humoral yanıtta bu varyasyonun AgB subunitlerinin kompozisyon ve yapısındaki varyasyonla da ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (350). Yine, AgB gen ailesinin kendi içinde ve bireyden bireye farklı olarak eksprese olabileceğini ileri sürmüşler ve immun yanıtlardaki farklılığı buna bağlamışlardır (347). Ayrıca, AgB1'in parsiyel sekansının *E. granulosus*'un dört farklı suşunda genetik varyasyon gösterdiği belirlenmiştir (353). Konak molekülleri ve hücreleriyle yakın ilişkisinin AgB proteinlerini antijenik varyasyona yatkın hale getirdiğini ileri sürmüştür (354). Rekombinant AgB8 (AgB'nin 8kDa'luk subunitine karşı oluşturulmuş protein) subunitlerine karşı oluşan humoral immun yanıt, kist hidatikli insanlarda araştırılmış ve AgB3'ün AgB1 ve AgB2'ye göre daha az antijenik olduğu belirlenmiş, AgB2'nin en iyi tanısal performansına sahip olduğu ortaya konmuştur (352). AgB2'nin de AgB4 ile %70 oranında aminoasit sekansı benzerliği göstermesi ve ortak epitoplalarının bulunması nedeniyle ELISA ile belirlenen pozitifliklerinin benzer olduğu tespit edilmiştir (355).

Hindistan'da sığır, manda, koyun ve keçilerden elde edilen 110 kist materyalinde AgB1 polimorfizmine PZR-SSCP analiziyle bakılmış ve 14 farklı band profili belirlenmiştir. Bu polimorfizm DNA sekans analiziyle de teyid edilmiş ve AgB1'in pozitif seleksiyon baskısı altında olduğu belirtilmiştir. Başka bir çalışmada ise fertil, steril ve kalsifiye manda kistlerinden elde edilen izolatlarda AgB1-5 gen ekspresyonu araştırılmış, kalsifiye olmaya başlamış kistlerde en fazla

AgB1, fertil kistlerde AgB2 ve AgB4 eksprese edilirken, AgB3 en az kalsifiye kistlerde ve AgB5 ise erişkin dönemden eksprese edilmiştir (342).

Mısır'da (356) insan, deve, domuz ve koyun izolatlarındaki AgB2 gen polimorfizmi *AluI* ve *EcoRI* restriksiyon enzimleri kullanılarak PZR-RFLP tekniğiyle araştırılmıştır. Araştırmacılar (356) bakısını yaptıkları bütün örneklerde *AluI* enzimiyle benzer band profilleri elde ettiklerini, seçilen bazı örneklerin DNA sekans analizi neticesinde insan izolatlarının koyun izolatlarına %100, deve izolatlarına %99 ve domuz izolatlarına ise %96 benzerlik gösterdiğini ortaya koymuşlardır. PZR ve RT-PZR'yi takiben klonlama ve sekans analiziyle yüksek derecede AgB2 sekans polimorfizmi belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada ise AgB2'yi kodlayan genin suşlar arasındaki varyasyonunu belirlemek amacıyla PZR-SSCP analizi uygulanmış ve suşlar arası varyasyon belirlenmiştir (346). AgB2 ile ilişkili genin G1/G2 suşu ile G6/G7 suşlarının ayrı ikişer grup olduğu ve G5'in de bunlardan farklı olduğu belirlenmiştir (357).

Farklı coğrafik bölgelerden elde edilen *E. granulosus* izolatlarında AgB1 nükleotid sekans farklılıkları araştırılmış ve aminoasit sekanslarında farklılıklar belirlenmiştir. Bunun farklı populasyonlarda parazitin morfolojik, biyokimyasal ve genetik özellikleri ile ara ve son konak kullanımında değişikliklere yol açtığı vurgulanmıştır (358). AgB'deki genetik varyasyon nedeniyle farklı konaklarda değişik seviyelerde şekillenen immün yanıtın AgB'nin farklı KE hastalarında değişik immunojenik yanıtlar oluşturmaya neden olduğu ileri sürülmüştür (359). AgB'yi kodlayan gendeki varyasyonun analiz edilmesinin AgB'nin fonksiyonel önemi ile suşların genetik çeşitliliği arasındaki korelasyonun anlaşılmasına yardımcı olacağı belirtilmiştir (354).

Türkiye’de yapılan bir çalışmada ise 43 sığır, 25 koyun ve 31 insan izolatından elde edilen toplamda 99 kist materyalinde AgB1 polimorfizmine PZR-SSCP analiziyle bakılmıştır. Öncelikle tüm örneklerin 12S rRNA-PCR analizi gerçekleştirilmiş ve tüm izolatların *E. granulosus sensu stricto* olduğu belirlenmiştir. 16 insan, 35 sığır ve 25 koyun izolatı olmak üzere toplamda 74 izolatın PZR-SSCP analizi gerçekleştirilmiş ve hepsinde 102 bp’lık band profili gözlemlenmiştir. SSCP sonuçlarına göre sığır ve insan izolatlarının her birinde farklı band profilleri oluşmuş, DNA sekans analizleri ile bu izolatlarda polimorfizm belirlenmiş, diğer 74 izolatta ise benzer band profilleri elde edilmiştir (360).

Echinococcus granulosus’un değişik izolatları içerisindeki genetik farklılıklar hastalığın epidemik olduğu bölgelerde etkenin patojenitesi, lokal bulaşma şekli, etkene karşı aşı ve ilaç geliştirme çalışmaları, hastalığın teşhis ve tedavi teknikleri ve dolayısı ile hastalıkla mücadele ve eradikasyon çalışmaları üzerinde etkilidir. AgB’yi kodlayan genlerle ilgili çalışmalar doksanlı yılların başında yapılmaya başlanmış olup, konuyla ilgili sınırlı sayıda çalışma yapılmış ve AgB’yi kodlayan multigen ailesindeki varyasyonun suşlar ve izolatlar arasında farklılık gösterdiği bildirilmiştir (357). Fakat Türkiye’de *E. granulosus* suşları (G1-3, G6, G7) ile AgB1 gen polimorfizmi arasındaki ilişki henüz ortaya konulmamıştır.

Bu nedenle bu tez çalışması ile;

1-*Echinococcus granulosus*’un farklı izolatları içerisindeki genetik polimorfizmin belirlenerek suşların tespit edilmesi,

2-Elde edilen izolatlardaki AgB1 alt ünitesini kodlayan gendeki polimorfizmin PZR-RFLP ve DNA sekans analiziyle belirlenmesi ve suşlarla ilişkilendirilmesi,

3-AgB'deki gen polimorfizminin kısmi pürifiye kist sıvısı antijeni kullandığında sığır ve koyun KE'sinin ELISA ve Western blot ile serolojik tanısındaki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.



4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada, Elazığ ve Erzincan illerinde mezbahalardan Nisan 2017 - Şubat 2018 döneminde kesimi takiben her bir il için 30 sığır ve 30 koyun olmak üzere toplam 120 hayvandan hidatik kist materyali ve kan serumu toplanmıştır. Bu amaçla kesimi takiben her bir hayvanın başta karaciğer ve akciğerleri olmak üzere diğer iç organları hidatik kistler yönünden gerek inspeksiyon gerekse de palpasyonla muayene edilmiş ve içi sıvı dolu kistlerin sıvısı boşaltıldıktan sonra germinal membranlar bir pens yardımıyla alınıp %70'lik etanol içinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Bu örnekler kullanılıncaya kadar +4°C'de saklanmıştır. Her bir hayvandan sadece bir kist materyali alınmış, kist numunesi alınan her hayvandan kesim sonrası 1-2 ml kan örneği de alınıp serumu ayrılmak üzere soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılmıştır.

4.2. Laboratuvar Çalışmaları

Serum tüplerine alınan kanlar laboratuvara getirildikten sonra santrifüj cihazına (Centurion Scientific Model: CR 2000) yerleştirilip 5000 g'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst kısımda oluşan serum, pipet ile 1.5 ml'lik ependorf tüplere transfer edilerek kullanılıncaya kadar -20° C'de saklanmıştır.

4.2.1. Genomik DNA İzolasyonu

Laboratuvarda %70'lik alkolde muhafaza edilen kistlerden pens yardımıyla tırnak büyüklüğünde germinal membran alınıp temiz bir lam üzerine konulmuş ve

steril bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılarak 1.5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmıştır. Üzerlerine alkolden arındırmak için 1X PBS solüsyonundan 600 µl eklenip, kısa bir vorteks yapıldıktan sonra maksimum hızda (14.000 rpm'de) 1 dk süreyle santrifüj edilmiş ve üstteki sıvı atılmıştır. Bu işlem 5 kez tekrarlanmıştır. Son yıkamanın ardından ependorf tüpler içerisinde germinal membranların üzerine RTA genomik DNA izolasyon kiti (RTA Lab. Türkiye) içeriğinde bulunan 200 µl solüsyon DL eklenmiştir. Takiben de 20 µl Proteinase K (Thermo Scientific, 20 mg/ml) ilave edilip, vortekslendikten sonra 1 gece 56 °C'de bekletilmiştir. Bir gece sindirilen germinal membranlar sıcak su banyosundan çıkarılarak kit protokolüne göre aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir:

- Ependorf tüplere 200 µl Solüsyon B eklenip 20 saniye vurum-vorteks yapılarak karıştırıldı.
- Kısa bir santrifüjden sonra her 3 dakikada bir karıştırılarak 65 °C'de 15 dakika inkübe edildi.
- 260 µl etanol (96-100%) eklenip, 20 saniye vurum-vorteks yapılarak karıştırıldı.
- Kısa bir santrifüjden sonra karışım, toplama tüpünün içine yerleştirilip spin kolon tüplerine aktarıldı.
- 7000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıp, sıvı içeren alttaki tüp atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- 700 µl Solüsyon W1 eklenip, 7000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı ve sıvı içeren alttaki tüp atıldıktan sonra kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.

- 700 µl Solüsyon W2 eklendi ve 16000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldı. Takiben sıvı içeren alttaki tüp atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- 16.000 rpm’de 3 dakika santrifüj yapıldı.
- Spin kolon, steril 1.5 ml’lik bir ependorf tüpe transfer edildi.
- 100 µl 70 °C’ye ısıtılmış Solüsyon E eklendi, kolonun kapağı kapatıldı ve oda sıcaklığında (15-25 °C) 3 dakika inkübe edildi.
- 7.000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- 16.000 rpm’de 30 saniye daha santrifüj yapıldı.
- Spin kolon atıldı, ependorf tüpünün içindeki elüsyon tamponunda genomik DNA (gDNA) bulunmaktadır.
- Elde edilen gDNA’lar kullanıma kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

4.2.2. 12S rRNA Geninin PZR ile Çoğaltılması

Bu amaçla *E. granulosus*’un yalnızca G1-G3 clusterini (*E. granulosus sensu stricto*) çoğaltan ve genom üzerinde mitokondrial 12S rRNA genini amplifiye eden *E.g.ss1.for* 3'-GTATTTTGTAAGTTGTTCTA-5' ve *E.g.ss1.rev* 3'-CTAAATCA CATCATCTTACAAT-5' primerleri kullanılarak PZR kuruldu (274).

Toplam 50 µl’lik hacimde hazırlanan PZR karışımına;

- 5 µl 10X PZR buffer,
- 5 µl 25 mM MgCl₂,
- Deosinükleotidlerin her birinden 250 µM,
- 1.25 U Taq DNA Polymeraz,

- Primer çiftlerinin her birinden 20 pmol ve
- Ortalama 200 ng template DNA ilave edildi.

Karışım, 95 °C’de 3 dakika ön denatürasyon aşamasını takiben, toplam 40 PZR siklusu olacak şekilde 94°C’de 30 saniye denatürasyon, 57 °C’de 1dk hibridizasyon ve 72 °C’de 40 sn sentez aşamasını takiben 72 °C’de 5 dk ekstra sentez işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen ürünler %1.4’lük agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuştur. Jel hazırlandıktan sonra, 10 µl PZR ürünü, 5 µl yükleme solüsyonu (1/6 oranında sulandırılmış, 6X; MBI Fermentas, Lithuania) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez işlemi, TAE tampon solüsyonu kullanılarak jel tankında 90 volt akımda 40 dakika süreyle gerçekleştirilmiş, daha sonra tanktan çıkarılan jel, UV transilluminatörde bandların varlığı yönünden incelenmiştir. Bandların moleküler ağırlığını belirlemek için 100 bp’lik marker kullanılmıştır. PZR uygulamalarında pozitif kontrol olarak daha önce DNA dizi analizi yaptırılarak *E. granulosus sensu stricto* (G1-G3) olduğu belirlenen izolatın gDNA’sı, negatif kontrol olarak steril distile su kullanılmıştır.

4.2.3. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz Subunit 1 (mt-CO1) Geninin PZR İle Çoğaltılması

Gerek 12S rRNA PZR ile band vermeyen örneklerin kesin suş tayinin yapılabilmesi amacıyla *E. granulosus*’un mitokondrial sitokrom oksidaz subunit 1 (mt-CO1) gen bölgesi PZR ile çoğaltılmıştır.

Toplam 50 µl’lik hacimde hazırlanan PZR karışımı, 12S rRNA-PZR ile aynı şekilde hazırlanmıştır. Çalışmada mt-CO1 genini çoğaltmak için JB3 3’-

TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-5' ve JB4.5 3'- TAAAGAAAGAACA TAATGAAAATG-5' adlı primerler kullanılmıştır (293). PZR koşulları, 95 °C'de 5 dk ön denatürasyon aşamasını takiben, 94°C'de 50 sn denatürasyon, 45 °C'de 50 sn hibridizasyon, 72 °C'de 50 sn sentez (35 siklus) olarak gerçekleştirilmiştir. Son siklusu müteakip 72 °C'de 10 dk ekstra sentez işlemi yapılmıştır. PZR ürünleri %1.4'lük agaroz jelde elektroforeze tabi tutulup ethidium bromide ile boyandıktan sonra görüntülenmiştir. Pozitif kontrol olarak daha önce mt-CO1 geninin dizi analizi yaptırılan ve laboratuvarımızda mevcut olan *E.granulosus s.s.* gDNA'sı, negatif kontrol olarak steril distile su kullanılmıştır.

4.2.4. AgB1 Genindeki Polimorfizmin Belirlenmesi

Suş tespiti amacıyla protoskoleks/germinal membranlardan elde edilen gDNA'lardan her bir izolat için AgB1 gen bölgesi ayrı ayrı PZR ile çoğaltılmıştır.

Bu işlemlerde kullanılan primer dizileri ise aşağıda verilmiştir (361):

AgB1: Forward: 5'-CGTGATCCGTTGGGTCAG-3'

Reverse: 5'-GGCACCTCTATTCACCTTCA-3'

Toplam 50 µl'lik hacimde hazırlanan PZR karışımına,

- 5 µl 10X PZR buffer,
- 5 µl 25 mM MgCl₂,
- Deosinükleotidlerin her birinden 250 µM,
- 1.25 U Taq DNA Polymerase enzimi,
- Primer çiftlerinin her birinden 20 pmol ve

- 5 µl template DNA ilave edilmiştir.

PZR amplifikasyonunda 95 °C'de 5 dk ön denatürasyon aşamasını takiben, 95°C'de 45 sn denatürasyon, 55 °C'de 45 sn hibridizasyon, 72 °C'de 90 sn sentez (35 siklus) olarak gerçekleştirilmiştir. Son siklusu müteakip 72 °C'de 10 dk ekstra sentez işlemi yapılmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonun'da elde edilen ürünler %2'lik agaroz jel elektroforeze tabi tutulup ethidium bromide ile boyandıktan sonra UV'de görüntülenmiştir.

4.2.6. DNA Dizi Analizi

Echinococcus granulosus s.s. spesifik primerler ile band vermeyen 6 örneğin mt-CO1 PZR ürünü ve AgB1 PZR ürünü 120 örneğin sekans analizi MACROGEN (Ankara, Türkiye) firmasına gönderilerek tek yönlü DNA dizi analizi yaptırılmış, dizi analizi sonuçları BLAST analizi (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) yapılarak GenBank'taki referans dizi analizleri ile karşılaştırılmıştır.

4.2.7. Serolojik Analizler

4.2.7.1. Kısmi Pürifiye Kist Sıvısı Antijeninin Hazırlanması

Kısmi pürifiye kist sıvısı antijeninin hazırlanması amacıyla, fertil koyun karaciğer hidatik kist sıvısı kesimi takiben enjektörle alınıp steril cam tüplere konularak laboratuvara ulaştırılmıştır. Hidatik kist sıvısı 5000 g'de 10 dakika

santrifüj edilerek protoskoleks ve diğler partiküllerin çökmesi sağlanmıştır. Hem antijen 5 hem de antijen B'yi içeren 100 ml süpernatant elde edilmiştir. Bu süpernatant 1 gece +4°C'de 0.005 M acetat buffer (pH=5.0)'da diyalize edilmiş, daha sonra +4°C'de 15.000 g'de 30 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atılıp altta kalan pelet toplanıp 10 ml 0.2 M fosfat buffer (pH=8.0)'da çözdürülmüş ve bu solüsyon 15 dakika su banyosunda tutulduktan sonra +4°C'de 20.000 g'de 1 saat süreyle santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet atılmış ve AgB bakımından zengin süpernatant porsiyonlara ayrılıp kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır (339).

4.2.7.2. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Bu test, Şimşek (339)'in bildirdiği şekilde yapılmıştır. Antijen 0.05 M Karbonat/Bikarbonat tamponu ile 1/20 oranında sulandırılıp ELISA pleytinin (Linbro EIA mikrotitration plate 96 flat bottom Lot No: 805202) her bir kuyucuğuna 100 µl konularak bir gece +4°C'de bekletilmiştir. Ertesi gün bir kez %0.1'lik Tween-20 içeren PBS ile yıkanarak bloklama işlemine geçilmiştir. Bloklama işlemi için 1X PBS ile sulandırılmış %5'lik yağsız süt tozu kullanılmıştır. Bu karışımdan her kuyucuğa 130 µl ilave edilerek 37 °C'de 2 saat bekletilmiştir. Ardından 5 kez %0.1'lik Tween-20 içeren PBS ile yıkanarak serumlar ilave edilmiştir. Serumlar 1/100 oranında %0.02'lik Tween-20 içeren PBS solüsyonu ile sulandırılarak her bir kuyucuğa 100 µl ilave edilip 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Takiben örnekler 5 kez %0.1'lik Tween-20 içeren PBS ile yıkanarak konjugat (koyun örnekleri için anti-sheep IgG, A-3415 Lot: 21K9181), (sığır örnekleri için anti-bovine IgG, A-5295 Lot: 108K4831) eklenmiştir. Konjugat ise 1/1000 oranında %0.02 Tween-20 içeren PBS ile sulandırılıp her bir kuyucuğa 100 µl

konulup 37 °C'de 2 saat bekletilmiştir. Süre sonunda örnekler 5 kez %0.1'lik Tween-20 içeren PBS ile yıkandıktan sonra substrat ilave edilmiştir. Substrat solüsyonu 0.1M Citric asit, 0.2M Na₂HPO₄, %3'lük H₂O₂ ve 1 adet OPD tablet (10 mg o-phenylenediamine Sigma cat. No: P3804)'den oluşturulmuş ve her kuyucuğa 100 µl konulup 15 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir. Renk oluşumu gözlendikten sonra her kuyucuğa 50 µl 1N sülfirik asit (durdurma solüsyonu) eklenen pleyt, ELISA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda okutulmuştur. Sonuçlar absorbans değerleri olarak alınıp, negatif kontrollerin absorbans değerlerinin aritmetik ortalaması +2 standart sapma (X+3SD) değerinin (eşik değer=cut-off) üstü pozitif olarak kabul edilmiştir. Negatif kontrol olarak yeni doğmuş kuzu ve buzağı serumu kullanılmıştır.

4.2.7.3. SDS-PAGE (Sodium Dodecyle Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis)

SDS-PAGE ve Western Blot safhalarında Şimşek (339)'in bildirdiği metod takip edilmiştir.

4.2.7.3.1. Tampon ve Solüsyonlar

%10 SDS

- 10 gr SDS
- 100 ml dH₂O

%30 Acrylamide-Bisacrylamide

- 29 gr Acrylamide

- 1 gr Bisacrylamide
- 75 ml dH₂O

Bu karışım iyice karıştırıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlanılıp kullanılıncaya kadar kahve renkli bir şişede +4°C'de saklanmıştır.

%0.1 Ammonium Persulphate (APS)

- 0.1 gr APS
- 1 ml dH₂O

Bu solüsyon 1.5 ml'lik bir ependorf tüp içerisinde her defasında taze olarak hazırlanmıştır.

TEMED (N, N, N, N-tetramethylethylenediamine)

Acros organics Lot: A014728901

Tank Buffer (Tris-glisin buffer)

- 14.4 gr Glycine
- 3.03 gr Tris base
- 10 ml %10 SDS
- 985 gr dH₂O

Bu karışım pH 8.3'e ayarlanarak cam şişede +4°C'de muhafaza edilmiştir.

1X SDS Sample Buffer

- 50 mM Tris-CI (pH: 6.8)
- 100 mM Dithiothreitol
- %2 SDS

- %0.1 Bromphenol blue
- %10 Glycerol

0.5 M Tris-Cl (pH: 6.8)

- 6.05 gr Tris-Cl
- 50 ml dH₂O

Bu karışım pH 6.8'e ayarlanıp son hacim 100 ml'e tamamlayarak ayarlanmıştır.

1.5 M Tris-Cl (pH: 8.8)

- 18.16 gr Tris-Cl
- 50 ml dH₂O

Bu karışımın son hacmi 100 ml'ye tamamlanıp pH'sı 6.8'e ayarlanmıştır.

Moleküler Ağırlık Markeri

Sigma immunochemicals Prestained Molecular Weight Standard SDS-7B markeri kullanılmıştır.

Boyama Solüsyonu (Staining)

- 5 ml %1 Coomassie mavisi
- 20 ml %95 Methanol
- 5 ml Glacial asetik asit
- 20 ml dH₂O

Açma Solüsyonu (Destaining)

- 30 ml Methanol
- 10 ml Glacial asetik asit
- 60 ml dH₂O

4.2.7.3.2. Testin Uygulanışı

4.2.7.3.2.1. SDS-PAGE İle Proteinlerin Ayrıştırılması

Separasyon Jelinin Hazırlanması (%10)

- | | |
|--------------------------------|---------|
| • %30 Acrylamide-Bisacrylamide | 5 ml |
| • 1.5 ml Tris-CI (pH: 8.8) | 3.75 ml |
| • % 10 SDS | 0.3 ml |
| • % 10 APS | 0.15 ml |
| • dH ₂ O | 5.8 ml |
| • TEMED | 7 µl |

Separasyon jeli hazırlandıktan sonra cam plakların alttan 2/3'lük kısmına kadar pipet yardımı ile dökülmüştür. Üst kısmın düzgün bir halde jelleşmesi için 2 ml bütanol eklenip, oda ısısında jelleşmeye bırakılmıştır.

Stacking Jelinin Hazırlanması (%5)

- | | |
|--------------------------------|--------|
| • %30 Acrylamide-Bisacrylamide | 835µl |
| • 0.5 M Tris-CI (pH: 6.8) | 1.5 ml |
| • % 10 SDS | 63 µl |
| • % 10 APS | 63 µl |

- dH₂O 3.75 ml
- TEMED 5 µl

Stacking jel hazırlandıktan sonra polimerize olmuş separasyon jelinin üzerindeki bütanol dökülüp birkaç kez distile su ile yıkandıktan sonra üzerine stacking jel solüsyonu pipet yardımı ile dökülüp 12 kuyucuklu tarak jele yerleştirildikten sonra oda ısısında jelleşmeye bırakılmıştır.

4.2.7.3.2.2. Örneklerin Kuyucuklara Yüklenmesi ve Jelin Elektrofrez

Her jelin ilk kuyucuğuna 5 µl protein markeri konulmuş, kalan 11 kuyucuğun herbiri için 20 µl kısmi pürifiye AgB ve 5 µl sample buffer karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım kuyucuklara yüklenmeden önce 5 dk kaynama ısısındaki su içinde bekletilmiştir. Tarak polimerize olmuş jelden yavaş ve düzgün bir şekilde çıkarılarak tank buffer konulup her kuyucuğa 25 µl örnek-yükleme buffer karışımından yüklenmiştir. 150 volt sabit akımda separasyon işlemi başlatılmıştır. Antijenle birlikte karışımın içerisinde bulunan işaretleyici boya olan bromphenol blue separasyon işlemi ile jelin en alt kısmına ulaşınca akım kesilerek elektrofrez işlemi tamamlanmıştır.

4.2.7.3.2.3. Jelin Boyanması

Jelin boyanması işlemi antijenin separe olup olmadığını kontrol etmek için yapılmıştır. Cam levhalar arasındaki jel çıkarılarak boyama solüsyonunda bir gece oda ısısında bekletilmiştir. Boyanan jel, üzerindeki boya fazlalığını gidermek ve

band profillerinin görünür hale getirmek amacıyla açma solüsyonunun içerisinde çalkalanmıştır. Her seferinde açma solüsyonu değiştirilerek band profillerinin daha net görüntüsü elde edilene kadar tekrarlanmıştır.

4.2.7.4. Western Blot

4.2.7.4.1. Tampon ve Stok Solüsyonlar

Transfer Buffer (Towbin Buffer)

- 2.9 gr Glycine
- 5.8 gr Tris-base
- 0.37 gr SDS
- 200 ml Methanol
- 800 ml Distile su

Bu karışım hazırlandıktan sonra pH 8.3'e ayarlanmıştır.

10X PBS

- 8 gr NaCl
- 2 gr KCl
- 11.5 gr Na₂HPO₄
- 2 gr KH₂PO₄
- 800 ml Distile su

Bu karışımın son hacmi 1000 ml'ye tamamlanıp pH 7.4'e ayarlanmıştır.

Substrat Solüsyonu

- 0.01 gr DAB (Sigma ALDRICH, Cat No: D12384-5G)
- 20 ml 1X TBS
- 20 µl %3'lük H₂O₂

Bu karışım ışığı az geçiren koyu renkli bir şişede hazırlanıp en son H₂O₂ ilave edildikten sonra petri üzerinde bulunan membrana dökülmüştür.

4.2.7.4.2. Ayrışan Proteinlerin Nitrosellüloz Membrana Transferi (Blotting)

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra cam plaklar açılmadan önce jelin boyutu hesaplanmış, bu ebatlara uygun bir şekilde 6 adet Whatman kağıdı (3 mm Whatman) ile birlikte bir adet Nitrosellüloz membran (Sigma Nitrosellüloz electrophoresis grade N-8392 0.45 µm pore size) kesilmiştir. Uygun ebatlarda kesilen nitrosellüloz membran içi distile su dolu kaba alınmıştır. Whatman kağıtları ise transfer buffer ile ıslatılarak hazır hale getirilmiştir. Bu işlemler sonucunda membran, jel ve whatman kağıtları aşağıdaki sıra ile transfer ünitesine alınmıştır:

- Elektrod (Katod)
- Sünger
- Filtre kağıdı (3 adet)
- Jel
- Nitrosellüloz membran
- Filtre kağıdı (3 adet)
- Sünger

— Elektrod (Anod)

Bu sıralama ile transfer ünitesine yerleştirilirken özellikle jel ile nitrosellüloz membran arasına herhangi bir hava kabarcığı oluşumunu engellemek için roller yardımı ile hava kabarcıkları uzaklaştırılmıştır. Tankın iç haznesi transfer buffer ile doldurulduktan sonra jel-membran ünitesi tanka yerleştirilmiştir. Üç saat boyunca 70 volt 0.65 mA sabit akım uygulanarak jel üzerinde bulunan proteinler membrana transfer edilip, blotlama işlemi bittikten sonra jel-membran sistemi tankdan çıkarılmıştır. Transfer işleminin tam anlamıyla olup olmadığını, jelde protein kalıp kalmadığını kontrol etmek için jel, transfer sisteminden alınarak boyama solüsyonunda bir gece oda ısısında tutulup ardından açma solüsyonuna birkaç defa tabi tutularak transfer olmayan proteinlerin varlığı kontrol edilmiştir. Transferi takiben nitrosellüloz membrandaki marker, bistüri yardımı ile kesilip Whatman kağıdı arasına konularak karanlık ortamda saklanmıştır.

Nitrosellüloz membran nonspesifik bağlanmaları önlemek amacıyla %5'lik yağsız süt tozuna bırakılarak 37 °C'de 2 saat veya işleme aynı gün devam edilmediği takdirde ise +4 °C'de 1 gece muhafaza edilerek bloklanmıştır. Ertesi gün bloklanan membran bir kez %0.1'lik Tween 20 içeren PBS ile yıkanıp ıslak cam bir levhanın üzerinde örnek sayısı kadar bir bistüri yardımı ile (her şeritte bir kuyucuktaki antijen separasyonu olacak şekilde) striplere ayrılmıştır. Şeritler halinde kesilen nitrosellüloz membranın herbiri strip taşıyıcıya alınıp üzerleri numaralandırılmıştır. Üzerlerine ilave edilecek serumlar da numaralandırılarak %0.02 Tween-20 içeren PBS ile 1/50 oranında sulandırılıp 37 °C'de 1.5 saat bekletilmiştir. Sürenin sonunda %0.1'lik Tween 20 içeren PBS ile şerit membranlar 5'er dakika süreyle dört kez yıkanmıştır. Yıkama işleminin tamamlanması ile

sekunder antikor (peroksidaz işaretli anti-sheep ve anti-bovine IgG) %0.02 Tween-20 içeren PBS ile 1/1000 oranında sulandırılarak membranların bulunduğu taşıyıcıya aktararak 37 °C’de 1.5 saat bekletilmiştir. Sürenin sonucunda %0.1’lik Tween 20 içeren PBS ile şerit membranlar 5’er dakika süreyle dört kez yıkanmıştır. Yıkama işleminin tamamlanması ile membranlara substrat eklenip bandlar görünür hale gelince filtre kağıtlarına alınarak değerlendirilmesi yapılmıştır.



5. BULGULAR

Bu çalışma süresince 60'ı Elazığ, 60'ı da Erzincan ilinden olmak üzere toplamda 120 hidatik kist örneği toplanmıştır.

Kistlerin hayvan gruplarına ve lokalize olduğu organa göre dağılımları Tablo 9 ve Tablo 10'da gösterilmiştir. Buna göre Elazığ ilinden elde edilen sığır hidatik kistlerinin 23'ü akciğer, 5'i karaciğer, 1'er tanesi de kalp ve dalaktan elde edilirken; koyun kistlerinin 25'i akciğerden 5'i de karaciğerden elde edilmiştir. Erzincan ilinden ise sığır kistlerinin 25'i akciğerden 5'i karaciğerden toplanırken, koyun kistlerinin 22'si akciğer 8'i de karaciğerden elde edilmiştir. Kist elde edilen bazı organlar Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2: Mezbahanedan toplanan hidatik kistli akciğer (A) ve karaciğer (B)'in görünümü

Tablo 9: Elazığ ilinden toplanan hidatik kist örneklerinin hayvan gruplarına ve lokalize olduğu organa göre dağılımı.

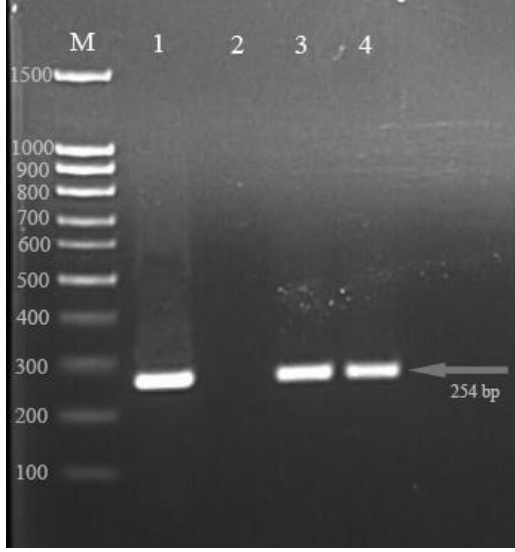
Türler	Lokalize olduğu organ				Toplam kist sayısı
	Akciğer	Karaciğer	Dalak	Kalp	
Sığır	23	5	1	1	30
Koyun	25	5	-	-	30

Tablo 10: Erzincan ilinden toplanan hidatik kist örneklerinin hayvan gruplarına ve lokalize olduğu organa göre dağılımı.

Türler	Lokalize olduğu organ				Toplam kist sayısı
	Akciğer	Karaciğer	Dalak	Kalp	
Sığır	25	5	-	-	30
Koyun	22	8	-	-	30

5.1. 12S rRNA-PZR Bulguları

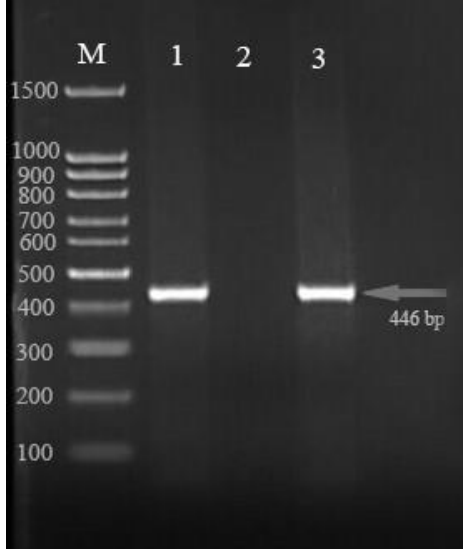
Echinococcus granulosus'nun 12S rRNA gen bölgesinde spesifik primerler kullanılarak yapılan PZR neticesinde 254 bp band veren örnekler *E. granulosus sensu stricto* olarak belirlenmiştir (Şekil 3). Bu çalışmada bakışı yapılan 120 hidatik kist örneğinin 114 (% 95)'ü *E. granulosus sensu stricto* olarak tanımlanmıştır. Band vermeyen 6 örneğin mt-CO1 gen bölgesi PZR ile çoğaltılmıştır.



Şekil 3: *Echinococcus granulosus*'un sığır ve koyun izolatlarının 12S rRNA gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucunda oluşan band profillerinin görünümü M: DNA marker (100 bp), 1: Pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol, 3: Koyun izolatı, 4: Sığır izolatı.

5.2. Mitokondrial CO1-PZR Bulguları

12S rRNA gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucunda band vermeyen 6 izolatın hepsi sığır örneklerine ait olup, bunların kesin suş tayininin yapılabilmesi amacıyla mt-CO1 gen bölgesi PZR ile çoğaltıldı ve bütün örneklerde 446 bp'lik band elde edildi (Şekil 4). Bu örneklerin kesin suş tayini için DNA dizi analizi yaptırıldı.



Şekil 4: *Echinococcus granulosus*'un sığır izolatlarının mt-CO1 gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucunda oluşan bandların görünümü M: DNA marker (100 bp), 1: Pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol, 3: Sığır izolatu.

5.3. mt-CO1 Geninin Dizi Analizi, Alignment ve Filogenetik Analiz Bulguları

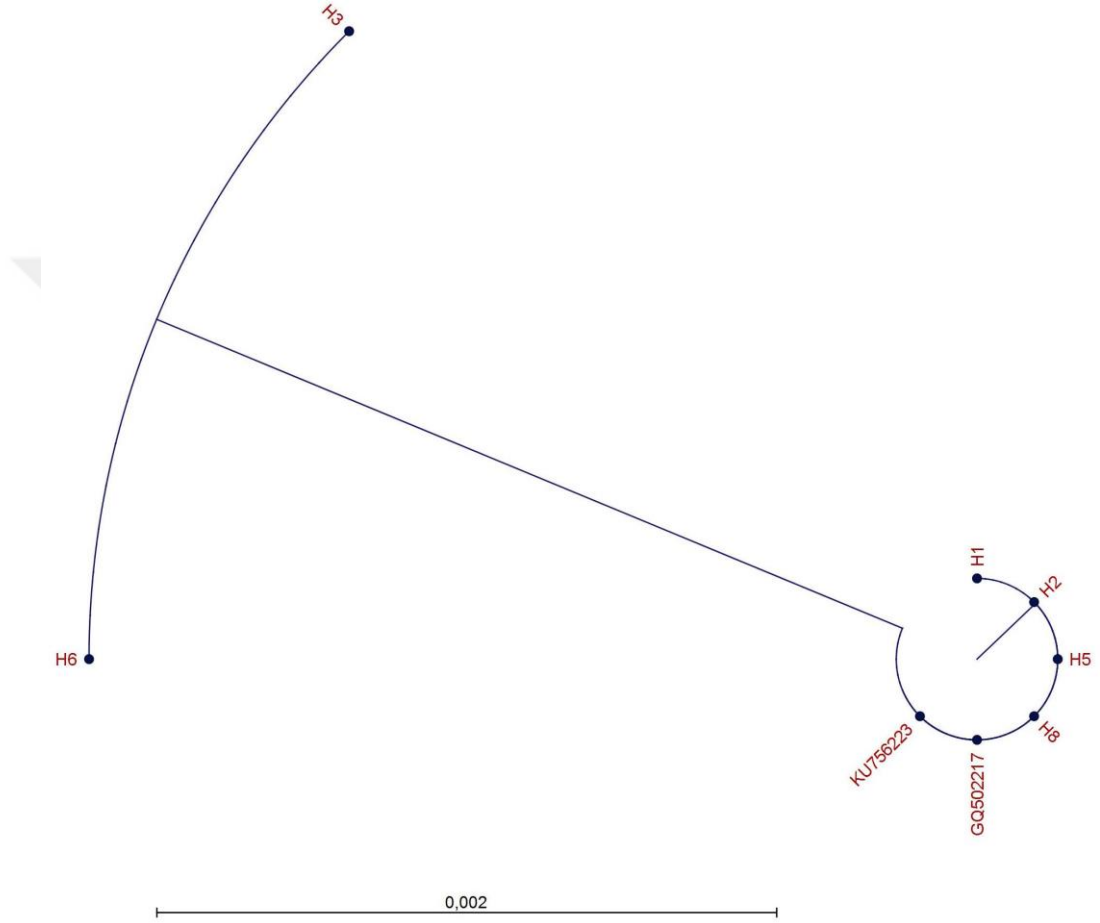
Toplamda 6 adet sığır izolatına ait mt-CO1 gen bölgesi PZR ürünlerinin tek yönlü DNA dizi analizi yaptırılmıştır. Elde edilen sekans verileri BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) yapıp GenBank'taki kayıtlı sekanslar (KU756223 ve GQ502217) ile karşılaştırılmıştır. CLC Main Workbench 8 programı (406) ile yapılan alignment Şekil 5'de gösterilmiştir.

Şekil 5'deki alignment tablosuna göre; sadece H3 ve H6 numaralı izolatların 24. nükleotidinde bir farklılık meydana gelmiştir. Referans sekanslar ile birlikte diğer 4 izolatın 24. nükleotidi 'C' iken H3 ve H6 numaralı izolatların 24. nükleotidi 'T' dir. Buna rağmen bütün izolatlar *E. granulosus sensu stricto* olarak isimlendirilmiştir.

			20		40		60	
H1	GAGTATTAGT	GCTAATTTTG	ATGCGTTTGG	GTTCTATGGG	TTGTTGTTTG	CTATGTTTTT	C	60
H2	60
H3T.....	60
H5	60
H6T.....	60
H8	60
KU756223	60
GQ502217	60
		80		100		120		
H1	TATAGTGTGT	TTGGGTAGCA	GGGTTTGGGG	TCATCATATG	TTTACTGTTG	GGTTGGATGT		120
H2	120
H3	120
H5	120
H6	120
H8	120
KU756223	120
GQ502217	120
		140		160		180		
H1	GAAGACGGCT	GTTTTTTTTA	GCTCTGTTAC	TATGATTATA	GGGGTTCCTA	CTGGTATAAA		180
H2	180
H3	180
H5	180
H6	180
H8	180
KU756223	180
GQ502217	180
		200		220		240		
H1	GGTGTTTACT	TGGTTATATA	TGTTGTTGAA	TTCGAGTGTT	AATGTTAGTG	ATCCGGTTTT		240
H2	240
H3	240
H5	240
H6	240
H8	240
KU756223	240
GQ502217	240
		260		280		300		
H1	GTGATGGGTT	GTTTCTTTTA	TAGTGTGTGT	TACGTTTGGG	GGAGTTACGG	GTATAGTTTT		300
H2	300
H3	300
H5	300
H6	300
H8	300
KU756223	300
GQ502217	300
		320		340		350		
H1	GTCTGCTTGT	GTGTTAGATA	ATATTTTGCA	TGATACTTGG	TTTGTGGTGG			350
H2	350
H3	350
H5	350
H6	350
H8	350
KU756223	350
GQ502217	350

Şekil 5: mt-CO1 gen bölgesinin sekanslarına ait alignment sonuçları. H1, H2, H3, H5, H6, H8: Sığır izolatlarına ait sekanslar, KU756223-GQ502217: Referans sekanslar.

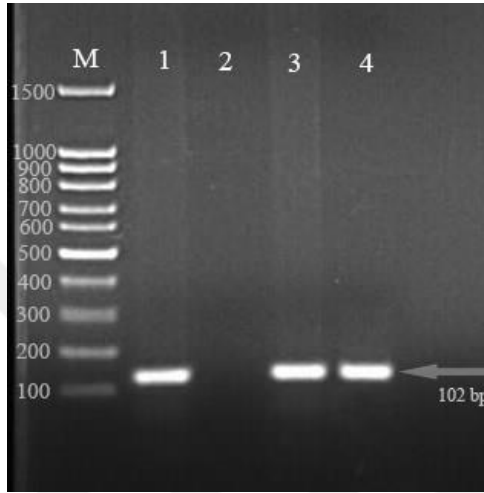
Yine CLC Main Workbench 8 programı yardımıyla Neighbor-Joining metodu (407) kullanılarak bootstrap testi (100 tekrar) ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 6).



Şekil 6: Sığır izolatlarına ait mt-CO1 gen sekansları ile referans sekanslar kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç görünümü.

5.4. AgB1 Gen Bölgesi PZR Bulguları

Çalışmada elde edilen gDNA'ların herbirinden AgB1 gen bölgesi ayrı ayrı PZR ile çoğaltılmıştır. Neticede 120 izolattın hepsinde AgB1 gen bölgesi başarılı bir şekilde çoğaltılmış ve 102 bp büyüklüğünde band elde edilmiştir (Şekil 7).



Şekil 7: *Echinococcus granulosus*'un sığır ve koyun izolatlarının AgB1 gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucunda oluşan bandların görünümü M: DNA marker (100 bp), 1: Pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol, 3: Koyun izolatı, 4: Sığır izolatı

5.6. AgB1 Gen Bölgesi Alignment ve Filogenetik Analiz Bulguları

AgB1 gen bölgesine ait 120 PZR ürünlerinin tek yönlü DNA dizi analizi yaptırılmıştır. Elde edilen sekans verileri BLAST search ile (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) GenBank'taki kayıtlı sekanslar (JN050886 ve AY773092) kullanılarak alignment yapılmıştır. CLC Main Workbench 8 (362) programı ile yapılan alignment Şekil 8'de gösterilmiştir. Buna göre öncelikle polimorfik olmayan 107 örneğin 54. nükleotidlerinde bir delesyonun mevcut

olduğu görülmüştür. Bununla birlikte; H1, H6 ve H34 numaralı örneklerin 23. nükleotidlerinde, H34'ün ayrıca 20. nükleotidinde, H3, H5, H8 ve H58 nolu örneklerin 21. ve 22. nükleotidlerinde ve E9 ve E56 nolu örneklerin 7. nükleotidlerinde ayrıca birer delesyon belirlenmiştir. Polimorfik örneklerdeki nükleotid değişimleri Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11: AgB1 geninde polimorfizm tespit edilen 13 örnekteki nükleotid değişimlerinin görünümü

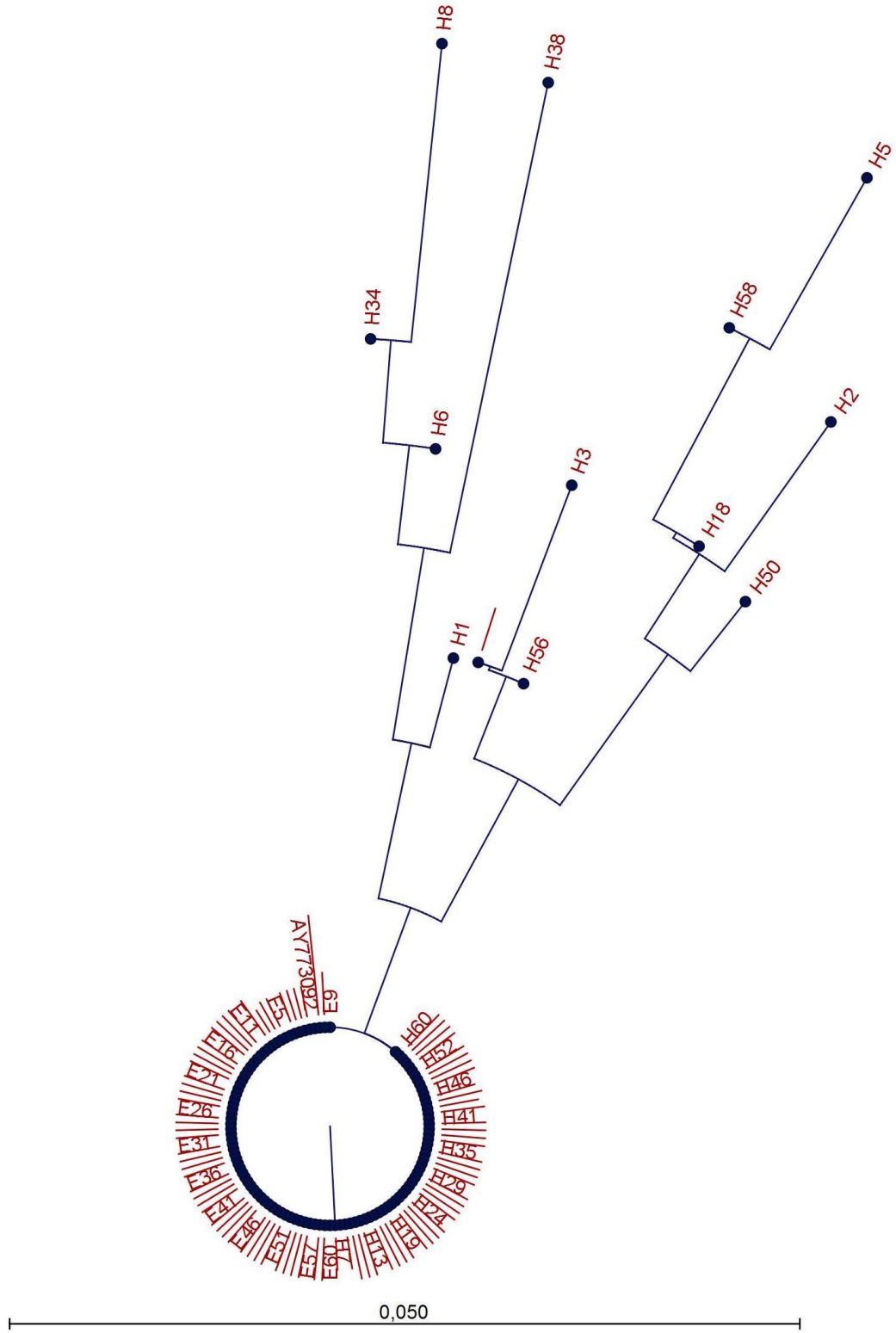
Örnek numarası	Nükleotid	Değişim
H1	53	G→C
	54	Delesyon→C
	56	G→T
H2	23	A→T
	54	Delesyon→A
	55	A→G
	56	G→C
H3	57	G→C
	20	A→G
	54	Delesyon→A
H5	55	A→C
	56	G→C
	20	A→G
	41	G→C
H5	54	Delesyon→A
	55	A→G

	56	G→C
	57	G→C
H6	53	G→C
	54	Delesyon→A
	55	A→T
	56	G→T
H8	6	C→G
	20	A→G
	53	G→C
	54	Delesyon→A
	55	A→T
	56	G→T
H18	54	Delesyon→A
	55	A→G
	56	G→C
	57	G→C
H34	53	G→C
	54	Delesyon→A
	55	A→T
	56	G→T
H38	53	G→C
	54	Delesyon→A
	55	A→G

	56	G→T
	59	T→A
	60	T→A
H50	23	A→T
	54	Delesyon→A
	55	A→G
	56	G→C
H56	54	Delesyon→A
	55	A→C
	56	G→C
H57	54	Delesyon→A
	55	A→C
	56	G→C
H58	20	A→G
	54	Delesyon→A
	55	A→G
	56	G→C
	57	G→C

Neighbor-Joining (363) metodu kullanılarak bootstrap testi (100 tekrar) ile filogenetik ağaç oluşturulmuş ve Şekil 9'da gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen 14 AgB1 ve 6 mt-CO1 örneklerine ait sekanslar GenBank'a submit edilmiş ve accession numaraları Tablo 12'de gösterilmiştir.



Şekil 9: *Echinococcus granulosus*'un sığır ve koyun izolatlarına ait AgB1 gen sekansları ile referans sekansların (JN050886 ve AY773092) oluşturduğu filogenetik ağaç görünümü

Tablo 12: Submit edilen sekanslara ait accession numaraları

Örnek No	Gen Bölgesi	Accession numarası
H1	mt-CO1	MH355547
H2	mt-CO1	MH355548
H3	mt-CO1	MH355549
H5	mt-CO1	MH355550
H6	mt-CO1	MH355551
H8	mt-CO1	MH355552
H1	AgB1	MH355553
H6	AgB1	MH355554
H8	AgB1	MH355555
H31	AgB1	MH355556
H34	AgB1	MH355557
H38	AgB1	MH355558
H57	AgB1	MH355559
H50	AgB1	MH355560
H56	AgB1	MH355561
H3	AgB1	MH355562
H2	AgB1	MH355563
H5	AgB1	MH355564
H18	AgB1	MH355565
H58	AgB1	MH355566

5.7. ELISA Bulguları

Bu çalışmada ELISA testinde cut-off değeri şu şekilde hesaplanmıştır:

- 3 adet negatif kontrol örneğinin ortalaması alınıp bu değere (X) denildi.
- 3 adet negatif kontrolün SD (Standart sapma) değeri hesaplandı.

*SD değeri ise şöyle hesaplandı:

- 3 adet negatif kontrol örneğinin aritmetik ortalaması alındı,
- Her bir negatif kontrol değerinin, negatif kontrol örneklerinin aritmetik ortalamasından farkı bulundu (Negatif kontrol - aritmetik ortalama),
- Bulunan farkların karesi alındı,
- Bu kareler toplandı,
- Toplam ikiye bölünüp sonuç SD değeri olarak alındı,
- $(X + 3SD)$ = cut-off değeri olarak ifade edildi ve bu değer üstü pozitif olarak değerlendirildi.

Değerlendirme işlemi sonucunda bu çalışmadaki koyun serumları ile yapılan ELISA’da cut-off değeri ‘0.517’ olarak hesaplanmıştır. Cut-off değerinin üzerindeki sonuçlar pozitif, altındaki değerler ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Buna göre, 60 hidatik kistli örneğin 45’i (%75) pozitif sonuç vermiştir.

Sığır örneklerinin cut-off değeri ise ‘3.0227’ olarak hesaplanmıştır. Cut-off değerinin üzerindeki sonuçlar pozitif, altındaki değerler ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara göre 60 hidatik kistli sığır serumunun 40 (%66.6)’ı pozitif bulunmuştur.

5.8. SDS-PAGE ve Western Blot Bulguları

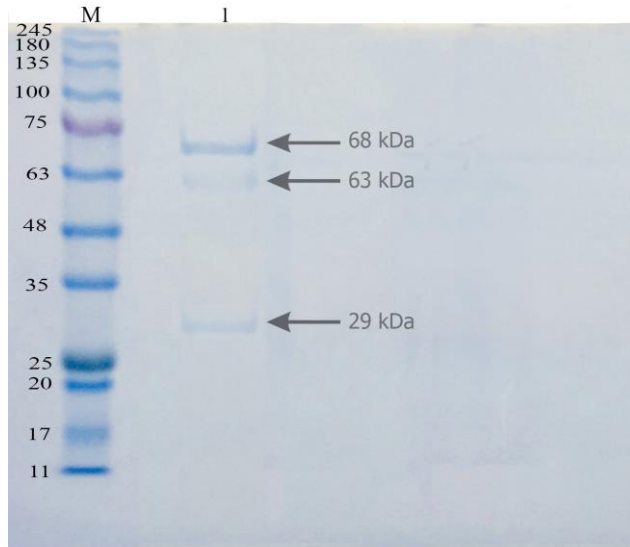
Koyun hidatik kist sıvısından hazırlanan AgB’den zengin kısmi pürifiye kist sıvısı antijeninin band profilleri SDS-PAGE ile ayrıştırılmış ve 29, 63 ve 68 kDa’luk üç band Şekil 10’de gösterilmiştir.

Western-blot neticesinde ise 120 hidatik kistli serumun 12 (%10)'sinde hiçbir band gözlenmemiş geri kalan örneklerde ise farklı sayılarda band profilleri elde edilmiştir (Tablo 13, Tablo 14).

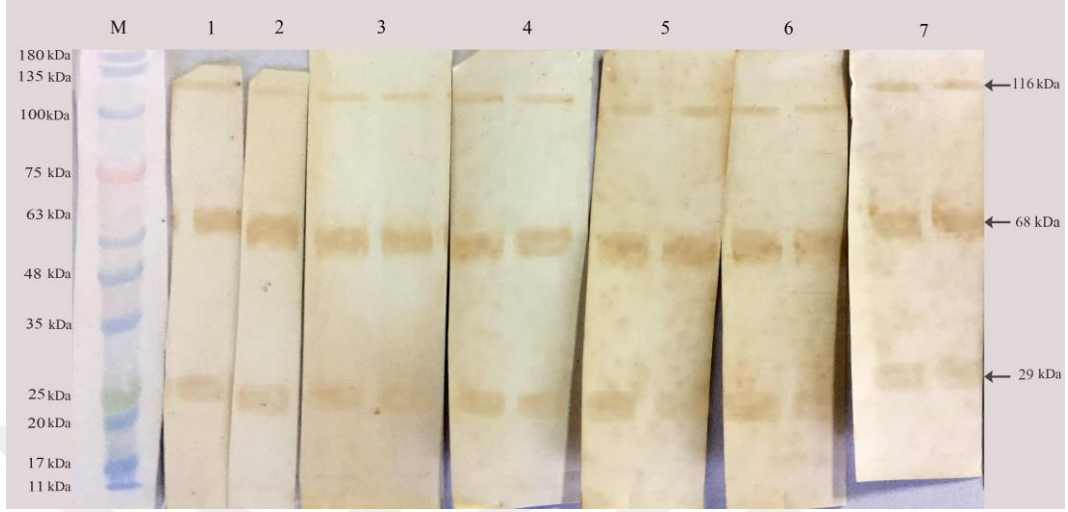
Elazığ ili mezbahanelerinden toplanan 60 serum örneğinin 5'inde 4 farklı band profili, 16'sında 3 farklı band profili, 20 serum örneğinde 2 farklı band profili, 12 serumda ise tek band profili bulunmuş, 7 serumda ise hiçbir band profiline rastlanılmamıştır. Erzincan ili mezbahanelerinden toplanan 60 serum örneği içerisinde ise 1 serum örneğinde 4 farklı band profili, 11 serum örneğinde 3 farklı band profili, 28 serum örneğinde 2 farklı band profili, 15 serumda ise tek band profili tespit edilmiş olup 5 serumda ise hiçbir band elde edilememiştir.

Çalışmada bakısı yapılan bütün örneklerde, en fazla örnekte tespit edilen band profilinin 68 kDa olduğu görülmüş ve bunun diagnostik band olarak kabul edilmesine karar verilmiştir (Şekil 11).

Çalışmada bakısı yapılan 60 sığır örneğinin 51 (%85)'i, 60 koyun örneğinin ise 38 (%63.3)'ü WB ile pozitif bulunmuştur.



Şekil 10: SDS-PAGE jel separasyonu sonucu oluşan band profilleri M: Marker, 1: Kısmi pürifiye hidatik kist sıvısı antijeni.



Şekil 11: Sığır ve koyun örneklerinin Western blot analizi sonucunda elde edilen spesifik band profillerinin görünümü (1-4: Sığır izolatları, 5-7: Koyun izolatları)

Bu çalışma ile DNA dizi analizi kullanılarak AgB1 geninde polimorfizm tespit edilen 13 hidatik kistli örneğin 9 (%69,2)'u ELISA ile 6 (%46,1)'sı da WB ile pozitif bulunmuştur. Öte yandan AgB1 geninde herhangi bir polimorfizm saptanmayan 107 örneğin 80 (%74,7)'i ELISA ile 75 (%70,9)'i de WB ile pozitif bulunmuştur.

Çalışmada gerek PZR gerekse serolojik olarak bakışı yapılan bütün örneklerin işlenmesi neticesinde elde edilen bulguların tamamı Tablo 13 (Elazığ örnekleri) ve Tablo 14 (Erzincan örnekleri)'de gösterilmiştir.

Tablo 13: Çalışmada Elazığ'dan toplanan 60 örneğe ait PZR, DNA Dizi Analizi, ELISA ve WB bulguları.

Örnek No (Elazığ)	Konak	12S rRNA- PZR	mt- CO1- PZR	AgB1- PZR	Dizi Analizi- Polimorfizm	ELISA	WB (kDa)
H1	Sığır	-	+++	+++	+	+	29,63,116
H2	Sığır	-	+++	+++	+	+	29,63,116
H3	Sığır	-	+++	+++	+	+	63, 116
H4	Sığır	+++		+	-	-	68, 116
H5	Sığır	-	+++	+++	+	-	68, 116
H6	Sığır	-	+++	+++	+	+	68, 116
H7	Sığır	+++		+	-	+	63,68,116
H8	Sığır	-	+++	+++	+	+	68, 116
H9	Sığır	+++		+++	-	+	68
H10	Sığır	+++		+++	-	+	68, 116
H11	Koyun	+++		+	-	+	63
H12	Sığır	+++		+++	-	+	29,63,116
H13	Sığır	+++		+++	-	-	68,116
H14	Sığır	+++		+++	-	-	68
H15	Sığır	+++		+++	-	-	29,68,116
H16	Koyun	+++		+	-	+	-
H17	Sığır	+++		+	-	+	68
H18	Sığır	+++		++	+	+	29,63,116
H19	Sığır	+++		++	-	+	29,68,116
H20	Koyun	+++		++	-	+	68,116
H21	Sığır	+++		++	-	+	29,63,68,116
H22	Sığır	+++		+++	-	-	29,63,68,116
H23	Koyun	+++		+	-	-	29,68,116
H24	Sığır	+++		+++	-	+	68
H25	Koyun	+		+	-	-	-
H26	Sığır	+++		+	-	-	63,68
H27	Sığır	+++		+++	-	-	63,116

H28	Sığır	+++	+	-	-	29,63,68
H29	Sığır	+++	+++	-	+	63,68
H30	Sığır	+++	+++	-	+	29,63,68
H31	Sığır	+++	+	-	-	68
H32	Koyun	+++	+++	-	+	29,63,68
H33	Sığır	+++	+	-	-	68
H34	Sığır	+++	+++	+	-	68,116
H35	Koyun	+++	+++	-	-	68,116
H36	Sığır	+++	+	-	-	29,63,68
H37	Koyun	+++	++	-	+	68,116
H38	Sığır	+++	+	+	-	68,116
H39	Koyun	+++	+	-	+	63,68,116
H40	Koyun	+++	+++	-	+	63,116
H41	Koyun	+++	+++	-	-	29,68,116
H42	Koyun	+++	++	-	-	-
H43	Koyun	+++	++	-	+	29,68,116
H44	Koyun	+++	++	-	+	63
H45	Koyun	+++	++	-	+	68
H46	Koyun	+++	++	-	+	68
H47	Koyun	+++	++	-	+	29,63,68,116
H48	Koyun	+++	++	-	-	63
H49	Koyun	+++	++	-	+	68
H50	Koyun	+++	++	+	+	29,68
H51	Koyun	+++	++	-	-	29,63,68,116
H52	Koyun	+++	+	-	-	29,63,68,116
H53	Koyun	+	++	-	-	29,63
H54	Koyun	+	++	-	-	-
H55	Koyun	+++	++	-	-	-
H56	Koyun	+++	++	+	-	63,68,116
H57	Koyun	+++	++	+	+	29,116
H58	Koyun	+++	++	+	+	-

H59	Koyun	+++	++	-	+	29,116
H60	Koyun	+++	++	-	+	-

Tablo 14: Çalışmada Erzincan'dan toplanan 60 örneğe ait PZR, DNA Dizi Analizi, ELISA ve WB bulguları.

Örnek No (Erzincan)	Konak	12S rRNA- PZR	mt- CO1- PZR	AgB1- PZR	Dizi Analizi- Polimorfizm	ELISA	WB (kDa)
E1	Sığır	+++	++	-	+	68	
E2	Sığır	+++	++	-	+	68,116	
E3	Sığır	+++	++	-	+	68,116	
E4	Sığır	+++	++	-	+	68,116	
E5	Sığır	+++	++	-	+	68,116	
E6	Sığır	++	++	-	+	68	
E7	Sığır	+	+	-	+	29,68	
E8	Sığır	+++	++	-	+	68,116	
E9	Koyun	+++	++	-	+	68,116	
E10	Koyun	+	++	-	+	68	
E11	Koyun	+++	++	-	+	68,116	
E12	Koyun	+++	+++	-	+	29,63,116	
E13	Koyun	+++	++	-	+	63,116	
E14	Koyun	+++	+++	-	+	-	
E15	Sığır	+++	+++	-	+	68,116	
E16	Sığır	+++	++	-	+	68,116	
E17	Sığır	+++	++	-	+	29,68,116	
E18	Sığır	+++	++	-	+	29,68,116	
E19	Sığır	+++	+	-	+	68	
E20	Sığır	+++	++	-	+	68	
E21	Sığır	+++	+++	-	-	29,63,116	
E22	Sığır	+++	+++	-	-	29,68,116	

E23	Sığır	+++	+++	-	-	68
E24	Sığır	+++	+++	-	-	29,68,116
E25	Sığır	+++	+++	-	-	63,68,116
E26	Sığır	+++	+++	-	+	68,116
E27	Sığır	+++	+++	-	+	29,68,116
E28	Sığır	+++	+++	-	+	63
E29	Sığır	+++	+	-	+	29,63,116
E30	Sığır	+++	+++	-	+	68
E31	Sığır	+++	++	-	+	29,63,68,116
E32	Sığır	+++	+++	-	+	68
E33	Sığır	+++	+++	-	+	29,63,68
E34	Sığır	+++	+++	-	+	29,68
E35	Sığır	+++	+++	-	+	29,68,116
E36	Sığır	+++	+++	-	+	68
E37	Koyun	+++	+++	-	+	63,68
E38	Koyun	+++	+++	-	+	68,116
E39	Koyun	+++	+++	-	+	68,116
E40	Koyun	+++	+++	-	-	-
E41	Koyun	+++	+	-	+	68
E42	Koyun	+++	+++	-	+	68
E43	Koyun	+++	+++	-	+	-
E44	Koyun	+++	+++	-	+	63,68
E45	Koyun	+++	+	-	+	63,116
E46	Koyun	+	+	-	+	68,116
E47	Koyun	+++	+	-	+	-
E48	Koyun	+++	+	-	+	-
E49	Koyun	+	+	-	+	68,116
E50	Koyun	+	+	-	+	68
E51	Koyun	+++	+	-	+	68
E52	Koyun	+++	+	-	+	63,68
E53	Koyun	+++	+++	-	+	68,116

E54	Koyun	+++	+	-	+	68
E55	Koyun	+++	++	-	+	63,68
E56	Koyun	+++	+	-	+	63,68
E57	Koyun	+++	++	-	-	68,116
E58	Koyun	+++	++	-	+	63,68
E59	Koyun	+++	+++	-	+	68,116
E60	Koyun	+++	+	-	-	68,116



6. TARTIŞMA

Kistik Ekinokokkozis (KE), *Echinococcus granulosus*'un neden olduğu dünyadaki en önemli zoonozlardan birisi olup, özellikle kırsal bölgelerdeki insan ve hayvanlarda sıkça rastlanmakta ve bu bölgelerde önemli halk sağlığı sorunlarına neden olmaktadır (1).

Echinococcus cinsinin sınıflandırması uzun zamandan beri hem erişkin hem de larval safhaların morfolojik tanısal karakterlerinin yetersizliğinden dolayı tartışmaya açıktır. Bu anlamda özellikle moleküler alandaki çalışmalar gün geçtikçe hızını artırarak devam etmekte olup, yeni tür ve suşlar bulunduğca farklı fikirler değerlendirilmektedir. Günümüzde, *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* ve *E. vogeli* olmak üzere kabul gören dört tür bulunmakta; *E. shiquicus*, *E. granulosus sensu stricto* (G1-3), *E. equinus* (G4), *E. ortleppi* (G5), *E. canadensis* (G6/7), *E. canadensis* (G8/10) ve *E. felidis*'in de yeni sınıflandırmada yer aldığı görülmektedir (287-289).

Echinococcus granulosus içerisindeki suş/türlerin tanımlanması ve gruplandırılmasında en çok PZR tabanlı yöntemler kullanılmaktadır. PZR, RFLP, PZR-RFLP, RAPD-PZR, SSCP ve DNA dizi analizi gerek parazitlerin genom araştırmalarında, gerekse tanıya yönelik moleküler çalışmalarda kullanılan temel tekniklerdir. Tek bir nükleik asidi bile gösterebilecek kadar güçlü bir çoğaltma tekniği olan PZR bugün en yaygın kullanılan yöntemlerden birisidir. DNA dizi analizleri yada sekanslama ise herhangi bir DNA parçasında bulunan A,G,T,C nükleotid sıralarının belirlenmesi olarak tanımlanabilmektedir. Bu çalışmada gerek hidatik kist örneklerinin tür/suş tayini gerekse AgB1 genindeki polimorfizmin belirlenmesi amacıyla PZR ve DNA dizi analizi metodları kullanılmıştır (275).

Echinococcus granulosus'un değişik izolatları içerisindeki genetik farklılıklar hastalığın yaygın olduğu bölgelerde etkenin patojenitesi, bulaşma şekli, hastalığın teşhis ve tedavi teknikleri, aşı ve ilaç geliştirme çalışmaları ve dolayısıyla hastalıkla mücadele ve eradikasyon çalışmaları üzerinde etkilidir. Bu çalışmanın amaçlarından biri de *E. granulosus*'un farklı izolatları içerisindeki genetik polimorfizmin belirlenerek suşların tespit edilmesi olmuştur. Türkiye'de *E.granulosus*'un genotiplerini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda; 2008 yılında yapılan kapsamlı bir çalışmada Elazığ, Erzurum, Malatya ve Diyarbakır illerinden elde edilen 179 koyun, 19 sığır, 7 keçi, 1 deve ve 1 insan izolatının hepsi yaygın koyun suşu (G1) olarak genotiplendirilmiştir (305). Bir yaban koyununda (*Ovis gmelinii anatolica*) 2009 yılında Türkiye'de ilk kez yaygın koyun suşu (G1) olduğu saptanmıştır (306). Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen 100 koyun ve 12 sığır izolatının mt-CO1 gen bölgesi DNA dizi analiziyle incelenmiş ve 98 koyun ile 9 sığır izolatı G1, 2 koyun ve 3 sığır izolatı da G3 suşu olarak belirlenmiştir (308). Erzurum ilinden 2010 yılında elde edilen 220 sığıra ait hidatik kist materyalinde yapılan bir çalışmada 12S rRNA gen bölgesi analizine göre 147 rneğın G1-G3 complex (*E. granulosus sensu stricto*) olduğu, bunların 28'inin DNA dizi analiziyle G1 suşu olduğu teyid edilmiştir. Kalan 73 rneğın 7'sinde ise DNA dizi analiziyle G3 suşu belirlenmiştir (251). Kırıkkale ilinde 24 koyunda hidatik kist rneğının hepsi G1 suşu olarak belirlenmiştir (314). Trakya bölgesinde 42 insan, 13 sığır ve 3 koyun izolatında yapılan çalışmada PZR-RFLP ve PZR-SSCP metodları ile ITS-1 ve NAD1 gen bölgeleri kullanılarak sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda koyun ve sığır izolatlarının tamamında yaygın koyun suşu (G1), insan izolatlarında ise G1 ve G7 suşları belirlenmiştir

(317). Manisa ilindeki sığırlarda yapılan başka bir çalışmada ise 2010-2012 yılları arasında toplanan 18 sığır izolatının hepsinin *E. granulosus sensu stricto* (G1-G3) olduğu belirlenmiştir (319).

Bu çalışmada, öncelikle 12S rRNA gen bölgesi spesifik primerler ile çoğaltılmış, 120 izolatın 114 (%95)'ünde pozitif yanıt alınmış ve bu örnekler *E. granulosus sensu stricto* olarak adlandırılmıştır. Geri kalan 6 izolatın ise mt-CO1 gen bölgesi çoğaltılmış ve dizi analizi neticesinde *E. granulosus sensu stricto* olduğu belirlenmiştir. GenBank'daki referans sekanslar ile yapılan alignment değerlendirilmesinde, bu 6 izolatın 4'ünde *E. granulosus sensu stricto* ile %100 benzerlik bulunmuş, sadece iki izolatın (H3 ve H6) 24. nükleotitinde bir nükleotid değişimine rastlanmış ancak bunlar da *E. granulosus sensu stricto* olarak tanımlanmıştır. Ülke genelinde yapılan çalışmalarda incelenen örneklerin %98'inden fazlasının *E. granulosus sensu stricto* olduğu düşünüldüğünde bu çalışmada elde edilen bulgular önceki çalışmalar ile benzer bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen örneklerde farklı suşlar tespit edilemediği için suş farklılığı ile AgB1 gen polimorfizmi arasındaki ilişki de belirlenememiştir.

Echinococcus türlerini tanımlamak için yapılan çalışmalarda mitokondriyal DNA'nın haploid özellik göstermesi nedeniyle daha açık bir şekilde tanımlanabilmesi, evrim hızının nükleer DNA'ya göre 10-20 kat daha fazla olması, homoplazmik oluşu, rekombinasyon göstermemesi gibi avantajları nedeniyle mt-CO1 gen bölgesinin tercih edildiği görülmektedir (33, 293, 364). Bu nedenle mevcut çalışmada da kesin tür tayini ve filogenetik analiz için DNA dizi analizinde mt-CO1 gen bölgesi tercih edilmiştir.

Kistik ekinokokkozisin tanısı görüntüleme teknikleri ve immunolojik testler ile yapılmaktadır. Serolojik tanıda çoğunlukla serumda antikor ve daha az olarak da dolaşımdaki antijenlerin tespitine dayanmaktadır. İmmunodiagnoz, primer tanı için gerekli olup cerrahi müdahale ve ilaç tedavisinin izlenmesinde de önemli bir role sahiptir (365, 366). Serolojik tanı için hidatik kist sıvısı esas antijen kaynağı olarak kullanılmıştır (358). Fakat ham kist sıvısı antijeni, diğer helmint parazit antijenleri ile sebep olduğu çapraz reaksiyonlar yüzünden güvenilir sonuçlar vermemektedir (347). Bu sınırlama nedeniyle serodiagnoz sonuçlarının daha güvenilir hale gelmesi için ya rekombinant ya da pürifiye antijenlerin kullanılması tavsiye edilmektedir (367).

Antijen B (AgB), *E. granulosus*'un larval dönemlerinde hem kistin germinal membranından hem de protoskolekslerden salgılanan önemli bir antijendir (341). Lipoprotein yapıda, 8 kDa'luk monomerlerden ibaret olup, yüksek derecede polimorfizm göstermektedir. Son yapılan moleküler çalışmalar, AgB'nin bir multigen ailesi tarafından kodlandığını ve en az 5 gen lokusunun olduğunu göstermektedir (342). Bunlar, AgB1, AgB2, AgB3, AgB4 ve AgB5 olarak isimlendirilmektedir (343-347). Bu gen ailesi iki farklı gruba ayrılmaktadır. Bunlardan birincisi AgB1-AgB3-AgB5 diğeri ise AgB2-AgB4'tür. Parazit biyolojisinde AgB'nin rolü halen tam olarak bilinmemektedir. Fakat genel olarak AgB'nin konak-parazit ilişkisinde anahtar bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bu varsayıma göre, AgB konak proteazları üzerinde inhibitör bir etkiye sahip olup immunomodülatör bir kapasiteye ve lipid bağlama özelliklerine de sahiptir (343, 348, 366, 368, 369).

Parazit enfeksiyonuna karşı konak yanıtı proteaz üretimi ile başlamakta ve kist duvarı ve sıvısında metalloproteaz 9 ve Cathepsin-K gibi proteolitik aktivitelere yol açmaktadır. Ancak konak proteazlarının AgB tarafından inhibisyonu, parazitin hayatta kalma stratejisine katkı sağlamaktadır (370, 371). AgB'nin 12 kDa'luk alt ünitelerinin, bir proteaz inhibitörü olduğu, nötrofil gelişimini inhibe edebildiği ve bu yüzden parazitin konağın erken doğal bağışıklığından kurtulmasında kritik bir rol oynadığı da bildirilmektedir (343).

Echinococcus'ların, antijen kodlayan genlerinde sayısız sinonim olmayan nükleotid değişimleri bulunmuştur. Bunun konak immün yanıtı tarafından oluşturulan güçlü bir doğal seleksiyonun sonucu olduğu muhtemeldir. AgB kodlayan genler, doğal seleksiyon baskısı altında olup seleksiyonun nasıl aktivite gösterdiği hala belirsizdir. Bu değişikliklerin adaptif moleküler evrimleşmeye neden olduğu bunun neticesinde mutasyonların şekillendiği gösterilmiştir (346). Sığırların yaşam sürelerinin koyunlardan daha uzun olması nedeniyle sığır hidatik kistleri konak reaksiyonuna daha uzun süre maruz kalabilmektedirler. Bu çalışmada AgB1 geninde polimorfizm belirlenen 13 izolatın 9'unun sığırlara ait olması sebebiyle sığırlarda bu tür bir polimorfizmin daha çok şekillendiği düşünülmüştür.

Farklı coğrafik bölgelerden elde edilen *E. granulosus* izolatlarında AgB1 nükleotid sekans farklılıkları araştırılmış ve aminoasit sekanslarında farklılıklar belirlenmiştir. Bu durumun da farklı populasyonlarda parazitin morfolojik, biyokimyasal ve genetik özellikleri ile ara ve sonkonak kullanımında değişikliklere yol açtığı vurgulanmıştır (358). AgB'deki genetik varyasyon nedeniyle farklı konaklarda değişik seviyelerde şekillenen immün yanıtın AgB'nin farklı KE hastalarında değişik immunojenik yanıtlar oluşturmasına neden olduğu ileri

sürülmüştür (359). AgB'yi kodlayan gendeki varyasyonun analiz edilmesinin AgB'nin fonksiyonel önemi ile suşların genetik çeşitliliği arasındaki korelasyonun anlaşılmasına yardımcı olacağı belirtilmiştir (354).

Hindistan'da sığır, manda, koyun ve keçilerden elde edilen 110 kist materyalinde AgB1 polimorfizmine PZR-SSCP analiziyle bakılmış ve 14 farklı band profili belirlenmiştir. Bu polimorfizm DNA sekans analiziyle de teyid edilmiş ve AgB1'in pozitif seleksiyon baskısı altında olduğu belirtilmiştir. Başka bir çalışmada ise fertil, steril ve kalsifiye manda kistlerinden elde edilen izolatlarda AgB1-5 gen ekspresyonu araştırılmıştır. Buna göre kalsifiye olmaya başlamış kistlerde en fazla AgB1'in, fertil kistlerde AgB2 ve AgB4'ün eksprese olduğu, AgB3 en az kalsifiye kistlerde ve AgB5 ise erişkin dönemden eksprese edildiği bildirilmiştir (342).

Mısır'da insan, deve, domuz ve koyun izolatlarındaki AgB2 gen polimorfizmi *AluI* ve *EcoRI* restriksiyon enzimleri kullanılarak PZR-RFLP tekniğiyle araştırılmıştır. Araştırmacılar (356), bakısını yaptıkları bütün örneklerde *AluI* enzimiyle benzer band profilleri elde ettiklerini, seçilen bazı örneklerin DNA sekans analizi neticesinde insan izolatlarının koyun izolatlarına %100, deve izolatlarına %99 ve domuz izolatlarına ise %96 benzerlik gösterdiğini ortaya koymuşlardır. PZR ve RT-PZR'yi takiben klonlama ve sekans analiziyle yüksek derecede AgB2 sekans polimorfizmi belirlenmiştir.

Başka bir çalışmada ise AgB2'yi kodlayan genin suşlar arasındaki varyasyonunu belirlemek amacıyla PZR-SSCP analizi uygulanmış ve suşlar arası varyasyon belirlenmiştir (390). AgB2 ile ilişkili genin G1/G2 suşu ile G6/G7

suşlarının ayrı ikişer grup olduğu ve G5'in de bunlardan farklı olduğu belirlenmiştir (357).

Türkiye'de yapılan bir çalışmada ise 43 sığır, 25 koyun ve 31 insan izolatta AgB1 gen polimorfizmine PZR-SSCP analiziyle bakılmıştır. Öncelikle tüm örneklerin 12S rRNA-PCR analizi gerçekleştirilmiş ve tüm izolatların *E. granulosus sensu stricto* olduğu belirlenmiştir. 16 insan, 35 sığır ve 25 koyun izolatu olmak üzere toplamda 74 izolatın PZR-SSCP analizi gerçekleştirilmiştir. SSCP sonuçlarına göre sığır ve insan izolatlarının her birinde farklı band profilleri oluşmuş, DNA sekans analizleri ile bu izolatlardaki polimorfizm teyid edilmiştir (360).

İran'ın güneyinde 2018 yılında yapılan bir çalışmada, *E. granulosus*'un ara konakları arasındaki rekombinant AgB8/1 gen bölgesi çoğaltılarak genetik çeşitlilik değerlendirilmiştir. On koyun, 9 sığır ve 9 insan izolatu olmak üzere toplamda 28 kist izolatu toplanıp PZR ve DNA sekans analizi gerçekleştirilmiş ve polimorfizme bakılmıştır. GenBank'daki referans sekanslar göz önüne alınarak değerlendirme yapıldığında *E. granulosus* AgB8/1'in sığır, koyun ve insan izolatlarının arasında yakın bir benzerlik bulunduğu ortaya konulmuştur (372).

İran'da yapılan başka bir çalışmada ise, *E. granulosus*'un insan, koyun, sığır, deve ve keçi izolatlarında AgB2'nin genetik varyasyonu araştırılmıştır. Arakonakların herbirinden 10 olmak üzere toplamda 50 izolatın *AluI* enzimi kullanılarak PZR-RFLP ve akabinde DNA sekans analizleri yapılarak izolatların AgB2'deki gen polimorfizmine bakılmıştır. Neticede AgB2 geni koyun ve insan izolatlarında yüksek derecede genetik benzerlik gösterirken, sekans analiziyle İran

izolatları arasında yüksek derecede AgB2 sekans polimorfizmi belirlenmiştir. Bu farklılıkların, AgB'nin kullanıldığı herhangi bir teşhis kitinin performansını etkileyebileceği ileri sürülmüştür (373).

Bu çalışmada ise, *E. granulosus*'un 60 sığır ve 60 koyun izolatındaki AgB1 gen polimorfizminin belirlenmesinde DNA dizi analizi kullanılmış ve 13 örnekte (%10.8) farklı oranlarda polimorfizm gözlenmiştir. Genel polimorfizm yüzdesinin düşük olmasının sebebinin dizi analizi yapılan bölgenin 102 bp gibi nispeten kısa bir gen bölgesinin kullanılmasının olabileceği düşünülmüş, AgB ve subunitlerine ait daha uzun gen bölgelerinin analiz edilmesiyle daha yüksek oranda polimorfizmlerin belirlenebileceği kanaatine varılmıştır.

Bu çalışmada dizi analizi ile 13 polimorfik örnekte farklı oranlarda nükleotid değişimleri saptanmıştır. Bu izolatların 9'unun sığır, 4'ünün de koyunlara ait olduğu görülmüştür. AgB1 gen polimorfizminin sığır izolatlarında koyunlara göre daha fazla görülmesinin sebebi hidatik kistlerin sığırlardaki yaşam süresinin daha uzun olmasıyla ilişkili olabilir.

Echinococcus granulosus suşlarının farklı arakonaklara adapte olması nedeniyle, antijen kodlayan genlerinde de farklılık olabileceği beklenmektedir. AgB1 ile ilişkili sekansların farklı konak ve coğrafik orjinlerden elde edilen örneklerde polimorfizm gösterdiği bildirilmiştir (358). Buna ek olarak AgB1 kısmi sekanslarının *E. granulosus*'un 4 farklı suşu arasında genetik çeşitlilik gösterdiği rapor edilmiştir (353). AgB1 ve AgB3'ün 5 farklı *E. granulosus* suşları arasındaki polimorfizmi araştırılmış, AgB1 sekanslarında 19 polimorfik bölge, AgB3 sekanslarında ise 42 polimorfik bölge tespit edilmiştir (374). Bütün AgB genlerinin,

G1 ve G7 suşlarının genomlarında mevcut olduğu ancak AgB5'in G5, G6 ve G7'de tespit edilemediği bildirilmiştir (374). Bu çalışmada da, *E. granulosus sensu stricto* olarak tespit edilen 120 örneğin 13'ünde sekans analiziyle genetik farklılık tespit edilmiştir. AgB1 genindeki bu genetik varyasyonun konak yanıtı tarafından oluşturulabileceği düşünülmüştür. Yine AgB1 genindeki pozitif seleksiyon baskısının bu nükleotid değişikliklerine sebep olabileceği bildirilmektedir. AgB1-AgB3-AgB4'ün pozitif seleksiyon baskısı altında olduğu zaten gösterilmiştir. Nitekim bu genlerin kodladığı antijenlerin, antikorların ve T hücre reseptörlerinin muhtemel hedef bölgeleri olmaları nedeniyle antijenik değişimlerin olabileceği de rapor edilmiştir (346).

Mamuti ve ark. (359), AgB'deki genetik çeşitlilik nedeniyle konak immun yanıtının farklı seviyelerde cevap oluşturduğunu, bunun da farklı KE hastalarında farklı immunolojiye yol açtığını bildirmişlerdir. Buna ek olarak, AgB kodlayan genlerdeki varyasyon analizinin AgB'nin fonksiyonel ve pratik önemi ile suşların genetik farklılığı arasındaki korrelasyon ile ilişkilendirilebileceği gösterilmiştir. AgB genindeki varyasyonun bilinmesi *E. granulosus*'un konaklarına adaptasyon mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı olacak ve diagnostik testler, antelmantik ilaçlar ve immunoprofilaktik ajanların uygulanması ve dizaynında faydalı olabileceği ifade edilmiştir (354).

Rekombinant AgB kullanılarak yapılan çalışmalarda, bu antijenin hastalar arasında farklı humoral cevaplara neden olduğu gösterilmiştir (352). Buna ek olarak, humoral yanıtta bu varyasyonun AgB subunitlerinin kompozisyon ve yapısındaki varyasyonla da ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (350). Yine, AgB gen ailesinin kendi içinde ve bireyden bireye farklı olarak eksprese olabileceği ileri

sürülmüş ve immun yanıtlardaki farklılık buna bağlamıştır (347). Yine konak molekülleri ve hücreleriyle yakın ilişkisinin AgB proteinlerini antijenik varyasyona yatkın hale getirdiği ileri sürülmüştür (354). Rekombinant AgB8 (AgB'nin 8kDa'luk subunitine karşı oluşturulmuş protein) subunitlerine karşı oluşan humoral immun yanıt, kist hidatikli insanlarda araştırılmış ve AgB3'ün AgB1 ve AgB2'ye göre daha az antijenik olduğu belirlenmiş, AgB2'nin en iyi tanısal performansa sahip olduğu ortaya konmuştur (352). AgB2'nin de AgB4 ile %70 oranında aminoasit sekansı benzerliği göstermesi ve ortak epitoplarının bulunması nedeniyle ELISA ile belirlenen pozitifliklerinin benzer olduğu tespit edilmiştir (355).

SDS-PAGE, protein karışımlarının poliakrilamid jel içerisinde analizine dayanmakta olup, proteinleri göstermekte mikrogramla ifade edilecek bir hassasiyete sahiptir. Klasik elektroforetik yöntemler içerisinde modifiye edilmiş çok farklı jel sistemleri olmasına rağmen SDS-PAGE bunların en popüler olanlarından biridir. Yöntemin en önemli özelliklerinden birisi çok sayıda protein karışımlarının analizine imkân sağlamasıdır (284).

Western-blot ile ayrıştırılan proteinlerin jellerden membranlara transfer yöntemlerinin geliştirilmesi ile proteinlerin elektroforetik analizi için yeni bir devir açılmıştır. Western blot veya immunoblot olarak adlandırılan bu biyokimyasal yöntemler bir membran üzerine sabitleştirilmiş proteinleri tanımlamak ve bunların daha sonra immunolojik yöntemlerle görüntülenmesini sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Bu transfer yöntemi 'blotting' olarak isimlendirilmektedir. Çünkü elektroforez ile jel içinde ayrıştırılan proteinlerin transfer edildikleri nitrosellüloz membran üzerindeki band örnekleri, orijinal jel üzerindeki örneklerin tam olarak kopyasıdır (284).

Burgu ve ark. (375), SDS-PAGE ve Western-blot yöntemlerini kullanarak koyun karaciğer kist sıvısı protein band profillerini ortaya koymuşlar, daha sonra da koyun ve insanlar için spesifik kist hidatik protein bandlarını belirlemiştir. Bu amaçla 30 pozitif koyun serumu, 20 negatif koyun serumu, 1 non-enfekte koyun serumu, 10 pozitif insan serumu ve 10 negatif insan serumu kullanmışlar, SDS-PAGE analizinde moleküler ağırlığı 8, 16, 24, 38, 58, 68, 98, 116, ve 200 kDa olan 9 spesifik protein bandı belirlemiştir. Bu proteinlerin nitrosellüloz membrana transferi sonrası 30 pozitif koyun serumunun 29'unda 116 kDa, 25'inde 98 kDa, 17'sinde 68 kDa, 11'inde 58 kDa ve 12'sinde 38 kDa'luk bandları tespit etmişlerdir. Öte yandan 20 negatif koyun serumunun tamamında 98 kDa'luk band profilinin oluştuğu, 68 kDa'luk bandın 17 adet serumda, 58 kDa'luk bandın ise 11 serumda mevcut olduğu, 38 kDa'luk bandın 14 serumda var olduğu, 116 kDa'luk bandın ise sadece bir serumda gözleendiği ve 98 ve 68 kDa'luk bandların ise sadece non-enfekte koyun serumunda oluştuğunu ortaya koymuşlardır. Koyun kist hidatik hastalığı için spesifik protein bandınının 116 kDa, insan kist hidatik hastalığı için spesifik protein bandlarınının ise 68 ve 8 kDa olduğunu rapor etmişlerdir.

Şimşek ve ark. (2)'nin 2006 yılında, koyun ham kist sıvısı antijeni ile kısmi pürifiye kist sıvısı antijeninin (AgB) antijenik özelliklerinin SDS-PAGE ile araştırılması amacıyla yaptıkları bir çalışmada, koyun ham hidatik kist sıvısının SDS-PAGE analizinde moleküler ağırlıkları 8 ile 205 kDa arasında değişen 15 farklı polipeptid band profili tespit etmişler, kısmi pürifiye antijenin elektroforezi sonucunda moleküler ağırlığı 16 ile 68 kDa arasında değişen 6 farklı band ortaya konmuşlar, her iki antijende de en belirgin band profilinin 66 kDa'luk band olduğu ifade etmişlerdir. Bunun yanısıra kısmi pürifiye kist sıvısı antijeninin

elektroforezinde AgB'nin düşük moleküler ağırlıklı (16, 24, 29 kDa) 3 subunitini de göstermişlerdir.

Moro ve ark. (376)'nın 1997 yılında koyun hidatidosisine yönelik yaptıkları bir çalışmada, sensitivite ve spesifite oranlarını Western blot metoduyla araştırmış ve bu oranları sırasıyla %73 (69/94) ve %98.7 (1/79) olarak belirlemişlerdir. İncelenen koyun örneklerinde 8, 16 ve 21 kDa'luk band profillerinin değişik oranlarda tespit edildiği, koyun hidatidosisinin sero-diagnozunda orta derecede sensitivite ve yüksek seviyelerde spesifiteye sahip olduğunu belirlemişlerdir.

SDS-PAGE ve Immunoblotting teknikleri kullanarak *E. granulosus*'un hidatik kist sıvısı antijenlerinin karakterizasyonuna yönelik yapılan bir çalışmada ise 12 ve 16 kDa'luk polipeptidlerin hidatik kist için spesifik olduğu bildirilmiştir (377). Benzer bir çalışmada ise yine SDS-PAGE ve Immunoblotting teknikleri kullanarak hidatik kist sıvısı antijenlerinin karakterizasyonu yapılmış ve 8 kDa'luk polipeptidin hidatik kist için spesifik olduğu bildirilmiştir (378).

Koyun hidatik kist sıvısının SDS-PAGE ve akabinde Western-blot analizleri ile değerlendirilmesine yönelik başka bir çalışmada ise, SDS-PAGE ile molekül ağırlığı 8-116 kDa arasında değişen en fazla 15 farklı polipeptid band elde edilmiş ve bunlar içerisinde en belirgin olanının 66 kDa'luk polipeptid bandı olduğu, sadece bir koyunda ise 20 kDa'luk band elde edildiği bildirilmiştir. Yine aynı araştırmacılar hidatidozisli insan serumunda molekül ağırlığı 8-116 kDa arasında değişen 12 farklı polipeptid bandı saptamışlar, 8 ve 116 kDa'luk band profillerinin bütün hidatidozlu insan serumlarında oluştuğunu ortaya koymuşlar ancak kontrol grubu ve başka enfeksiyonlu hasta serumlarında bu band profillerine rastlanmadığını ve bu iki bandın hidatidosisin teşhisinde %100 sensitivite ve spesifiteye sahip olduğunu

bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada 16, 24, 38, 45 ve 58 kDa'luk polipeptid bandlarının bütün hidatidosisli hasta serumlarında saptanmasına rağmen, bu bandlara başka bir enfeksiyonlu bazı hasta serumlarında da rastlanmasının bu bandların spesifik olmadığı anlamına geldiği ifade edilmiştir (379).

Koyun fertil kist sıvısının SDS-PAGE yöntemi ile araştırılmasına yönelik başka bir çalışmada ise gümüş boyama neticesinde 20, 58, 94, 116 ve 200 kDa'luk bandlar elde edilmiş olup jelin blotlanıp insan serumu ile muamelesi sonucunda 20, 66 ve 200 kDa'luk bandların oluştuğu bildirilmiştir (380).

Bu çalışmada, SDS-PAGE ve Western-blot analizlerinde hidatik kist ile enfekte bir koyunun karaciğerinden elde edilen kist sıvısından hazırlanan AgB'den zengin kısmi pürifiye kist sıvısı antijeni kullanılmış ve SDS-PAGE analizi sonucunda 29, 63, 68 kDa'luk bandlar elde edilmiştir. Takiben hidatik kistli 60 sığır ve 60 koyun serumu kullanılarak yapılan Western-blot analizi neticesinde 108 örnekte farklı sayıda olmak üzere 29, 63, 68, 116 kDa'luk bandlar elde edilmiştir. Kalan 12 örnekte ise Western-blot analizi sonucunda hiçbir band profili elde edilememiştir. Western blot işleminde elde edilen bandlar önceki çalışmalarda tespit edilenlerle uyumlu olup, 108 örneğin 89 (%82.4)'unda 68 kDa'luk band elde edilirken, 63 (%58.3)'ünde 116 kDa'luk band, 37 (%34.2)'sinde 63 kDa ve 35 (%32.4)'inde de 29 kDa'luk bandlar tespit edilmiştir. Görüldüğü üzere literatür bilgisiyle uyumlu olarak diagnostik band olarak 68 kDa belirlenmiştir.

Antijen-antikor kompleksine enzim ile işaretli antiglobulinin ilave edilip ardından da substrat konulması sonucu renk değişiminin oluşup oluşmamasını temel alan bir yöntem olan ELISA, Enzyme Immun Assay (EIA) olarak da isimlendirilmektedir. Renk oluşumu enzim aktivasyonuna bağlı olup, enzim ile

etkilenen substratın spektrofotometrik değeri (optik dansite: OD) antijen-antikor kompleksi ile orantılıdır (281, 282).

ELISA testinde polistren plaklara emdirilmiş antijen molekülleri ve anti-immünglobulin eklenmiş renksiz enzimin bulunduğu ortama şüpheli serum dökülür. Serumda antikor varsa antijen-antikor-anti-immünglobulin kompleksi meydana gelir ve enzim kromojen madde bağlı substrat ile birleşir. Test ELISA okuyucu ile değerlendirildiğinde absorbans ölçümleri kriter alınır ve belli bir eşik değerin (cut-off) üstü pozitif kabul edilir. Hidatidosisin tanısında kullanılan yöntemlerden biri olan ELISA yöntemi, yüksek duyarlılık gösterip, çok az miktarlardaki serumun bile yeterli olması, kesin kantitatif ölçmeye imkan vermesi ve kısa sürede çok fazla sayıda örneğin işlenmesine olanak sağlaması açısından rutin kullanıma uygun, duyarlı, özgül ve ekonomik bir teşhis yöntemidir (283).

Ibrahim ve ark (381), koyun ham kist sıvısı antijeni, kısmi pürifiye kist sıvısı antijeni (AgB) ve rekombinant AgB'yi kullanarak uyguladıkları ELISA testinde ham kist sıvısı antijeninin sensitivitesini %32, spesifitesini %90; kısmi pürifiye kist sıvısı antijeninin sensitivitesini %88, spesifitesini %95 olarak belirlemişler, rekombinant AgB için ise bu oranları sırasıyla %28 ve %95 olarak bildirmişlerdir. Türkiye'de ELISA'yı koyun ham kist sıvısı antijenini kullanarak uygulayan Şimşek ve Köroğlu (201), koyun hidatidozunun serodiagnozunun belirlemeye dayalı yaptıkları çalışmada testin sensitivitesini %60, spesifitesini %94 olarak belirlemişlerdir. Gatti ve ark (382) total kist sıvısı, pürifiye kist sıvısı ve pürifiye lipoprotein antijenlerini kullanarak koyunlarda uyguladıkları ELISA testinde en yüksek sensitiviteyi total kist sıvısı antijeninden (%77,8-89,2) ve en yüksek spesifiteyi de pürifiye kist sıvısı (%93,9-99,4) antijeninden elde etmişlerdir. Yong

ve ark (383) koyun hidatik kist sıvısından hazırladıkları antijenleri kullandıkları ELISA testini deneysel enfekte koyunlarda uygulamışlar ve %32 sensitivite, %65 spesifite elde etmişlerdir. Türkiye’de Şimşek ve ark.(2)’nin yılında, koyun ham kist sıvısı antijeni ile kısmi pürifiye kist sıvısı antijeninin (AgB) antijenik özelliklerinin koyun hidatidosisinde ELISA ile araştırılması temel alınarak yapılan çalışmada kısmi pürifiye kist sıvısı antijeninin (AgB) sensitivitesi %91.6, spesifitesi %77.1 olarak belirlenmiş; ham kist sıvısı antijeni için ise bu oranların sırasıyla %79.1 ve %60.4 olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada ise, AgB’den zengin kısmi pürifiye kist sıvısı antijeni kullanılarak ELISA ile bakısı yapılan 120 örneğin 85 (%70.8)’i pozitif olarak bulunmuştur. Görüldüğü üzere ELISA’nın sensitivitesi Western blot’tan daha düşük olmuştur.

AgB, arakonaklarda hem hücresel hem humoral yanıtı uyandır, kronik hidatik kist vakalarında kistin oluşması ve hayatta kalmasından sorumlu olan konak-parazit iletişimini sağlayan bir immünoregülatör molekül olarak işlev yapar. AgB’nin polimorf nükleer hücre oluşumunu engellediği ve Th1-Th2 dengesini koruyucu olmayan Th2 yanıtı yönünde bozduğu ve uyarılmış nötrofillerden H₂O₂ üretimini azalttığı bildirilmiştir. Bu sonuçlar göstermiştir ki, AgB direkt veya indirekt olarak çeşitli seviyelerde konak immün yanıtı müdahale etmektedir (343, 384).

Sonuç olarak, bu tez çalışması ile PZR ve DNA dizi analiziyle bakısı yapılan 120 sığır ve koyun hidatik kist örneğinin hepsi *E. granulosus sensu stricto* olarak belirlenmiştir. Bu 120 izolatın 13’ünün AgB1 geninde çeşitli derecelerde polimorfizmler belirlenmiştir. AgB1 geninde polimorfizm olan bu 13 hidatik kistli örneğin 9 (%69.2)’u ELISA ile 6 (%46.1)’sı da WB ile pozitif bulunmuştur.

Bununla birlikte AgB1 geninde herhangi bir polimorfizm saptanmayan 107 örneğin 80 (%74,7)'i ELISA ile 75 (%70,9)'i de WB ile pozitif olarak tespit edilmiştir. Görüldüğü üzere AgB1 polimorfizmi ile serolojik yanıt arasında bir ilişki mevcut olup, daha uzun gen bölgelerinin analiz edilmesiyle farklı oranlarda polimorfizmlerin belirlenebileceği ve bunun serolojik yanıt üzerindeki etkilerinin de daha iyi anlaşılabilceği kanaatine varılmıştır.



7. KAYNAKLAR

1. Rickard MD, Lightowers MW. Immunodiagnosis of Hydatid Disease, In: Thompson RCA (Ed). The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease. George Allen and Unwin. London, 1986; 217-249.
2. Şimşek S, Ütük AE, Köroğlu E. Hidatik Kist Sıvısından Antijen B (Agb)'nin Kısmi Purifikasyonu ve Koyun Hidatidosisinin Tanısındaki Etkinliği. Fırat Üniv Sağ Bil Derg. 2006; 20(5): 337-340.
3. Eckert J, Gemmell M.A, Meslin F.-X, Pawlowski Z. (Eds.), WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern. World Health Organisation for Animal Health, Paris, 2001; ISBN 92-9044-522-X.
4. McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. Echinococcosis. Lancet 2003; 362: 1295–1304.
5. Hosemann G. Morphologie und Biologie des *Echinococcus cysticus*. In: Hosemann G, Schwar E, Lehmann J.C, Posselt A. (Eds.), Die Echinokokken-Krankheit. F. Enke, Stuttgart, 1928; p1-66.
6. Neisser A. Die Echinococcen-Krankheit. Verlag August Hirschwald. 1877; Berlin.
7. Grove D.I. A History of Human Helminthology. CAB International, 1990; Wallingford, Oxon.
8. Rudolphi C.A. Beobachtungen über die Eingeweidewürmer. Arch. für Zool. Zootomie 1801; 2: 1-65.
9. Altıntaş N. Past to present: echinococcosis in Turkey. Acta Trop. 2003, 85: 105-112.
10. Merdivenci A, Aydınlioğlu K. Hydatidosis (Hydatid Disease), vol. 2972. Istanbul University, Cerrahpasa School of Medicine Publications, 1982; Istanbul.
11. Merdivenci A. History of Veterinary Parasitology in Turkey. Istanbul University, Cerrahpasa School of Medicine Publications, 1976; Istanbul.
12. Nakao M, Yokoyama N, Sako Y, Fukunaga M, Ito A. The complete mitochondrial DNA sequence of the cestode *Echinococcus multilocularis* (Cyclophyllidea: Taeniidae). *Mitochondrion* 2002; 1: 497–509.
13. Le T, Pearson M, Blair D, Dai N, Zhang L, McManus DP. Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse-dog and sheep-dog strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 2002; 124: 97-112.
14. Eckert J, Gemmel MA, Matyas Z, Soulsby E.J.L. Guidelines for surveillance, prevention and control of Echinococcosis/Hydatidosis. WHO. VPH/81,28, Geneva 1984; p. 5-35.
15. Morseth D.J. Ultrastructure of developing taeniid embryophores and associated structures. *Exp. Parasitol.* 1965; 16, 207-216.

16. Sakamoto T. Electron microscopical observations on the egg of *Echinococcus multilocularis*. Mem. Fac. Agr. Kagoshima. Univ. 1981; 17: 165-174.
17. Morseth DJ. Chemical composition of embryophoric blocks of *Taenia hydatigena*, *Taenia ovis* and *Taenia pisiformis* eggs. Exp. Parasitol. 1966; 18, 347-354.
18. Kassai T. Veterinary Helminthology, Butterworth-Einemann, Oxford, 1999; p. 44-49.
19. Soulsby E.J.L. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals, Baillier and Tindall. 1986; London.
20. Amman RW, Eckert J. Clinical Diagnosis and Treatment of Echinococcosis in Humans. "Echinococcus and Hydatid Disease" RCA Thompson ve AJ Lymbery (Editors). Cab International, Wallingford, Oxon. 1995; 411-463.
21. Üner A. Ekinokokların Sistematiği ve Biyolojisi. İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik (Echinococcosis), 7. Ulusal Parazitoloji Kongresi Özel Kitabı. T. Parazitol. Dern. Yayın No:10. Ege Üniv. Ofset-Basımevi, Bornova-İzmir. 1991; 13-28.
22. Rogan MT, Craig PS. Immunology of *Echinococcus granulosus* infections. Acta Trop, 1997; 67: 7-17.
23. Patrice Bourée MD. Hydatidosis: Dynamics of Transmission. World J Surg. 2001; 25: 4-9.
24. Deplazes P, Rinaldi L, Alvarez Rojas C.A. et al. Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis. Adv Parasitol. 2017; 65-109.
25. Lichtenwalner A, Adhikari N, Kantar L, Jenkins E, Schurer J. *Echinococcus granulosus* genotype G8 in maine moose (*Alces alces*). Alces 2014; 50: 27-33.
26. Rausch, RL. 2003. Cystic echinococcosis in the Arctic and Sub-Arctic. Parasitology. 2003; 127: 73-85.
27. Schurer J, Shury T, Leighton F, Jenkins E. Surveillance for *Echinococcus canadensis* genotypes in Canadian ungulates. Int. J. Parasitol. Parasit. Wildl. 2013; 2: 97-101.
28. Sweatman GK. Distribution and incidence of *Echinococcus granulosus* in man and other animals with special reference to Canada. Can. J. Public Health 1952; 43: 480-486.
29. Schurer JM., Pawlik M, Huber A. et al. Intestinal parasites of gray wolves (*Canis lupus*) in northern and western Canada. Can. J. Zool. 2016; 94: 643-650.
30. Trezeguet MA, Torres P, Kistermann JC. et al. 2011. In: Alimentaria, S.N.d.S.y.C. (Ed.), Sistema de vigilancia epidemiologica de la Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis 487 hidatidosis animal, en establecimientos con bovinos, ovinos o porcinos, por medio de la faena en la republica argentina. SENASA.

31. de la Rue ML. Cystic echinococcosis in southern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 2008; 50: 53-56.
32. Oksanen A, Lavikainen A. *Echinococcus canadensis* transmission in the North. *Vet. Parasitol.* 2015; 213: 182-186.
33. Boufana, B., Lett, W.S., Lahmar, S. et al. *Echinococcus equinus* and *Echinococcus granulosus sensu stricto* from the United Kingdom: genetic diversity and haplotypic variation. *Int. J. Parasitol.* 2015; 45: 161-166.
34. Hatch C. *Echinococcus granulosus equinus* in Irish dogs. *Vet. Rec.* 1970; 86: 632-633.
35. Kumaratilake LM., Thompson RCA, Eckert J. *Echinococcus granulosus* of equine origin from different countries possess uniform morphological characteristics. *Int. J. Parasitol.* 1986; 16: 529-540.
36. Sotiraki S, Himonas C, Korkoliakou P. Hydatidosis-echinococcosis in Greece. *Acta Trop.* 2003; 85: 197-201.
37. Cringoli G, Rinaldi L, Musella V. et al. Geo-referencing livestock farms as tool for studying cystic echinococcosis epidemiology in cattle and water buffaloes from southern Italy. *Geospatial Health.* 2007; 2: 105-111.
38. Rinaldi L, Maurelli MP, Veneziano V. et al. The role of cattle in the epidemiology of *Echinococcus granulosus* in an endemic area of southern Italy. *Parasitol. Res.* 2008; 103: 175-179.
39. Capuano F, Rinaldi L, Maurelli MP. et al. Cystic echinococcosis in water buffaloes: epidemiological survey and molecular evidence of ovine (G1) and buffalo (G3) strains. *Vet. Parasitol.* 2006; 137: 262-268.
40. Garippa G. Updates on cystic echinococcosis (CE) in Italy. *Parassitologia* 2006; 48: 57-59.
41. Dyachenko YV, Maslennikova AC, Mikhailenko VV, Lutsuk SN, Tolokonnikov VP. Infestation slaughter ruminants *Echinococcus granulosus* in Republic North Osetia-Alania and some sanitary-microbiological and patomorphological characteristics of internal organs. *Mod. Prob. Sci. Educ.* 2014; 6.
42. Fiapsheva A, Kanokova A, Bittirov A, Chilaev S. Distribution of echinococcosis in cattle in Kabardino-Balkarian Republic. *Russ. Parasitol. J.* 2007; 2: 1-5.
43. Zhekamukhova M, Maksidova Z, Mantaeva S, Sarbasheva M, Shikhalieva M. 2012. The Echinococcosis Epizootology Peculiarities of Meat and Wool Breed Sheep in the Farm Enterprises of the Kabardino-Balkarian Foothills Zone, 12. *Bulletin of the Krasnoyarsk State Agrarian University.*

44. Aminjanov M, Aminjanov S. Echinococcosis and research in Uzbekistan. In: Echinococcosis in Central Asia: Problems and Solutions. Daur Publishing House, Almaty, Kazakhstan, 2004; 13-19.
45. Torgerson PR, Burtisurnov KK, Shaikenov BS. et al. Modelling the transmission dynamics of *Echinococcus granulosus* in sheep and cattle in Kazakhstan. *Vet. Parasitol.* 2003; 114: 143-153.
46. Torgerson PR, Ziadinov I, Aknazarov D, Nurgaziev R, Deplazes P. Modelling the age variation of larval protoscoleces of *Echinococcus granulosus* in sheep. *Int. J. Parasitol.* 2009; 39: 1031-1035.
47. Muminov A, Mahmudov F, Shodmonov I. 2004. Echinococcosis of people and animals of Tadjikistan. In: Echinococcosis in Central Asia: Problems and Solutions. Daur Publishing House, Almaty, Kazakhstan, pp. 20-24.
48. Ibrahim MM. Study of cystic echinococcosis in slaughtered animals in Al Baha region, Saudi Arabia: interaction between some biotic and abiotic factors. *Acta Trop.* 2010; 113: 26-33.
49. Ahmadi NA. Hydatidosis in camels (*Camelus dromedarius*) and their potential role in the epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Iran. *J. Helminthol.* 2005; 79: 119-125.
50. Ahmadi NA, Meshkehkar M. An abattoir-based study on the prevalence and economic losses due to cystic echinococcosis in slaughtered herbivores in Ahwaz, south-western Iran. *J. Helminthol.* 2011; 85: 33-39.
51. Eslami A, Shayan P, Bokaei S. Morphological and genetic characteristics of the liver hydatid cyst of a donkey with Iran origin. *Iran. J. Parasitol.* 2014; 9: 302-310.
52. Samavatian A, Valilou MR, Lotfi A, Khani MY, Mirzaei H. Study of the incidence rate of liver and lung hydatidosis in slaughtered cattle and buffaloes, at Ahar Abattoir (Arasbaran Region e Northwestern Iran) during 2007-2008. *Buffalo Bull.* 2009; 28: 218-222.
53. Yu SH, Wang H, Wu XH. et al. Cystic and alveolar echinococcosis: an epidemiological survey in a Tibetan population in southeast Qinghai, China. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2008; 61: 242-246.
54. Zhao YM, Tong SX, Jing T. et al. Investigation on echinococcosis in animals in Gannan Tibetan Autonomous Prefecture. *Chin. J. Parasitol. Parasit. Dis.* 2009; 27: 27-30.
55. He JG, Qiu JM, Liu FJ. et al. Epidemiological survey on hydatidosis in Tibetan region of western Sichuan. II: infection situation among domestic and wild animals. *Chin. J. Zoonoses* 2000; 16: 62-65.
56. Wang Z, Wang X, Liu X. Echinococcosis in China, a review of the epidemiology of *Echinococcus spp.* *EcoHealth* 2008; 5: 115-126.
57. Lahmar S, Boufana B, Jebabli L. et al. Modelling the transmission dynamics of cystic echinococcosis in donkeys of different ages from Tunisia. *Vet. Parasitol.* 2014; 205: 119-124.

58. Azlaf R, Dakkak A. Epidemiological study of the cystic echinococcosis in Morocco. *Vet. Parasitol.* 2006; 137: 83-93.
59. El Berbri I, Pétavy A, Umhang G. et al. Epidemiological investigations on cystic echinococcosis in North-West (Sidi Kacem Province) Morocco: infection in ruminants. *Adv. Epidemiol.* 2015; 1-9.
60. Hamrat K, Achour Y, Yacin G, Cozma V. Epidemiologic study of hydatidosis in the steppe regions of Djelfa. Algeria. *Sci. Parasitol.* 2011; 12: 177-183.
61. Kouidri M, Benchaib Khoudja F, Boulkaboul A, Selles M. Prevalence, fertility and viability of cystic echinococcosis in sheep and cattle of Algeria. *Bulg. J. Vet. Med.* 2012; 15: 191-197.
62. McManus DP, Ding Z, Bowles J. A molecular genetic survey indicates the presence of a single, homogeneous strain of *Echinococcus granulosus* in north-western China. *Acta Trop.* 1994; 56: 7-14.
63. Zhang LH, Chai JJ, Jiao W, Osman Y, Mc Manus DP. Mitochondrial genomic markers confirm the presence of the camel strain (G6 genotype) of *Echinococcus granulosus* in north-western China. *Parasitology* 1998; 116: 29-33.
64. Wachira TM, Bowles J, Zeyhle E, Mc Manus DP. Molecular examination of the sympatric existence and distribution of sheep and camel strains of *Echinococcus granulosus* in Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993; 48: 473-479.
65. Schantz PM. Epidemiology and control of hydatid disease. In *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease* (Thompson, R.C.A and Lymbery, A.J., eds), 1995; pp. 233-354, CAB International.
66. Rosenzvit, MC, Zhang LH, Kamenetzky L. et al. Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology* 1999; 118: 523-530.
67. Zhang LH, Joshi JJ, Mc Manus DP. Three genotypes of *Echinococcus granulosus* identified in Nepal using mitochondrial DNA markers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2000; 94: 258-260.
68. Fasihi Harandi M. Hobbs RP, Adams PJ, Mobedi I. Molecular and morphological characterisation of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Iran. *Parasitology.* 2003; 125(4): 367-373.
69. Hobbs RP, Lymbery AJ, Thompson RCA. Rostellar hook morphology of *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) from natural and experimental Australian hosts and its implications for strain recognition. *Parasitology* 1990; 101: 273-281.
70. Lymbery AJ, Thompson RCA, Hobbs RP. Genetic diversity and genetic differentiation in *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) from domestic and sylvatic hosts on the mainland of Australia. *Parasitology* 1990; 101: 283-289.

71. Hope M, Bowles J, Prociv P, Mc Manus DP. A genetic comparison of human and wildlife *Echinococcus granulosus* in Queensland. *Med. J. Aust.* 1992; 156: 27–30.
72. Tashani OA, Zhang LH, Boufana B, Jegi A, Mcmanus DP. Epidemiology and strain characteristics of *Echinococcus granulosus* in the Benghazi area of eastern Libya. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2002; 96: 369–381.
73. Bryan HM, Darimont CT, Hill JE. et al. Seasonal and biogeographical patterns of gastrointestinal parasites in large carnivores: wolves in a coastal archipelago. *Parasitology* 2012; 139: 781-790.
74. Schurer, JM, Gesy KM, Elkin BT, Jenkins EJ. *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus canadensis* in wolves from western Canada. *Parasitology* 2014; 141: 159-163.
75. Himsforth CG, Jenkins E, Hill JE. Emergence of sylvatic *Echinococcus granulosus* as a parasitic zoonosis of public health concern in an indigenous community in Canada. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010; 82: 643-645.
76. Thompson RCA, Boxell AC, Ralston BJ. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus* in cervids from North America. *Parasitology* 2006; 132: 439-447.
77. McManus, DP, Zhang L, Castrodale LJ. et al. Short report: molecular genetic characterization of an unusually severe case of hydatid disease in Alaska caused by the cervid strain of *Echinococcus granulosus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002; 67: 296-298
78. Lichtenwalner A, Adhikari N, Kantar L, Jenkins E, Schurer J. *Echinococcus granulosus* genotype G8 in maine moose (*Alces alces*). *Alces* 2014; 50: 27-33.
79. Maravilla P, Thompson ARC, Palacios-Ruiz JA. et al. *Echinococcus granulosus* cattle strain identification in an autochthonous case of cystic echinococcosis in central Mexico. *Acta Trop.* 2004; 92: 231-236.
80. Rodriguez-Prado U, Jimenez-Gonzalez DE, Avila G. et al. Short report: Genetic variation of *Echinococcus canadensis* (G7) in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014; 91: 1149-1153.
81. Villalobos N, Gonzalez LM, Morales J. et al. Molecular identification of *Echinococcus granulosus* genotypes (G1 and G7) isolated from pigs in Mexico. *Vet. Parasitol.* 2007; 147: 185-189.
82. Cruz-Reyes A, Constantine CC, Boxell AC, Hobbs RP, Thompson RCA. *Echinococcus granulosus* from Mexican pigs is the same strain as that in Polish pigs. *J. Helminthol.* 2007; 81: 287-292.
83. Cucher MA, Macchiaroli N, Baldi G. Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of *Echinococcus granulosus sensu lato* in humans and natural domestic hosts. *Trop. Med. Int. Health* 2016; 21: 166-175.

84. Guarnera EA, Parra A, Kamenetzky L, Garcia G, Gutierrez A. Cystic echinococcosis in Argentina: evolution of metacestode and clinical expression in various *Echinococcus granulosus* strains. *Acta Trop.* 2004; 92: 153-159.
85. Kamenetzky L, Gutierrez AM, Canova SG. et al. Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infect. Genet. Evol.* 2002; 2: 129-136.
86. Rosenzvit, M.C., Zhang, L.H., Kamenetzky, L. et al. Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology* 1999; 118: 523-530.
87. Soriano SV, Pierangeli NB, Pianciola L. et al. Molecular characterization of *Echinococcus* isolates indicates goats as reservoir for *Echinococcus canadensis* G6 genotype in Neuquen, Patagonia Argentina. *Parasitol. Int.* 2010; 59: 626-628.
88. de la Rue ML, Takano K, Brochado JF. et al. Infection of humans and animals with *Echinococcus granulosus* (G1 and G3 strains) and *E. ortleppi* in Southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 2011; 177: 97-103.
89. Balbinotti H, Santos GB, Badaraco J. et al. *Echinococcus ortleppi* (G5) and *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) loads in cattle from Southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 2012; 188: 255-260.
90. de la Rue ML, Dinkel A, Mackenstedt U, Romig T. New data on *Echinococcus spp.* in Southern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 2006; 48: 103-104.
91. Monteiro DU, Botton SA, Tonin AA. et al. *Echinococcus canadensis* (G7) and *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) in swine of southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 2014; 202: 335-338.
92. Manterola C, Benavente F, Melo A, Vial M, Roa JC. Description of *Echinococcus granulosus* genotypes in human hydatidosis in a region of southern Chile. *Parasitol. Int.* 2008; 57: 342-346.
93. Espinoza S, Salas AM, Vargas A. et al. Detection of the G3 genotype of *Echinococcus granulosus* from hydatid cysts of Chilean cattle using COX1 and ND1 mitochondrial markers. *Parasitol. Res.* 2014; 113: 139-147.
94. Moro P, Schantz PM. Echinococcosis: a review. *Int. J. Infect. Dis.* 2009; 13: 125-133.
95. Sanchez E, Caceres O, Naquira. et al. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* from Peru by sequencing of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2010; 105(6): 806-810.
96. Santivanez SJ, Gutierrez AM, Rosenzvit MC. et al. Human hydatid disease in Peru is basically restricted to *Echinococcus granulosus* genotype G1. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2008; 79: 89-92.

97. Sanchez E, Caceres O, Naquira C. et al. *Echinococcus granulosus* genotypes circulating in alpacas (*Lama pacos*) and pigs (*Sus scrofa*) from an endemic region in Peru. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2012; 107: 275-278.
98. Dybicz M, Borkowski PK, Dabrowska J, Chomicz L. Cases of *Echinococcus granulosus sensu stricto* isolated from polish patients: imported or indigenous? Biomed. Res. Int. 2015; 728321.
99. Marcinkute A, Sarkunas M, Moks E. et al. Echinococcus infections in the Baltic region. Vet. Parasitol. 2015; 213: 121-131.
100. Karamon J, Sroka J, Cencek T. The first detection of *Echinococcus multilocularis* in slaughtered pigs in Poland. Vet. Parasitol. 2012; 185: 327-329.
101. Moks E, Jogisalu I, Valdmann H, Saarma U. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5-G10. Parasitology. 2008; 135: 647-654.
102. Bruzinskaite R, Sarkunas M, Torgerson PR, Mathis A, Deplazes P. Echinococcosis in pigs and intestinal infection with Echinococcus spp. in dogs in southwestern Lithuania. Vet. Parasitol. 2009; 160: 237-241.
103. Kedra AH, Tkach VV, Swiderski Z. et al. Molecular characterisation of *Echinococcus granulosus* from a wild boar. Acta Parasitol. 2000; 45: 121-122.
104. Umhang G, Chihai O, Boue F. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in a hyperendemic European focus, the Republic of Moldova. Parasitol. Res. 2014; 113: 4371-4376.
105. Turcekova L, Snabel V, Dudinak V, Gaspar V, Dubinský P. Prevalence of cystic echinococcosis in pigs from Slovakia, with evaluation of size, fertility and number of hydatid cysts. Helminthologia. 2009; 46: 151-158.
106. Grenouillet F, Umhang G, Arbez-Gindre F. et al. *Echinococcus ortleppi* infections in humans and cattle, France. Emerg. Infect. Dis. 2014; 20: 2100-2102.
107. Umhang G, Grech-Angelini S, Maestriani O. et al. 2014. Identification of lifecycle of *Echinococcus canadensis* in Corsica. In: ESCAAP Conference Echinococcus, Vilnius, Lithuania, p. 45.
108. Umhang G, Richomme C, Boucher JM, Hormaz V, Boue F. Prevalence survey and first molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in France. Parasitol. Res. 2013; 112: 1809-1812.
109. Umhang G, Richomme C, Hormaz V, Boucher JM, Boue F. Pigs and wild boar in Corsica harbor *Echinococcus canadensis* G6/7 at levels of concern for public health and local economy. Acta Trop. 2014; 133 64-68.

110. Chaligiannis I, Maillard S, Boubaker G. et al. *Echinococcus granulosus* infection dynamics in livestock of Greece. *Acta Trop.* 2015; 150: 64-70.
111. Varcasia A, Canu S, Kogkos A. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in sheep and goats of Peloponnesus, Greece. *Parasitol. Res.* 2007; 101: 1135-1139.
112. Chaabane-Banaoues R, Oudni-M'rad M, Cabaret J. et al. Infection of dogs with *Echinococcus granulosus*: causes and consequences in an hyperendemic area. *Parasit Vectors.* 2015; 8: 231.
113. Busi M, Snabel V, Varcasia A. et al. Genetic variation within and between G1 and G3 genotypes of *Echinococcus granulosus* in Italy revealed by multilocus DNA sequencing. *Vet. Parasitol.* 2007; 150: 75-83
114. Casulli A, Manfredi MT, La Rosa G. et al. *Echinococcus ortleppi* and *E. granulosus* G1, G2 and G3 genotypes in Italian bovines. *Vet. Parasitol.* 2008; 155: 168-172.
115. Rinaldi L, Maurelli MP, Veneziano V. et al. The role of cattle in the epidemiology of *Echinococcus granulosus* in an endemic area of southern Italy. *Parasitol. Res.* 2008; 103: 175-179.
116. Varcasia A, Canu S, Lightowers MW, Scala A, Garippa G. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* strains in Sardinia. *Parasitol. Res.* 2006; 98: 273-277.
117. Capuano F, Rinaldi L, Maurelli MP. et al. Cystic echinococcosis in water buffaloes: epidemiological survey and molecular evidence of ovine (G1) and buffalo (G3) strains. *Vet. Parasitol.* 2006; 137: 262-268.
118. Rinaldi L, Maurelli MP, Capuano F. et al. Molecular update on cystic echinococcosis in cattle and water buffaloes of southern Italy. *Zoonoses Public Health.* 2008; 55: 119-123.
119. Scala A, Varcasia A, Pipia AP, Pilo C, Garippa G. First molecular isolation of *Echinococcus granulosus* horse strain (G4) in Sardinia (Italy). *Parassitologia.* 2006; 48: 344.
120. Varcasia, A., Garippa, G., Pipia, A.P., Scala, A., Brianti, E., Giannetto, S., Battelli, G., Poglayen, G., Micagni, G., 2008a. Cystic echinococcosis in equids in Italy. *Parasitol. Res.* 102, 815-818.
121. Beato S, Parreira R, Roque C. et al. *Echinococcus granulosus* in Portugal: the first report of the G7 genotype in cattle. *Vet. Parasitol.* 2013; 198: 235-239.
122. Guerra D, Armua-Fernandez MT, Silva M. et al. Taeniid species of the Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) in Portugal with special focus on *Echinococcus spp.* *Int. J. Parasitol. Parasit. Wildl.* 2013; 2: 50-53.
123. Beato S, Parreira R, Calado M, Gracio MA. Apparent dominance of the G1-G3 genetic cluster of *Echinococcus granulosus* strains in the central inland region of Portugal. *Parasitol. Int.* 2010; 59: 638-642.

124. Gonzalez LM, Daniel-Mwambete K, Montero E. Further molecular discrimination of Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Exp. Parasitol.* 2002; 102: 46-56.
125. Mwambete KD, Ponce-Gordo F, Cuesta-Bandera C. Genetic identification and host range of the Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Acta Trop.* 2004; 91: 87-93.
126. Roinioti E, Papathanassopoulou A, Theodoropoulou I, Simsek S, Theodoropoulos G. Molecular identification of *Echinococcus granulosus* isolates from ruminants in Greece. *Vet. Parasitol.* 2016; 226: 138-144.
127. Konyaev S, Yanagida T, Nakao M. et al. Genetic diversity of *Echinococcus* spp. In: Russia. *Parasitology.* 2013; 140: 1637-1647.
128. Sharma M, Sehgal R, Fomda BA, Malhotra A, Malla N. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* cysts in north Indian patients: identification of G1, G3, G5 and G6 genotypes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7: e2262.
129. Konyaev SV, Yanagida T, Ivanov MV. et al. The first report on cystic echinococcosis in a cat caused by *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1). *J. Helminthol.* 2012; 86: 391-394.
130. 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: 171-174.
131. Rostami S, Shariat Torbaghan S, Dabiri S. Genetic characterization of *Echinococcus granulosus* from a large number of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples of human isolates in Iran. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2015; 92: 588-594.
132. Kia EB, Rahimi H, Sharbatkhori M. et al. Genotype identification of human cystic echinococcosis in Isfahan, central Iran. *Parasitol. Res.* 2010; 107: 757-760.
133. Harandi MF, Hobbs RP, Adams PJ. et al. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Iran. *Parasitology.* 2002; 125: 367-373.
134. Pezeshki A, Akhlaghi L, Sharbatkhori M. Genotyping of *Echinococcus granulosus* from domestic animals and humans from Ardabil Province, northwest Iran. *J. Helminthol.* 2013; 87: 387-391.
135. Parsa F, Fasihi Harandi M, Rostami S, Sharbatkhori M. Genotyping *Echinococcus granulosus* from dogs from Western Iran. *Exp. Parasitol.* 2012; 132: 308-312.
136. Shariatzadeh SA, Spotin A, Gholami S. et al. The first morphometric and phylogenetic perspective on molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus sensu lato* in stray dogs in a hyperendemic Middle East focus, northwestern Iran. *Parasit. Vectors* 2015; 8: 409.

137. Beiromvand M, Akhlaghi L, Fattahi Massom SH. Detection of *Echinococcus multilocularis* in carnivores in Razavi Khorasan province, Iran using mitochondrial DNA. PLoS Negl. Trop. Dis. 2011; 5: e1379.
138. Shahnazi, M., Hejazi, H., Salehi, M., Andalib, A.R., 2011. Molecular characterization of human and animal *Echinococcus granulosus* isolates in Isfahan, Iran. Acta Trop. 117, 47-50.
139. Hajialilo E, Harandi MF, Sharbatkhori M, Mirhendi H, Rostami S. Genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in camels, cattle and sheep from the southeast of Iran indicates the presence of the G3 genotype. J. Helminthol. 2012; 86: 263-270.
140. Pezeshki A, Akhlaghi L, Sharbatkhori M. et al. Genotyping of *Echinococcus granulosus* from domestic animals and humans from Ardabil Province, northwest Iran. J. Helminthol. 2013; 87: 387-391.
141. Sharbatkhori M, Mirhendi H, Harandi MF. *Echinococcus granulosus* genotypes in livestock of Iran indicating high frequency of G1 genotype in camels. Exp. Parasitol. 2010; 124: 373-379.
142. Sharbatkhori M, Fasihi Harandi M, Mirhendi H, Hajialilo E, Kia EB. Sequence analysis of cox1 and nad1 genes in *Echinococcus granulosus* G3 genotype in camels (*Camelus dromedarius*) from central Iran. Parasitol. Res. 2011; 108: 521-527.
143. Pour AA, Hosseini SH, Shayan P. Comparative genotyping of *Echinococcus granulosus* infecting buffalo in Iran using cox1 gene. Parasitol. Res. 2011; 108: 1229-1234.
144. Rajabloo, M., Hosseini, S.H., Jalousian, F., 2012. Morphological and molecular characterisation of *Echinococcus granulosus* from goat isolates in Iran. Acta Trop. 123, 67-71.
145. Fadakar B, Tabatabaei N, Borji H, Naghibi A. Genotyping of *Echinococcus granulosus* from goats and sheep indicating G7 genotype in goats in the Northeast of Iran. Vet. Parasitol. 2015; 214: 204-207.
146. Eslami A, Shayan P, Bokaei S. Morphological and genetic characteristics of the liver hydatid cyst of a donkey with Iran origin. Iran. J. Parasitol. 2014; 9: 302-310.
147. Sarkari B, Mansouri M, Khabisi SA, Mowlavi G. Molecular characterization and seroprevalence of *Echinococcus granulosus* in wild boars (*Sus scrofa*) in south-western Iran. Ann. Parasitol. 2015; 61: 269-273.
148. Sharma M, Sehgal R, Fomda BA, Malhotra A, Malla N. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* cysts in north Indian patients: identification of G1, G3, G5 and G6 genotypes. PLoS Negl. Trop. Dis. 2013; 7: e2262.
149. Singh BB, Sharma R, Sharma JK, Gill JPS. Molecular detection of *E. granulosus* sheep strain (G1) infections in naturally infected dogs in Punjab (India). Helminthologia 2014; 51: 269-272.

150. Singh BB. Molecular Epidemiology of Echinococcosis in Northern India and Public Health Significance (Dissertation). University Ludhiana, 2011; Indiana.
151. 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.
152. Gudewar J, Pan D, Bera AK. et al. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* of Indian animal isolates on the basis of nuclear and mitochondrial genotype. *Mol. Biol. Rep.* 2009; 36: 1381-1385.
153. Bhattacharya D, Bera AK, Bera BC, Maity A, Das SK. Genotypic characterisation of Indian cattle, buffalo and sheep isolates of *Echinococcus granulosus*. *Vet. Parasitol.* 2007; 143: 371-374
154. Alvarez Rojas CA, Romig T, Lightowers MW. *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes infecting humans: review of current knowledge. *Int. J. Parasitol.* 2014; 44: 9-18.
155. Latif AA, Tanveer A, Maqbool A. et al. Morphological and molecular characterisation of *Echinococcus granulosus* in livestock and humans in Punjab, Pakistan. *Vet. Parasitol.* 2010; 170: 44-49.
156. Zheng J, Du F, Wang D. et al. The experience of 526 patients with hepatic echinococcosis in Tibet. *J. Hepatobil. Surg.* 2014; 22(6): 459-461.
157. Yang S-j, Wang Q-y, Wang J. et al. Surveillance for hydatidosis in Emin, Xinjiang, 2007-2013. *Dis. Surveill.* 2015; 30: 130-133.
158. Yang YR, Rosenzvit MC, Zhang LH, Zhang JZ, McManus DP. Molecular study of Echinococcus in west-central China. *Parasitology.* 2005; 131: 547-555.
159. Yan N, Nie HM, Jiang ZR. et al. Genetic variability of Echinococcus granulosus from the Tibetan plateau inferred by mitochondrial DNA sequences. *Vet. Parasitol.* 2013; 196: 179-183.
160. Zhong X, Wang N, Hu D. et al. Sequence analysis of cytb gene in *Echinococcus granulosus* from Western China. *Korean J. Parasitol.* 2014; 52: 205-209.
161. Wang N, Wang J, Hu D. et al. Genetic variability of *Echinococcus granulosus* based on the mitochondrial 16S ribosomal RNA gene. *Mitochondrial DNA.* 2015; 26: 396-401.
162. Ma SM, Maillard S, Zhao HL. Assessment of *Echinococcus granulosus* polymorphism in Qinghai province, People's Republic of China. *Parasitol. Res.* 2008; 102 (6): 1201-1206.
163. Boufana B, Lett W, Lahmar S. et al. Canine echinococcosis: genetic diversity of *Echinococcus granulosus sensu stricto (s.s.)* from definitive hosts. *J. Helminthol.* 2015; 89: 689-698

164. Liu Q, Cao L, Zhang Y. et al. Genotypes of *Echinococcus granulosus* in animals from Yushu, Northeastern China. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013; 13(2), 134-137.
165. 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: 171-174.
166. Ma X, Liu C, Yue J. et al. Genotyping of *Echinococcus granulosus* isolates using microsatellite sequence as the typing marker. *Chin. J. Zoonoses.* 2009; 25: 846-849.
167. Bart JM, Knapp J, Gottstein B. et al. EmsB, a tandem repeated multi-loci microsatellite, new tool to investigate the genetic diversity of *Echinococcus multilocularis*. *Infect. Genet. Evol.* 2006; 6: 390-400.
168. Bardonnnet K, Benchikh-Elfegoun MC, Bart JM. Cystic echinococcosis in Algeria: cattle act as reservoirs of a sheep strain and may contribute to human contamination. *Vet. Parasitol.* 2003; 116: 35-44.
169. Azlaf R. Echinococcosis/Hydatidosis in Morocco: Epidemiology, Modeling, *E. granulosus* Genotyping and Molecular Analysis. 2007; Morocco, Rabat.
170. El Berbri I, Pétavy A, Umhang G. et al. Epidemiological investigations on cystic echinococcosis in North-West (Sidi Kacem Province) Morocco: infection in ruminants. *Adv. Epidemiol.* 2015; 1-9.
171. Bart JM, Bardonnnet K, Elfegoun MC. et al. *Echinococcus granulosus* strain typing in North Africa: comparison of eight nuclear and mitochondrial DNA fragments. *Parasitology* 2004; 128: 229-234.
172. Maillard S, Benchikh-Elfegoun MC, Knapp J. et al. Taxonomic position and geographical distribution of the common sheep G1 and camel G6 strains of *Echinococcus granulosus* in three African countries. *Parasitol. Res.* 2007; 100: 495-503.
173. Boubaker G, Macchiaroli N, Prada L. et al. A multiplex PCR for the simultaneous detection and genotyping of the *Echinococcus granulosus* complex. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7: e2017.
174. M'rad S, Filisetti D, Oudni M. et al. 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: 267-272.
175. Lahmar S, Rebai W, Boufana BS. et al. Cystic echinococcosis in Tunisia: analysis of hydatid cysts that have been surgically removed from patients. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2009; 103: 593-604.

176. M'rad S, Oudni-M'rad M, Filisetti D. et al. Molecular identification of *Echinococcus granulosus* in Tunisia: First record of the buffalo strain (G3) in human and bovine in the country. *The Open Vet. Sci. J.* 2010; 4: 27-30.
177. M'rad S, Oudni-M'rad M, Boubaker G. et al. Retrospective study of the distribution and the fertility of hydatid cysts in the child in Tunisia. *Pathologie-Biologie.* 2012; 60: 166-169.
178. Schneider R, Gollackner B, Schindl M, Tucek G, Auer H. *Echinococcus canadensis* G7 (pig strain): an underestimated cause of cystic echinococcosis in Austria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010; 82: 871-874.
179. Oudni-M'rad M, M'rad S, Ksia A. et al. First molecular evidence of the simultaneous human infection with two species of *Echinococcus granulosus sensu lato*: *Echinococcus granulosus sensu stricto* and *Echinococcus canadensis*. *Parasitol. Res.* 2016; 115: 1065-1069.
180. Farjallah S, Busi M, Mahjoub MO. et al. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in Tunisia and Mauritania by mitochondrial rrnS gene sequencing. *Parassitologia.* 2007; 49: 239-246.
181. Boufana B, Lahmar S, Rebai W. et al. Genetic variability and haplotypes of *Echinococcus* isolates from Tunisia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2014; 108: 706-714.
182. Lahmar S, Debbek H, Zhang LH. et al. Transmission dynamics of the *Echinococcus granulosus* sheep-dog strain (G1 genotype) in camels in Tunisia. *Vet. Parasitol.* 2004; 121: 151-156.
183. Lahmar S, Boufana B, Jebabli L. et al. Modelling the transmission dynamics of cystic echinococcosis in donkeys of different ages from Tunisia. *Vet. Parasitol.* 2014; 205: 119-124.
184. Boufana B, Said Y, Dhibi M, Craig PS, Lahmar S. *Echinococcus granulosus sensu stricto* (s.s.) from the critically endangered antelope *Addax nasomaculatus* in Tunisia. *Acta Trop.* 2015; 152: 112-115.
185. Boufana B, Lett W, Lahmar S. et al. Canine echinococcosis: genetic diversity of *Echinococcus granulosus sensu stricto* (s.s.) from definitive hosts. *J. Helminthol.* 2015; 89: 689-698.
186. Abushhewa MH, Abushhiwa MH, Nolan MJ. et al. Genetic classification of *Echinococcus granulosus* cysts from humans, cattle and camels in Libya using mutation scanning-based analysis of mitochondrial loci. *Mol. Cell Probes* 2010; 24: 346-351.
187. Abd El Baki MH, El Missiry AM, Abd El Aaty HE, Mohamad AA, Aminou HA. Detection of G1 genotype of human cystic echinococcosis in Egypt. *J. Egypt Soc. Parasitol.* 2009; 39: 711-721.
188. Abdel Aaty, H.E., Abdel-Hameed, D.M., Alam-Eldin, Y.H., El-Shennawy, S.F., Aminou, H.A., Makled, S.S., Darweesh, S.K., 2012. Molecular genotyping of *Echinococcus granulosus* in animal and human isolates from Egypt. *Acta Trop.* 121, 125-128.

189. Amer S, Helal IB, Kamau E, Feng Y, Xiao L. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus sensu lato* from farm animals in Egypt. PLoS One. 2015; 10: e0118509.
190. Aboelhadid SM, El-Dakhly KM, Yanai T, Fukushi H, Hassanin KM. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in Egyptian donkeys. Vet. Parasitol. 2013; 193: 292-296.
191. Khalifa NO, Khater HF, Fahmy HA, Radwan MEI, Afify JSA. Genotyping and phylogenetic analysis of cystic echinococcosis isolated from camels and humans in Egypt. Am. J. Epidemiol. Infect. Dis. 2014; 2: 74-82.
192. Alvarez Rojas CA, Romig T, Lightowers MW. *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes infecting humans: review of current knowledge. Int. J. Parasitol. 2014; 44: 9-18.
193. Alam-Eldin YH, Abdel Aaty HE, Ahmed MA. Molecular characterization of cystic echinococcosis: first record of G7 in Egypt and G1 in Yemen. Acta Parasitol./ Witold Stefanski Inst. Parasitol. Warszawa, Pol. 2015; 60: 662-665.
194. Lahmar S, Boufana BS, Lahmar S. et al. Echinococcus in the wild carnivores and stray dogs of northern Tunisia: the results of a pilot survey. Ann. Trop. Med. Parasitol. 2009; 103: 323-331.
195. Kurtpınar H. Erzurum, Kars ve Ağrı vilayetleri sığır, koyun ve keçilerinin yaz aylarına mahsus parazitleri ve bunların doğurdukları hastalıklar. Türk Vet. Hek. Dern. Derg., 1956; 27: 3320-3325.
196. Arslan MÖ, Umur Ş. Erzurum mezbahalarında kesilen koyun ve sığırlarda hidatidozun yayıllığı ve ekonomik önemi. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg., 1997; 3: 167-171.
197. Umur Ş, Aslantaş Ö. Kars belediye mezbahasında kesilen ruminantlarda hidatidozun yayıllığı ve ekonomik önemi. T. Parazit. Derg., 1993; 17: 27-34.
198. Toparlak M, Gül Y. Van ili belediye mezbahasında kesilen hayvanlarda hidatidozun yayıllığı. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 1989; 36: 129-137.
199. Değer S, Ayaz E, Gül A, Biçek K, Eraslan A. Van yöresinde kesilen sığır, koyun ve keçilerde hidatidozun yayıllığı. Yüzüncü Yıl Üniv. Sağlık Bil. Derg, 2001; 7: 37-40.
200. Şimşek S, Köroğlu E, Dumanlı N, Aktaş M. Seroprevalence of Cattle Hydatidosis in Some Districts in the East Anatolian Region of Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 2005; 29: 1305-1310.
201. Şimşek S, Köroğlu E. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) for immunodiagnosis of hydatid diseases in sheep. Acta Tropica. 2004; 92: 17-24.
202. Umur S. Prevalence and economic importance of cystic echinococcosis in slaughtered ruminants in Burdur, Turkey. J Vet Med. 2003; B50: 247-252.

203. Arslan MÖ, Umur Ş. Erzurum mezbahalarında kesilen koyun ve sığırlarda hidatidozun yayılış ve ekonomik önemi. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg. 1997; 3(2): 167-171.
204. Özçelik S, Saygı G. Sivas mezbahasında kesilen koyun ve sığırlarda kist hidatik görülme oranları. Türkiye Parazitol. Derg. 1990; 14(1): 41-44.
205. Acıöz M. Muş ve Yöresinde *Echinococcus granulosus* yaygınlığının PCR yöntemi ile araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalı, 2008; Doktora Tezi, Sivas.
206. Şimşek S, Balkaya İ, Köröğlu E. Epidemiological Survey and Molecular Characterization of *Echinococcus granulosus* in Cattle in an Endemic Area Eastern Turkey. Vet Parasitol. 2010; 172: 347-349.
207. Gıcık Y, Arslan MÖ, Kara M, Köse M. Kars ilinde Kesilen Sığır ve Koyunlarda Kistik Ekinokokkozisin Yaygınlığı. Türkiye Parazitol. Derg. 2004; 28(3): 136-139
208. Köse M, Sevimli FK. Prevalence of Cystic Echinococcosis in Slaughtered Cattle in Afyonkarahisar. Türkiye Parazitol. Derg. 2008; 32(1): 27-30.
209. Celep A, Açıcı M, Çetindağ M, Coşkun ŞZ, Gürsoy S. Samsun Yöresi Sığırlarında Helmintolojik Araştırmalar. Etlik Vet. Mikrob. Derg. 1990; 6(6): 117-130.
210. Yıldız K, Tunçer Ç. Kırıkkale’de Sığırlarda Kist Hidatik’in Yayılışı. Türkiye Parazitol Derg. 2005; 29(4): 247-250.
211. Esatgil MU, Tüzer E. Prevalence of Hydatidosis in Slaughtered Animals in Thrace, Turkey. Türkiye Parazitol Derg. 2007; 31(1): 41-45.
212. Öge H, Gıcık Y, Kalınbacak F, Yıldız K. Ankara Yöresinde Kesilen Koyun, Keçi ve Sığırlarda Bazı Metasestodların (Hydatid cyst, *Cysticercus tenuicollis*, *Cysticercus bovis*) Yayılışı. Ankara Üniv. Vet. Fak. 1998; 45(1):123-130.
213. Çenet O, Taşçı S. Manisa Et ve Balık Kurumu'nda (EBK) 1986-1993 Yılları Arasında Kesilen Kasaplık Hayvanlarda Kesim Sonrası Görülen Hastalıkların Araştırılması. Türkiye Parazitol. Derg. 1994; 18(4): 511-516.
214. Kara M, Gıcık Y, Sarı B, Bulut H, Arslan MÖ. A Slaughterhouse Study on Prevalence of Some Helminths of Cattle and Sheep in Malatya Province, Turkey. J. Anim. Vet. Adv. 2009; 8(11): 2200-2205.
215. Çivi, S., Güler, S., Kesci, S. Konya Et Balık Kurumu ve Konet Tesisleri Kayıtlarına Göre Kist Hidatik Nedeniyle Oluşan Ekonomik Kayıplar. Türkiye Parazitol. Derg. 1995; 19(2): 237-242.
216. Demir P, Mor, N. Kars Belediye Mezbahasında Kesilen Sığırlarda Kistik Echinococcosis'in Yaygınlığı, Mevsimsel Dağılımı ve Ekonomik Önemi. Türkiye Parazitol. Derg. 2011; 35: 185-188.

217. Düzlü Ö, Yıldırım A, Sarıözkan S, İnci A. Kayseri Yöresinde Üç Farklı Mezbahada Kesilen Koyun ve Sığırlarda Kistik Echinococcosis'in Ekonomik Önemi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg. 2010; 7(1): 7-11.
218. Dik B, Cantoray R, Handemir E. Konya Et Balık Kurumu Kombinasi' nda Kesilen Küçük ve Büyükbaş Hayvanlarda Hidatidozun Yayılışı ve Ekonomik Önemi. Türkiye Parazitol. Derg. 1992; 16(3-4): 91-99.
219. Şenlik B. Prevalance of Hydatidosis and its Relationsheep to the Age, Tace and Sex of the Sheep in the Province of Bursa. Türkiye Parazitol. Derg., 2000; 24(3): 304-308.
220. Poyraz Ö, Özçelik S, Saygı G, Genç Ş. Sivas Et ve Balık Kurumu Kombinasında 1985-1988 Yılları Arasında Kesilen Sığırlarda Kist Hidatik Görülme Oranı. Türkiye Parazitol Derg. 1990; 14(1): 35-40.
221. Öncel T. The Prevalence of Helminth Species in Sheep in the Southern Region of Marmara. Türkiye Parazitol. Derg. 2000; 24(4): 414-419.
222. Zeybek H, Tokay A. Ankara Yöresinde Evcil ve Yabani Canidaelerde Echinococcus Türlerinin Yayılışı, Kist şekillerinin Ensidansı ve Kontrol Olanaklarının Araştırılması. Etlik Vet. Mikrob. Derg. 1990; 6(6): 1-19.
223. Zeybek, H. Samsun Bölgesinde İnsanlarda Görülen Hydatique Olayları ve Alınması Gereken Koruyucu Tedbirler. Türk Hidatidol. Derg. 1973; 19: 76-84.
224. Türkmen H. Mandalarda (Bubalus bubalis Linnaeus, 1758) Hydatidosis. Türkiye Parazitol Derg. 1992; 16(2): 31-45.
225. Beyhan YE, Umur Ş. Molecular Characterization and Prevalence of Cystic Echinococcosis in Slaughtered Water Buffaloes in Turkey. Vet Parasitol. 2011; 181: 174-179.
226. Doğanay A. Ankara Köpeklerinde Görülen Helmint Türleri, Bunların Yayılışı ve Halk Sağlığı Yönünden Önemi. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 1983; 39(12): 336-348.
227. Tınar R, Coşkun ŞZ, Doğan, H. et al. Bursa Yöresi Köpeklerinde Görülen Helmint Türleri ve Bunların Yayılışı. Türkiye Parazitol. Derg. 1989; 13: 113-120.
228. Umur Ş, Arslan MÖ. Kars Yöresi Sokak Köpeklerinde Görülen Helmint Türlerinin Yayılışı. Türkiye Parazitol. Derg. 1998; 22(2): 188-193.
229. Ataş AH, Özçelik S, Saygı G. Sivas Sokak Köpeklerinde Görülen Helmint Türleri, Bunların Yayılışı ve Halk Sağlığı Yönünden Önemi. Türkiye Parazitol. Derg. 1997; 21(3): 305-309.
230. Aydenizöz M. (1997). Helminthological Investigations of Dogs in Konya Province. Acta Parasitol Turcica. 1997; 21(4): 429-434.

231. Demirkazık M, Koltaş İS, Aktaş H, Kocaçiftçi İ. Adana İli Sokak Köpekleri Dışkıında *Echinococcus granulosus* Antijen Varlığının Araştırılması. 15. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 18-23 Kasım, 2007; Kayseri ve Ürgüp. Bildiri Özetleri sy. 237.
232. Şahin İ, Ekinci N, Şen İ, Özcan M, Gödekmerdan A. Kayseri Yöresi Köpeklerinde *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) ve Diğer Parazitlerin Yayılışı. Türkiye Parazitol. Derg. 1993; 17(3-4): 69-76.
233. Güzel M, Yaman M, Koltas IS, Demirkazık M, Aktas H. Detection of *Echinococcus granulosus* Coproantigens in Dogs from Antakya Province, Turkey. Helminthologia. 2008; 45(3): 153
234. Üner A. Ekinokokların sistematığı ve biyolojisi. In: Unat ve ark. Ed: İnsanlarda ve hayvanlarda kist hidatik (Echinococcosis). Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:10, Ege Üniversitesi Ofset Basımevi, Bornova-İzmir, 1991; 13-28.
235. Taşan E. Elazığ Kırsal Yöre Köpeklerinde Helmintlerin Yayılışı ve insan Sağlığı Yönünden Önemi. Doğa Bilim Dergisi, 1984; 8(2): 160-167.
236. Ayçiçek H, Sarımehtemtoğlu HO, Tanyüksel M, Özyurt M, Gün H. Distribution and Public Health Importance of Intestinal Helminths in Stray Pups in Keçiören Area, Ankara. Acta Parasitol. Turcica. 1998; 22(2): 156-158.
237. Öter K, Bilgin Z, Tınar R, Tüzer E. Tapeworm Infections in Stray Dogs and Cats in İstanbul, Turkey. Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 2011; 17(4): 595-599.
238. Şenlik B. Bursa yöresi koyunlarında indirekt floresan antikor (IFA) ve indirekt hemaglutinasyon (IHA) testleriyle hidatidozun seroprevalansı üzerine arafltırmalar. Doktora tezi. Uludağ Üniversitesi, Bursa. 1998.
239. Torgerson PR. Economic effects of echinococcosis. Acta Trop. 2003; 85: 113-118.
240. Torgerson PR, Carmona C, Bonifacino R. Estimating the Economic Effect of Cystic Echinococcosis: Uruguay, a Developing Country with Upper-Middle Income. Ann. Trop. Med. Parasitol. 2000; 94: 703-713.
241. Perry BD, Randolph TF. Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals. Vet Parasitol. 1999; 84: 145-168.
242. Merdivenci A. Türkiye'de Veteriner Parazitoloji Tarihi. Hilal matb. Koll. Sti. İstanbul 1976; 265.
243. Budge MC, Jiamin Q, Qian W, Torgerson PR. Economic Effects Of Echinococcosis In A Disease-Endemic Region Of The Tibetan Plateau. Am. J. Trop. Med. Hyg., 2005; 73(1): 2-10.
244. Yang FC. A study of domestic animals with Echinococcus infection in Qinghai Province and suggestions for control. Qinghai Xumu Shouyi Zazhi. 1992; 22: 22-25.

245. Houin R. Current situation of echinococcosis in Europe. Symposium on Environmental Adaptation of Echinococcosis. 18–20 August 1998, Hakkaido University, Sapparo, Japan.
246. Singh BB, Dhand NK, Sandeep G, Gill JPS. Economic losses due to cystic echinococcosis in India: Need for urgent action to control the disease. *Prev Vet Med.* 2014; 113: 1–12.
247. Fasihi Harandi M, Budke CM, Rostami S. The Monetary Burden of Cystic Echinococcosis in Iran. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(11): e1915
248. Moro PL, Budke CM, Schantz PM. et al. Economic Impact of Cystic Echinococcosis in Peru. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(5): e1179.
249. Budke CM, Deplazes P, Torgerson PR. Global socio economic impact of cystic echinococcosis. *Emerg Inf Dis.* 2006; 12: 296–303.
250. Sarıözkan S, Yalçın C. Estimating the production losses due to cystic echinococcosis in ruminants in Turkey. *Vet Parasitol.* 2009; 163: 330–4.
251. Şimşek S, Balkaya İ, Köröğlu E. Epidemiological Survey and Molecular Characterization of *Echinococcus granulosus* in Cattle in an Endemic Area Eastern Turkey. *Vet Parasitol.* 2009; 172: 347-349.
252. Plorde JJ. Cestodes (4th ed), In: Ryan KJ, Ray CG (Eds.), *Sherris medical microbiology an introduction to infectious diseases*, New York, Mc Graw Hill Co, 2004: 791-802.
253. 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: 7-10.
254. Zhang W, Li Jun, McManus DP. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clinical Microbiology reviews.* 2003; 16: 18-36
255. Eckert J, Deplazes P, Craig PS. et al. Echinococcosis in animals: clinical aspects, diagnosis and treatment. In: Eckert J, Gemmel MA, Meslin F-X, Pawlowski ZS, editors. *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern*. Paris; World Organisation for Animal Health. 2001; 72-99
256. Jenkins DJ, Fraser A, Bradshaw H, Craig PS. Detection of *Echinococcus granulosus* coproantigens in Australian canids with natural or experimental infection. *Journal Parasitology* 2000; 86(1): 140-145.
257. Eckert J, Gemmel MA, Matyas Z, Soulsby EJJ. Guidelines for surveillance, prevention and control of Echinococcosis/Hydatidosis. WHO. VPH/81,28, Geneva 1984; 5-35.
258. Gasser RB, Jenkins DJ, Heat DD, Lawrence SB. Use of *Echinococcus granulosus* worm antigens for immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in dogs. *Vet Parasitol.* 1992; 45: 89-100.

259. Craig PS, Gasser RB, Parada L. et al. Diagnosis of canine echinococcosis: comparison of coproantigen and serum antibody tests with arecoline purgation in Uruguay. *Vet Parasitol.* 1995; 56(4): 293-301.
260. Lightowlers MW, Gottstein B. Antigens, Immunological and molecular diagnosis. In: Thompson RCA, Lymbery AJ, editors. *Echinococcosis and Hydatid Diseases.* CAB International Oxon, 1995; 355-410.
261. Çırak VY. Hayvanlarda erişkin ve larver echinococcosisin tedavisi. Altıntaş N, Tınar R, Çoker A. Editörler, *Echinococcosis'de,* İzmir; Hidatidoloji Derneği, Yayın no:1, Ege Üniversitesi Matbaası. 2004; 317-324.
262. Parada L, Cabrera P, Burges C. et al. *Echinococcus granulosus* infections of dogs in the Durazno region of Uruguay. *Vet Record.* 1995; 136: 389-391.
263. Craig TM. Parasite of Sheep and Goats. In: Flynn's Parasite of Laboratory Animals. Ed. Backer, DG. 2nd Edition. Blackwell Publishing. 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA. 2007; 642-691.
264. WHO/OIE. Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern, In Eckert J, Gemmell MA, Meslin FX, Pawłowski ZS editors. Paris, 2001.
265. Manger BR, Brewer MD. Epsiprantel, an new tapeworm remedy. Preliminary efficacy in dogs and cats. *Br Vet J.* 1989; 145: 384-388.
266. Conchedda M, Ecça A, Gabrielle F, Bortoletti G, Palmas C. Options for control of echinococcosis: the Sardinian example. In: Craig P, Pawłowski Z, eds. *Cestode zoonoses: echinococcosis and cysticercosis.* Amsterdam: IOS Press, 2002: 343-53.
267. Gemmell M, Roberts M, Beard T, Campano-Diaz S, Lawson J, Nonnemaker J. Control of echinococcosis. In: Eckert J, Gemmell M, Meslin F-X, Pawłowski Z, eds. *WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern.* Paris: World Organisation for Animal Health, 2001: 195-204
268. Torgerson PR, Budke CM. Echinococcosis – an international public health challenge. *Res Vet Sci.* 2003; 74: 191-202.
269. McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. Echinococcosis. *Lancet* 2003; 362(9392): 1295-1304.
270. Johnson, KS, Harrison MW, Lightowlers KL. et al. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature.* 1989; 338: 585-587.

271. Lightowers MW. Vaccines for control of cysticercosis and hydatidosis, 2002; 381–391. In P. Craig and Z. Pawlowski (ed.), *Cestode zoonoses: echinococcosis and cysticercosis, an emergent and global problem*. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands.
272. Heath DD, Jensen O, Lightowers MW. Progress in control of hydatidosis using vaccination—a review of formulation and delivery of the vaccine and recommendations for practical use in control programmes. *Acta Trop*. 2003; 85:133–143.
273. Heath DD, Lightowers MW. Vaccination on hydatidology— state of the art. *Arch. Int. Hidatid*. 1997; 33: 14–16.
274. Dinkel A, Njoroge EM, Zimmermann A. et al. A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus* complex, with reference to the epidemiological situation in Eastern Africa. *Int J for Parasitol*. 2004; 34: 645-653.
275. Ütük AE, Şimşek S, Köroğlu E. Echinococcus cinsinin moleküler genetik karakterizasyonu. *T Parazitol Derg*. 2005; 29: 171-176.
276. Yağcı A. Restriction Fragment Length Polymorphism ve Polimeraz Zincir Reaksiyon Bazlı Tiplendirme Yöntemleri. “Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji” R Durmaz (Editör) 2.Baskı, İnönü Üniv.Tıp Fak. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD, Malatya. Sayfa 149-160.
277. Gasser RB. PCR-based technology in veterinary parasitology. *Vet Parasitol* 1999; 84: 229-258.
278. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. 1989; 5: 874-879.
279. Sunnucks P, Wilson ACC, Beheregaray LB. et al. SSCP is not so difficult: The application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol*. 2000; 9: 1699-1710.
280. Olive M, Bean P. Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1661-1669.
281. Ak M. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). In: Özcel MA, Altıntaş N, (Eds). *Parazit Hastalıklarında Tanı*. Türk Parazitoloji Derneği Yayınları 1997; 15: 241-259.
282. Crowther JR, Smith H. *Elisa Manual*, Humana Press. Inc. 1995; New Jersey, USA.
283. Coltorti EA. Standardization and Evaluation of An Enzyme Immunoassay as a Screening Test for The Seroepidemiology of Human Hydatidosis. *Am J Trop Med Hyg*. 1986; 35(5): 1000-1005.
284. Durmaz R. (Ed.) *Blotlama Teknikleri Ve Mikrobiyolojide Kullanımı*. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*, 2. Baskı, 2001; 123-137.

285. Altıntaş N. SDS-Polyacrilamide Gel Elektroförezü ile Proteinlerin Separasyonu. T Parazitol Derg. XV 1991; 2: 119-129.
286. Thompson R.C.A. Biology and Systematics of Echinococcosis. Adv Parasitol. 2017; 65-109.
287. Xiao N, Qiu J, Nakao M, et al. *Echinococcus shiquicus* n. sp., A taeniid cestode from tibetan fox and plateau pika in China. Int J Parasitol, 2005; 35: 693-701.
288. Thompson RCA. The Taxonomy, Phylogeny and Transmission of Echinococcus, Exp Parasitol, 2008; 119: 439-446.
289. Saarma U, Jogisalu I, Moks E, et al. A novel phylogeny for the genus echinococcus based on nuclear data challenges relationships based on mitochondrial evidence. Parasitology, 2009; 136: 317-328.
290. Eckert J, Thompson RCA. Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphises on their infectivity to humans. Acta Trop, 1997; 64: 19-64.
291. Thompson RCA, Lymbery AJ: The nature, extent and significance of variation within the genus Echinococcus. Adv Parasitol. 1988; 27: 209-258.
292. Eckert J, Thompson RCA. Intraspecific Varition of *Echinococcus granulosus* and Related Species with Emphises on their Infectivity to Humans. Acta Tropica, 1997; 64: 19-34.
293. Bowles J, Blair D, McManus DP. Genetic variants within the genus Echinococcus identified by mitochondrial DNA sequencing. Molecular and Biochemical Parasitology 1992; 54(2): 165-174.
294. Bowles J, Mcmanus DP. Rapid Discrimination of Echinoccus specises and strains of the Genus Echinococcus. Int. J. Parasitol. 1993; 57: 231-239.
295. 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: 713-722.
296. Saarma U, Jogisalu, I., Moks, E. et al. A Novel pylogeny fort he Genus Echinococcus, Based on Nuclear Data, Challenges Relationships Based on Mitochondrial Evidence. Parasitology. 2009; 136: 317-328.
297. Nakao M, Yanagida T, Okomoto M. et al. State-of-the-Art Echinococcus and Taenia: Phylogenetic Taxanomy of Human Pathogenic Tapeworms an Its Application to Molecular Diagnosis. Infection, Genetics and Evolution. 2010; 10: 444-452.
298. Nakao M, Lavikainen A, Ito A, Yanagida T. Phylogenetic systematics of the genus Echinococcus (Cestoda: Taeniidae) Int J Parasitol. 2013; 43: 1017–1029.

300. Cardona GA, Carmena D. A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. *Vet Parasitol.* 2013; 192: 10–32.
301. Williams RJ, Sweatman GK. On the transmission, biology and morphology of *Echinococcus granulosus equinus*, a new subspecies of hydatid tapeworm in horses in Great Britain. *Parasitology* 1963; 53: 391–407.
302. Hüttner M, Nakao M, Wassermann T. et al. Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *Int J Parasitol.* 2008; 38(7) :861-868.
303. Hüttner M, Siefert L, Mackenstedt U, Romig T. A survey of *Echinococcus* species in wild carnivores and livestock in East Africa. *Int J Parasitol.* 2009; 39: 1269–1276
304. Hüttner T, Romig M. *Echinococcus* species in African wildlife. *Parasitology* 2009; 136(10): 1089-1095.
305. Ütük AE, Şimşek S, Koroglu E, Mc Manus DP. Molecular genetic characterization of different isolates of *Echinococcus granulosus* in East and Southeast regions of Turkey. *Acta Trop.* 2008; 107: 192-194.
306. Şimşek S, Eroksuz Y. Occurrence and Molecular Characterization of *Echinococcus granulosus* in Turkish mouflon (*Ovis gmelinii anatolica*). *Acta Trop.* 2009; 109: 167-169.
307. Snabel V, Altintas N, D'Amelio S, et al. Cystic echinococcosis in Turkey: Genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country. *Parasitol Res.* 2009; 105: 145-154.
308. Vural G, Baca AU, Gauci CG. et al. Variability in the *Echinococcus granulosus* Cytochrome c Oxidase 1 Mitochondrial gene sequence from livestock in Turkey and a Re-appraisal of the G1-3 genotype cluster. *Vet Parasitol.* 2008; 154: 347-350.
309. Arikoglu H, Arslan A, Hepdogru MA, Turhan AB. Expression profile and polymorphisms of actin genes in protoscoleces of *Echinococcus granulosus* from sheep in central Turkey. *Vet Parasitol.* 2009; 166: 80-85.
310. Şimşek S, Balkaya İ, Çiftçi AT, Ütük AE. Molecular discrimination of sheep and cattle isolates of *Echinococcus granulosus* by SSCP and conventional PCR in Turkey. *Vet Parasitol.* 2011; 178: 367-369.
311. Şimşek S, Kaplan M, Özeran IH. Comprehensive molecular survey of *Echinococcus granulosus* in formaline fixed paraffin embedded tissues in human isolates in Turkey. *Vet Parasitol.* 2011; 109: 411-416.
312. Ütük AE, Şimşek S. Molecular characterization of the horse isolate of *Echinococcus granulosus* in Turkey. *J Helminthol.* 2013; 87, 305-308.

313. Ütük AE, Pişkin FÇ. Melez bir dağ keçisinde hydatidosis ve moleküler karakterizasyonu. Kafkas Üniv Vet Fak Derg, 2010; 16: 671-673.
314. Yıldırım FA, Yıldız K, Çakır Ş, Gazyağcı AN. Kırıkkale Bölgesinde Koyun Kökenli *Echinococcus granulosus* İzolatlarının Moleküler Karakteri. Kafkas Üniv Vet Fak Derg, 2010; 16 (2) : 245-250.
315. Gökpınar S, Değirmenci R, Yıldız K. Kırıkkale’de kesilen sığırlarda *Echinococcus granulosus*’un moleküler olarak genotiplendirilmesi. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 2017; 64: 51-54.
316. Ergin S, Saribas S, Yuksel P. et al. Genotypic characterisation of *Echinococcus granulosus* isolated from human in Turkey. Afr J Microbiol Res, 2010; 4: 551-555.
317. Eryıldız C, Sakru N. Molecular characterization of human and animal isolates of *Echinococcus granulosus* in the Thrace Region, Turkey. Balkan Med J, 2012; 29: 261-267.
318. Ütük AE, Pişkin FC, Dalkiliç B. Molecular characterization of sheep isolates of *Echinococcus granulosus* in Kilis Province. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 2012; 18: 35-38.
319. Altıntaş N, Öztatlıcı M, Altıntaş N. et al. Molecular analysis of cattle isolates of *Echinococcus granulosus* in Manisa Province of Turkey. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 2013; 19: 455-459.
320. Simsek S, Cevik A. First detection and molecular characterization of *Echinococcus equinus* in a mule in Turkey. Acta Parasitol, 2014; 59: 773-777.
321. Kinkar L, Laurimäe T, Balkaya I. et al. Genetic diversity and phylogeography of the elusive, but epidemiologically important *Echinococcus granulosus sensu stricto* genotype G3. Parasitology, 2018; 1–10.
322. Kinkar L, Laurimäe T, Sharbatkhori M. et al. New mitogenome and nuclear evidence on the phylogeny and taxonomy of the highly zoonotic tapeworm *Echinococcus granulosus sensu stricto*. Infection, Genetics and Evolution, 2017; 52: 52–58.
323. Kinkar L, Laurimäe T, Simsek S. High-resolution phylogeography of zoonotic tapeworm *Echinococcus granulosus sensu stricto* genotype G1 with an emphasis on its distribution in Turkey, Italy and Spain. Parasitology 2016; 1790.
324. Siracusano A, Ortona E, Rigano R. Molecular and cellular tools in human cystic echinococcosis. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord 2002; 2(3): 235-245.
325. Turgay N, Üstün Ş. Echinococcosis’de immün cevap, In: N Altıntaş, R Tınar, A Çoker editors. Echinococcosis. İzmir: Ege Üniversitesi Matbaası, 2004; 107-113.
326. Öge S, Sarımehtemoğlu O, Gönenç B. et al. Cestod enfeksiyonlarında bağışıklık II. bazı metacestod enfeksiyonları için bağışıklık yanıtının irdelenmesi, In: Özcel MA, İnci A, Turgay N,

Köroğlu E editors. Tıbbi ve veteriner immünoparazitoloji. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları No:21, 2007; 563-575.

327. Matossian RM, Alami SY, Salti I, Araj GF. Serum immünoglobulin levels in human hydatidosis. Int J Parasit. 1976; 6: 367-371.

328. Matossian RM. The immünological diagnosis of human hydatid disease. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1977; 71: 101-104.

329. Musiani P, Piantelli M, Lauriola L, Arru E, Pozzuoli R. *Echinococcus granulosus* specific quantification of the two most immüno-reactive antigens in hydatid fluids. J Clin Pathol. 1978; 31: 475-478.

330. Oriol R, Williams JF, Perez Esandi MV, Oriol C. Purification of lipoprotein antigens of *E. granulosus* from sheep hydatid fluid. Am J Trop Med Hyg. 1971; 20: 569-574.

331. Capron A, Yarzabal LA, Vernes A, Fruit J. Le diagnostic immüno-logique de l'echinococcose humaine. Pathologie Biologie. 1970; 18: 357-65.

332. Varela-Diaz VM, Coltorti EA, Rickard MA, Torres JM. Comparative antigenic characterization of *Echinococcus granulosus* and *Taenia hydatigena* cyst fluids by immünoelectrophoresis. Res Vet Sci. 1997; 23: 213-216.

333. Dottorini S, Tassi C. *Echinococcus granulosus*: Characterization of the main antigenic component (Arc 5) of hydatid fluid. Exp Parasitol. 1977; 43: 307-14.

334. Altıntaş N. Echinococcus sp. ve Kist Hidatiğin İmmunolojisi. İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik (Echinococcosis), 7. Ulusal Parazitoloji Kongresi özel kitabı. T Parazitol Dern Yayın No: 10. Ege Üniv. Ofset Basımevi, Bornova-İzmir, 1991; 89-95.

335. Rickard MD, Williams JF. Hydatidosis/cysticercosis: immune mechanisms and immunization against infection. Adv. Parasitol. 1982; 21: 229-296.

336. Yong WK, Heath DD, Van Knapen F. Comparison of cestode antigens in an enzyme-linked immünosorbent assay for the diagnosis of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *Taenia ovis* infections in sheep. Res Vet Sci. 1984; 36: 24-31.

337. Rogan MT, Marshall I, Reid GD, Macpherson CN, Craig PS. The potential of vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*) and baboons (*Papio anubis*) as models for the study of the immunology of *Echinococcus granulosus* infections. Parasitology. 1993; 106: 511-517.

338. Rogan MT, Craig PS, Zehyle E. et al. In vitro killing of taeniid oncospheres, mediated by human sera from hydatid endemic areas. Acta Trop. 1992; 51: 291-296.

339. Simsek S. Elazığ yöresi koyunlarında kist hidatiğin yayılışı ve koyun kökenli kist sıvısının antijenik özelliklerinin araştırılması. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2003.

340. Altıntaş N, Yazar S. Cystic Echinococcosis'de immun tanı. Echinococcosis, Editörler: Altıntaş N, Tınar R, Çoker A. Hidatidoloji Derneği Yayın No: 1, Ege Üniversitesi matbaası, Bornova, İzmir, 2004.
341. Sanchez F, March F, Mercader M. et al. Immunochemical localization of major hydatid fluid antigens in protoscoleces and cysts of *Echinococcus granulosus* from human origin. Parasite Immunol, 1991; 13: 583-592.
342. Pan D, Bera AK, das SK, et al. Polymorphism and natural selection of; Antigen B1 of *Echinococcus granulosus* isolated from different host assemblages in India. Mol Biol Rep, 2010; 37(3): 1477-1482.
343. Shepherd JC, Aitken A, McManus DP. A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. Mol Biochem Parasitol, 1991; 44: 81-90.
344. Fernandez V, Ferreira HB, Fernandez C, Zaha A, Nieto A. Molecular characterization of a novel 8-kDa subunit of *Echinococcus granulosus* Antigen B. Mol Biochem Parasitol, 1996; 77: 247-250.
345. Chemale G, Haag KL, Ferreira HB, Zaha A. *Echinococcus granulosus* Antigen B is encoded by a gene family. Mol Biochem Parasitol, 2001; 116: 233-237.
346. Arend AC, Zaha A, Ayala FJ, Haag KL. The *Echinococcus granulosus* antigen B shows a high degree of genetic variability. Exp Parasitol, 2004; 108: 76-80.
347. Haag KL, Alves- Junior L, Zaha A, Ayala FJ. Contingent, non-neutral evolution in a multicellular parasite: Natural selection and gene conversion in the *Echinococcus granulosus* Antigen B gene family. Gene, 2004; 333: 157-167.
348. Virginio VG, Toroco L, Ramos AL, et al. Effects of protoscoleces and AgB from *Echinococcus granulosus* on human neutrophils: Possible implications on the parasite's immune evasion mechanisms. Parasitol Res, 2007; 100: 935-942.
349. Chemale G, Haag KL, Ferreira HB. et al. *Echinococcus granulosus* antigen B hydrophobic ligand binding properties. Biochim Biophys Acta, 2005; 1747: 189-194.
350. Monterio KM, Zaha A, Ferreira HB. Recombinant subunits as tools for the structural and functional characterization of *Echinococcus granulosus* Antigen B. Exp Parasitol, 2008; 119: 490-498.
351. Zhang W, You H, Li J. et al. Immunoglobulin profiles in a murine intermediate host model of resistance for *Echinococcus granulosus* infections. Parasite Immunol, 2003; 25: 161-168.

352. Virginio VG, Hernandez A, Rott MB. et al. A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potencial for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. Clin. Exp. Immunol, 2003; 132: 309-315.
353. Haag KL, Araujo AM, Gottstein B. et al. Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (Cestoda, Taeniidae): Selfing outcrossing? Parasitology, 1999; 118: 63-71.
354. Rosenzvit MC, Camicia F, Kamenetzky L, Muzulin PM, Gutierrez AM. Identification and intra-specific variability analysis of secreted and membrane-bound proteins from *Echinococcus granulosus*. Parasitol Int, 2006; 55: 63-67.
355. Haag KL, Zanotto PM, Alves-Junior L. et al. Searching for antigen B genes and their adaptive sites in distinct strains and species of the helminth *Echinococcus*. Infect Genet Evol, 2006; 6: 251-261.
356. Tawfeek GM, Elwakil HS, Awad NS. et al. Genetic variability of antigen B among *Echinococcus granulosus* Egyptian isolates. Korean J Parasitol, 2009; 47: 259-264.
357. Kamenetzky L, Muzulin PM, Gutierrez AM. et al. High polymorphism in genes encoding antigen B from human infecting strains of *Echinococcus granulosus*. Parasitology, 2005; 131: 805-815.
358. Frosch P, Hartmann M, Muhlschelegel F, Frosch M. Sequence heterogeneity of the Echinococcal antigen B. Mol Biochem Parasitol, 1994; 64: 171-175.
359. Mamuti W, Sako Y, Xiao N. et al. *Echinococcus multilocularis*: Developmental stage-specific expression of antigen B 8-kDa subunits. Exp Parasitol, 2006; 113: 75-82.
360. Şimşek S, Özçetin Ç, Balkaya İ. Detection of polymorphism in AgB1 gene from sheep, cattle and human isolates of *Echinococcus granulosus* by SSCP. Vet Parasitol 2012; 184: 352–355.
361. Zhang W, Li J, Jones MK. et al. The *Echinococcus granulosus* Antigen B gene family comprises at least 10 unique genes in five subclasses which are differentially expressed. PLoS Negl Trop Dis, 2010; 4: 784.
362. Knudsen B, Knudsen T, Flensburg M. et al. CLC Main Workbench. Version 5.5. Aarhus, Denmark, CLC bio. 2007.
363. Saitou N, Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Bio and Evol. 1987; 4: 406-425.
364. Yanagida T, Mohammadzadeh T, Kamhawi S. et al. Genetic polymorphisms of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in the Middle East. Parasitol Int. 2012; 61(4): 599-603.
365. Haag KL, Gottstein B, Ayala FJ (2008) Taeniid history, natural selection and antigenic diversity: evolutionary theory meets helminthology. Trends Parasitol 2008; 24(2): 96–102.

366. Chemale G, Ferreira HB, Barrett J, Brophy PM, Zaha A. *Echinococcus granulosus* antigen B hydrophobic ligand binding properties. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1747(2): 189–194.
367. Kamenetzky L, Muzulin PM, Gutierrez AM. et al. High polymorphism in genes encoding antigen B from human infecting strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*. 2005; 131(6): 805–815.
368. Riganò, R., Profumo, E., Bruschi, F. et al. Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. *Infection and Immunity*. 2001; 69: 288–296.
369. Riganò, R., Buttari, B., Profumo, E. et al. *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a th2 cell response. *Infection and Immunity* 2007; 75: 1667– 1678.
370. Diaz A, Willis AC, Sim RB. Expression of the proteinase specialized in bone resorption, cathepsin K, in granulomatous inflammation. *Molecular Medicine* 2000; 6: 648–659.
371. Marco M, Baz A, Fernandez C. et al. A relevant enzyme in granulomatous reaction, active matrix metalloproteinase-9, found in bovine *Echinococcus granulosus* hydatid cyst wall and fluid. *Parasitology Research* 2006; 100, 131–139.
372. Esfedan AF, Sarkari B, Mikaeili F. Genetic Variability of Antigen B8/1 among *Echinococcus granulosus* Isolates from Human, Cattle, and Sheep in Fars Province, Southern Iran. *Rep. Biochem. Mol. Biol*, 2018; 6: 2.
373. Sarkari B, Biranvand E, Sadjjadi SM, Rahimi H. Genetic Variability of Antigen B2 of Human, Sheep, Goats, Camel and Cattle Isolates of *Echinococcus granulosus* in Iran. *Iranian J Parasitol*. 2013; 8(4): 545-551.
374. Patricia Marcela Muzulin, Laura Kamenetzky, Ariana Marcela Gutierrez, Eduardo Alfredo Guarnera, Mara Cecilia Rosenzvit. *Echinococcus granulosus* antigen B gene family: Further studies of strain polymorphism at the genomic and transcriptional levels. *Exp Parasitol*. 2008; 118: 156–164.
375. Burgu A, Doğanay A, Gönenç B, Sarımehtemoğlu HO, Kalınbacak F. Analysis of Fluids of Hydatid Cysts From Sheep by SDS-PAGE and Determination of Specific Antigens in Protein Structure by Western Blotting. *Turk J Vet Anim Sci*. 2000; 24: 493-500.
376. Moro P, Verastagui M, Gilman RH. Et al. Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot Assay for Diagnosis of Hydatidosis (*Echinococcus granulosus*) in Sheep. *Vet Rec*. 1997; 140(23): 605-606.
377. Shepherd JC, McManus DP. Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Mol Biochem Parasitol* 1987; 25: 143-154.

378. Maddison SE, Slemenda SB, Schantz PM. et al. A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 40: 377-383.
379. Kanwar JR, Kaushik SP, Sawhney IMS. et al. Specific Antibodies in Serum of Patients with Hydatidosis Recognised by Immunoblotting. *J. Med. Microbiol.* 1992; 36: 46-51.
380. Gottstein B, Eckert J, Michael SA, Thompson RCA. *Echinococcus granulosus* Antigens: Immunoelectrophoretic and Western Blot Analysis of Hydatid Cyst Fluids. *Parasitol Res.* 1987; 73: 186-189.
381. Ibrahim MM, Rafiei A, Dar FK. et al. Serodiagnosis of cystic echinococcosis in naturally infected camels. *Parasitology* 2002; 125: 245–251.
382. Gatti A, Alvarez AR, Araya D. et al. Ovine echinococcosis. Immunological diagnosis by enzyme immunoassay. *Vet Parasitol.* 2007; 143: 112–121.
383. Yong WK, Heath DD, Van Knapen F. Comparison of cestode antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *Taenia ovis* infections in sheep. *Res Vet Sci.* 1984; 36: 24–31.
384. Pan D, Bera AK, Bandyopadhyay S. et al. Relative expression of antigen B coding gene of bubaline isolates of *Echinococcus granulosus* in fertile and sterile cysts. 2010; 84: 241–244.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Harun Kaya KESİK

Doğum Yeri ve Tarihi : Erzincan, 15.02.1990

İletişim : kesikharun@gmail.com
+90 507 369 1579

Eğitim Bilgileri

Erzincan Orgeneral Selahattin Demircioğlu İlkokulu : 1997-2001
Erzincan Ziya Gökalp İlköğretim Okulu : 2001-2004
Erzincan Milliyet Anadolu Öğretmen Lisesi : 2004-2008
Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi : 2009-2014
Fırat Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü : 2014-2018

9. YAYINLAR

1. Ahmed H, Şimşek S, Saki CE, **Kesik HK**, Gunyaktı Kılınc S. Molecular Characterization of *Hypoderma spp.* in Domestic Ruminants from Turkey and Pakistan. J. Parasitol, 2017; 103(4): 303-308.
2. Gazioglu A, Şimşek S, Kizil Ö, Çeribaşı AO, **Kesik HK**, Ahmed H. Clinical, Pathological and Molecular Evaluations and CT Scan Screening of Coenurosis (*Coenurus cerebralis*) in Sheep and Calves. Braz. J. Vet. Parasitol. 2016; 26(1): 3-9.
3. Gelen S, **Kesik HK**, Şimşek S. *Fasciola hepatica*'nın morfometrik ve moleküler analizi. F.Ü.Sağ. Bil. Derg. 2016; 30(3): 199-202.
4. **Kesik HK**, Günyaktı Kılınc Ş, Şimşek S. Türkiye'nin Farklı İllerinden Elde Edilen Buzağı Dışkılarında Eimeria Ookistlerinin Yaygınlığı ve Ookist Yükünün Belirlenmesi. F.Ü.Sağ. Bil. Derg. 2018, (Kabul edildi).