

TRAKYA'DA BÜYÜK VE KÜÇÜK RUMİNANLARDA KİSTİK ECHINOCOCCOSİSİN YAYILIŞI VE GENOTİPLERİN BELİRLENMESİ

GÜLAY VURAL, MUSTAFA N MUZ

NKÜ BAP PROJE NO: NKUBAP.00.23.AR.14.04

Özet

Echinococcus granulosus yaşam döngüsünde iki konak kullanan bir sestodtur. Olgun formu köpeklerin ve diğer canidelerin ince bağırsaklarında, larval formu (metasestod) herbivor ve omnivorların başta akciğer ve karaciğer olmak üzere çok sayıda organ ve dokularında gelişmektedir. *E. granulosus*'un patojenik formu kist hidatik olarak adlandırılmaktadır. Bu nedenden dolayı hastalık hidatidosis olarak da bilinmektedir. Bu form dünyanın bir çok ülkesi ve bölgesinde ciddi bir halk sağlığı problemidir ve kontrolü daha güç, masraflı ve az etkilidir. Kontrol programları eğitim yolu ile halkı bilgilendirmek ve son konak köpeklerin tedavisine dayanmaktadır. Güçlü kontrol programlarına rağmen birçok ülkede hastalık ciddi zoonoz olarak etkisini göstermektedir. Hastalığı önlemek amacıyla arakonaklarda kullanılmak üzere bir aşı geliştirilmesi kontrol programlarında alternatif bir yaklaşım olarak düşünülmektedir. Bu noktada rekombinant DNA teknolojisi konağı koruyan antijenleri içeren aşı hazırlanması ve üretilmesinde yardımcı olmaktadır. *Echinococcus* cinsinin genotiplendirme çalışmaları sonunda bu cins içerisinde farklı türler bulunmuş olup bu türlerin farklı hayvan veya hayvan türlerini enfekte ettiği bilinmektedir. Hastalığın kontrolü amacıyla koyunlarda kullanılan Rekombinant EG95 aşısının geliştirildiği genotip G1'dir. Bu çalışmada Trakya'da mezbahalara kesim için getirilen koyunlarda hangi genotiplerin bulunduğu araştırılmıştır. Bunun için toplanan örneklerin 50'sinin gDNA'sından cytochrom c oxidase geninin dizi analizi yapılmıştır. Öncelikle toplanan örneklerden gDNA izole edilmiş daha sonra bunun üzerinden ilgili gen bölgesi belirlenerek çoğaltılmıştır. Daha sonra dizi analizi yapılarak baz sıraları belirlenmiş ve gen bankasındaki değişik

Echinococcus granulosus genotiplerine ait baz sıraları ile karşılaştırılmıştır. İşlenen 50 örnekten 50'si G1-G3 (*sensu stricto*) (yaygın koyun alt türü) olarak tespit edilmiştir. Mezbahalarda yapılan bu çalışma esnasında farklı tür çiftlik hayvanlarına ait echinococcosis yayılımı da saptanmış olup koyunlarda %22,9; sığırlarda %4; keçilerde %8,8 oranında kist hidatik bulunmuştur. Bu kistlerin çoğunluğu akciğerlerde saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Echinococcus granulosus*, kist hidatik, koyun, genotip, Türkiye, suş, alttür, yayılım.

Distribution and Determination of Genotypes of Cystic Echinococcosis in Large and Small Ruminants in Thrace

Abstract

Echinococcus granulosus is a parasitic cestod with a life cycle involving two hosts. The adult worm develops in the small intestine of dogs and other canids and the larval form (metacestod) develops mainly in the liver and lungs of numerous species of herbivores and omnivorous intermediate hosts including sheep, cattle, camel, swine and humans. Hydatid cyst is a pathogenic form of *E. granulosus*. Because of that the disease is known as hydatidosis. This form of *E. granulosus* remains a considerable public health problem in many countries of the world and in several regions. In so many geographical regions, control of public awareness of hydatid disease by education and treatment and control of dog population. Despite the effectiveness of control programmes the disease remains a serious zoonotic disease in several countries. The development a vaccine to prevent disease in intermediate hosts is considered as another approach for use in control programmes. Recombinant DNA technology provides an alternative strategy to provide host protective antigens for vaccination and can be used to produce an effective vaccine against echinococcosis in sheep.

Echinococcus granulosus is known to occur as several strains or genotypes (designated as G1-G10) worldwide, infecting different intermediate hosts species. The strain that was investigated and used to develop the recombinant EG95 vaccine was genotype 1.

In this study, we attempted to distinguish *E. granulosus* genetically from sheep, cattle and goats. 50 isolates were analysed for sequence variation within a region of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (CO1). For this purpose, gDNA was extracted and then PCR was used to amplify a region of the cytochrome c oxidase gene of each of the samples and the results were compared with DNA sequence of the known sequence of CO1 from *E. granulosus* in the GenBank. 50 samples were determined *E. granulosus sensu stricto* (G1-3).

Key words: *Echinococcus granulosus*, cyst hydatique, sheep, genotype, strain, Turkey.

1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

1.1. Echinococcosisin Tarihçesi

Echinococcosis terimi Echinococcus cinsinde yer alan herhangi bir tür tarafından oluşturulan enfeksiyona verilen addır. Parazitin olgunları tarafından oluşturulan enfeksiyona “intestinal echinococcosis”, larvaları tarafından oluşturulan enfeksiyona ‘larval echinococcosis’ veya daha çok bilinen ismi ile “hydatidosis” denmektedir.

Hastalık çok eski zamanlardan beri bilinmektedir. M.Ö.16. yüzyıldaki Mısır Ebers Papiruslarında bu hastalıktan bahsedilmektedir. Bu dönemde kesimi yapılan koyun ve sığırların iç organlarında sıvı dolu keseler görüldüğü eski kayıtlarda bildirilmektedir. Echinococcus cinsinin özellikleri ilk kez 1801 yılında Rudolphi tarafından tarif edilmiştir. Siebold, 1852 yılında koyun ve sığırlardaki kistleri köpeklere yedirerek olgun Ekinokokları elde etmiş, arakonaklarda görülen kistlerin parazitin larval formu olduğunu ortaya koymuş ve olgun şekline *Taenia echinococcus* adını vermiştir. Multilokuler kistin görülmesinden sonra ilk kez 1955 yılında Vogel tarafından *Echinococcus granulosus* ve *Echinococcus multilocularis* birbirinden ayrılarak tanımlanmıştır (TINAR, 2004).

1.2. *Echinococcus granulosus*’un Taksonomisi

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda *Echinococcus* cinsi içinde toplam 16 tür ve 13 alt tür bulunduğu ileri sürülmesine rağmen, bunların ayrı bir tür ve alt tür oldukları biyolojik olarak doğrulanamamış olup, çoğunun geçersiz ve birbirinin sinonimi olduğu bildirilmektedir (TINAR, 2004; THOMPSON ve MCMANUS, 2002).

Son genetik çalışmalar kapsamında *Echinococcus* cinsinde *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. equinus*, *E. vogeli*, *E. oligartrus*, *E. orteppi*, *E. canadensis*, *E. felidis* ve *E. shiquicus* ’tur (ECKERT ve ark., 2002; THOMPSON VE MCMANUS, 2002; XIAO ve ark., 2006). *Echinococcus* türlerinin sınıflandırmadaki yeri aşağıda olduğu gibidir (ECKERT ve

ark., 2002; SOULSBY, 1986; XIAO VE ARK., 2006, NAKAO et al., 2007, NAKAO et al., 2010, NAKAO et al., 2013, NAKAO et al., 2015).

Sınıf	Cestoda
Altsınıf	Eucestoda
Takım	Cyclophyllidea
Aile	Taenidae (Ludwig, 1986)
Cins	<i>Echinococcus</i> (Rudolphi, 1801)
Tür	<i>Echinococcus granulosus sensu stricto</i> (G1-G3) <i>Echinococcus multilocularis</i> <i>Echinococcus oligarthrus</i> <i>Echinococcus vogeli</i> <i>Echinococcus shiquicus</i> <i>Echinococcus orteppi</i> (G5) <i>Echinococcus canadensis</i> (G6-G7-G8-G10) <i>Echinococcus felidis</i> <i>Echinococcus equinus</i> (G4)

Echinococcus granulosus alt türleri morfolojik, biyokimyasal, fizyolojik, patojenite yönleri ile ve insan dahil değişik türler için enfektif olma özelliklerine göre farklılıklar göstermektedir. Bu özellikler hastalığın epidemiyolojisinde büyük etki yapmaktadır. *Echinococcus* türlerinin kimliklendirilmesinde sınırlı sayıda morfolojik özellikten yararlanılmakta ve bu özellikler temel alınarak yapılan sınıflandırma konusunda fikir ayrılıkları bulunmaktadır. Bunun da ötesinde morfolojik özelliklerin bazı çevre faktörlerinden etkilenmesi karmaşaya yol açmaktadır. Genetik kimliklendirme, dış etkilere kaynaklanan fenotip değişiklikleri ve yaşam siklusu değişiklikleri gibi değişkenlerden köken alan karmaşanın üstesinden gelmiştir. Ancak farklı alt kimliklerin konak yelpazesi, infektivitesi, virulansı, ilaç duyarlılığı net değildir. Ancak konak faktörünün parazitin fenotipini büyük oranda etkilediğini ortaya konmuştur (ECKERT ve ark., 2002; MCMANUS ve BOWLES,1996).

Alt türlerin yada daha geniş kullanımıyla genotip belirlenmesinde bir çok metot kullanılmaktadır. Bunların en yaygın olanları mitokondrial ND1 ve CO1 analizi, ribozomal ITS1- PCR- RFLP örneklerinin karşılaştırılmasıdır. Bunların dışında SSCP, nükleer genlerin

kodlanmayan sekanslarında farklı genlerin aranması ve mikrosatelitlerin belirlenmesi gibi yöntemler de kullanılmaktadır (ECKERT ve ark., 2002; GASSER,1998; MCMANUS VE THOMPSON, 2003).

Echinococcus granulosus sensu stricto (G1-G3) alt türleri dünyada en yaygın en iyi bilinen alttürdür. DNA düzeyinde değişken bir yapıya sahip değildir. İlk olarak koyunlarda bulunmuştur ve en yaygın ara konağı da koyundur. Hem koyunda hem de diğer türlerde (ki bu türler sığır, keçi, insan domuz, deve, manda, kanguru) farklı bölgelerde bulunmasına rağmen aynı mitokondrial CO1 genotipini paylaşmaktadırlar (BOWLES ve ark., 1992; THOMPSON ve MC MANUS, 2002; ECKERT ve ark., 2002). Koyunlarda bulunan tüm *E. granulosus* türlerinin Tasmanya alt türü hariç, biyolojik ve epidemiyolojik özellikleri ile homojen olduğu kabul edilmektedir. Tasmanya alt türünün hem prepatent periyodu kısa ve hem de morfolojik farklılıkları bulunmaktadır. Tasmanya alt türünün yapılan CO1 sekans analizinde de bu farklılıklar görülmüş ve *E. granulosus* G2 alt türü olarak kimliklendirilmiştir. *E. granulosus* G1 ve G2 alt türü arasında CO1 sekans farklılığı mitokondrial CO1 geninin 366 bazının üç nükleotid inde bulunmaktadır. Bu farklılık iki amino asitte değişime yol açmaktadır. Bu küçük farklılaşma Tasmanya alt türünde büyük değişimlere yol açsa bile genel kanı bu alt türün G1 alt türünden köken aldığı yönündedir (BOWLES ve ark., 1992).

Arjantin’de ROSENZVIT ve ark (1999) tarafından yapılan çalışmada koyunlarda görülen en yaygın alt türün G1 olduğu ancak bazı bölgelerde koyunlarda G2 (Tasmanya alt türü) ye de rastlandığını bildirmişlerdir. G2 ‘nin 20 yy’ ın başında Avustralya’dan Arjantin’e Merinos koyunu getirilmesi ile bu kıtaya geldiği düşünülmüştür. Çünkü Arjantin’den bu kıtaya hiçbir şekilde koyun ihraç edilmemiştir. Araştırmacılar (ROSENZVIT ve ark., 1999) köpeklerde G2 alt türünün bulunduğu bölgede aynı zamanda G7 domuz alt türünün de çok yaygın olduğunu ve bu bölgede kontrol programları oluştururken bu iki alt türün köpeklerde olgunlaşma süresinin kısa oluşunun göz önünde bulundurularak ilaçlamanın buna göre

yapılması gerektiğini vurgulamaktadırlar. Başka bir çalışmada (ZHANG ve ark., 1999) *E. granulosus* G6 deve ve G7 domuz alt türüne insan konakların çok duyarlı olmadığı yönündeydi. Arjantin’de yapılan bu çalışmada insanlarda G6 deve alt türü tespit edilmiştir ve G6 alt türünün bu ülkede biraz mutasyona uğradığı ve insanlar için daha enfektif bir duruma geldiği düşünülmektedir. Arjantin’de deve olmadığından G6 ‘nın kaynağının lama ve alpaka olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu ülkede keçilerde G6 bulunmuştur. KAMENETZKY ve ark (2002) daha sonra Arjantin’de DNA tekrarlanabilir element ve CO1 gen analizi kullanarak daha kapsamlı bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bunun sonucunda beş farklı alt tür tespit etmişlerdir. Bunlar G1, G2, G5, G6 ve G7dir. İnsanlarda görülen en yaygın tür G1 olmakla beraber G2 ve G6 alt türünün de azımsanmayacak oranda olduğunu belirtmektedirler. Tazmanya koyun alt türünün (G2) kaynağı hem koyun hem de sığırlardır. G6 deve alt türü ise keçilerde bulunmuştur. Böylelikle bu ülkede G6 kaynağı keçilerdir. Diğer ülkelerden farklı olarak insanlarda yaygın koyun alt türünün dışında G2, G5 ve G6 ile insan enfeksiyonlarına rastlanmıştır.

Brezilya’da son yıllarda yapılan bir çalışmada (DE LA RUE ve ark., 2006) sığır ve koyun orijinli kistlere CO1 analizi yapılmış ve koyunlarda G1, sığırlarda G1 ve G5 tespit edilmiştir. Diğer bir nokta G5 sığırlarda sadece akciğerde bulunmuştur.

G5 alt türü 1934 yılında Güney Afrika’da Ortlepp tarafından tarif edilen ve bu gün bazı araştırmacılar tarafından *Echinococcus ortleppi* olarak kabul edilen alt türdür. Sığır alt türü G5 Avrupada değişik ülkelerden bildirilmiştir. 11 yaşındaki alman hastadan elde edilen kısmen kalsifiye kist, PCR-RFLP analizi ve mitokondrial gen karşılaştırmaları yapılarak G5 olarak belirlenmiş ve böylelikle sığırlarda görülen *E. granulosus* G5 alt türünün insanlar için enfektif olduğu ortaya konmuştur. Daha sonra Güney Amerika ve Meksika’dan da bu alt türle insan enfeksiyonları bildirilmiştir (MARAVILLA ve ark., 2004; ROSENZVIT ve ark., 2001).

DINKEL ve ark. (2004) Doğu Afrika'da Kenya ve Sudan'da değişik *E. granulosus* kist örneklerinde ITS1 ribosomal DNA analizi ve CO1 gen amplifikasyonuna dayanarak Kenya'da insanlarda G1, G6; Sığırlarda G1, G6; Develerde G1, G6; Koyunlarda G1; Keçilerde G1, G6 ve domuzlarda G1, G6 ve G5 (*E. orteppi*); Sudan'da sığırlarda G5 ve G6; develerde G6; koyunlarda G6 bulduklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmada G5 ilk defa domuzlarda görülmüştür.

Tunus'ta LAHMAR ve ark (2004) tarafından yapılan çalışmada 291 deveden sağlanan kistlerin CO1 gen analizlerinde tüm kistlerin *E. granulosus* G1 formunda olduğu bildirilmiştir. Tunus'ta develerin eti için yaygın olarak tüketildiği düşünüldüğünde kontrolsüz kesimlerin hastalığın yayılmasında ne şekilde rol oynayacağı açıktır. Ayrıca develerde *E. granulosus* G1 kistleri büyük oranda fertil bulunmuştur.

Avustralya kıtasında G1 alt türünün domestik ve silvatik siklusu paylaştığı belirlenmiştir (ECKERT ve ark., 2002). Bunun yanında bu kıtada G2 de bulunmaktadır.

Xinjian (Sincan) Uygur özerk bölgesinde ZHANG ve ark (1999) tarafından yapılan çalışmalarda mitokondrial ND1 ve CO1 gen sekanslamaya göre G1 ve deve G6 insanlardan izole edilmiştir. Aynı şekilde İran'da ZHANG ve ark (1998) tarafından yapılan başka bir çalışmada insan, koyun, keçi sığır ve deve örneklerinden sadece develerde G6 alt türü bulunmuş, diğer hayvan ve insanlarda yaygın türün G1 olduğu saptanmıştır.

Nepal' de ZHANG ve ark (2000) manda, keçi, koyun, domuz ve insanlardan toplanan kistlerin mitokondrial ND1, CO1 analizinde G1, G5 ve G6 'yı saptamışlardır. İnceledikleri 18 izolat G5, 7 izolat G1 ve 2 izolat G6 olarak sonuç vermiştir. G5 olduğu saptanan 18 izolatın 14'ü manda, 2'si koyun ve 2si de keçiden sağlanmıştır. G1 çıkan 7 izolatın 3'ü manda, 2'si koyun ve 2si keçi kökenlidir. Bulunan iki G6 izolatının ikisi de insan kaynaklıdır.

rDNA'nın ITS1 bölgesini hedef alan PCR tabanlı RFLP bu alt türlerin ayrılmasında kullanılan en hızlı teknik olarak kabul edilmektedir. Bu prosedür kullanılarak BOWLES ve ark (1992) tarafından yaygın koyun G1, deve G6 ve domuz G7 alt türleri ayrılmıştır. Başlangıçta domuz (G/7) alt türünün insanlar için düşük enfektivitede olduğu sanılmaktaydı. Ancak Polonya'da domuzların yaygın olarak bulunduğu bölgelerde insanlardan G7 alt türü izole edilmiştir (BOWLES ve ark., 1993). Yine Polonya'da daha sonraki çalışmalarda insanlarda aynı yöntemlerle domuz kökenli G9 alt türü saptanmıştır (SCOTT ve ark., 1997). G9 alt türünün G7 alt türü ile kıyaslandığında daha küçük kistlerin sahip olduğu, kistlerin canlılığının daha zayıf olduğu ve zayıf gelişme özelliği gösterdiği belirlenmiştir. Daha sonraları KEDRA ve ark. (1999), Polonya, Slovakya ve Ukrayna'da 56 domuz ve 4 insan izolatını mitokodrial ND1 ve rDNA ITS1 yönünden analiz etmişler ve oldukça farklı bölgelerden toplanan tüm izolatların G7 alt türü formunda olduğunu belirlemişlerdir. Böylelikle G7 alt türünün insan ekinokkozunda etiyolojik ajan olduğu kesinlik kazanmıştır. Ancak araştırmacılar (KEDRA ve ark.,1999) rDNA ITS1 yönünden G9 alt türüne yakınlık belirleyemediklerinden, G9 insan alt türünün varlığı konusunda karmaşa hakimdir.

Bulgaristan'da sığır, koyun ve domuzlardan toplanan kist örneklerinin analizinde tüm örneklerin G1 olduğu tespit edilmiştir (REYER ve ark., 2004).

İspanya'da koyunlarda G1; keçilerde G1 ve G7; Sığırlarda G1; domuzlarda G1 ve G7; yaban domuzlarında G1 ve G7; Atlarda G4 ve insanlarda G1 alt türleri belirlenmiştir. Yaban domuzlarında G1 ve G7 nin tespit edilmesi siklusu tamamlanmasında yabani karnivorların önemini ve hastalığın epidemiyolojisindeki rolünü bir kez daha vurgulaması yönünden önemli bulunmuştur (MWAMBETE ve ark., 2004).

Atlarda görülen alt tür G4 ayrı bir tür "*Echinococcus equinus*" olarak düşünülmektedir. G4 alt türü bu güne kadar atlar ve eşekler dışında başka bir hayvanda görülmemiştir. Ayrıca yapılan biyolojik, epidemiyolojik, biyokimyasal ve moleküler biyolojik

alışmalar bu alttürün tamamen farklı olduğunu ortaya koymuş ve aynı bölgede bulunduğunda bile koyun alt türleriyle kesinlikle karışmadığını göstermiştir (MCMANUS ve THOMPSON, 2003) .

Yabani geyik ve karacalarda mitokondrial sekanslama ve ITS1-PCR fragmana göre belirlenen *E.granulosus* türü G8 ve G10 alt türüdür. Sırasıyla Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa’ da grlmştir (LAVIKAINEN ve ark., 2003). Daha nceleri, Kuzey-batı Kanada’da geyiklerde görülen ve geyik-köpek döngüsüne sahip olan tür *E. granulosus canadensis*, Kuzey Amerika’da geyik-tilki döngüsüne sahip tür, *E. granulosus borealis* olarak bildirilmişti. Son yapılan alışma (THOMPSON ve ark., 2006), Kuzey Avrupa’da belirlenen G10 alt türünün *canadensis* formuyla ilişkili olabileceğini öne sürmektedir. Kuzey Amerika’da *E. granulosus* G8 insanlarda silvatik hidatidosisten sorumlu tutulmaktadır. *E.granulosus* G8 ve G10’un birbirlerinden virulans ve insanlardaki patojenik özellikleri yönünden farklı olabileceği de düşünülmektedir. Alaska ve Kanada’da G8 kaynaklı hidatidosis, pastoral hidatidosisten daha iyi tabiatta olmasıyla ve insanlarda karaciğerden çok akciğer tutulumuna neden olmasıyla bilinmektedir. G10 alt türü ile bu gün aynı tutulum olabilir düşüncesi vardır. Çünkü İşkandinavya’da bu türün yaygın olduğu bölgelerdeki insan enfeksiyonları da akciğer tutulumludur.

Türkiye’de *Echinococcus granulosus* ‘un alt türlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar (TK ve ark., 2006; YOLASIĞMAZ ve ark., 2006) bulunmaktadır.

TK ve ark (2006), Elazığ ilinden, mezbahadan topladıkları 20 koyun kist örneğinin tümünün CO1 gen analizinde sadece G1 formunda bulunduğunu tespit etmişlerdir.

YOLASIĞMAZ ve ark (2006) ise, Slovak Bilimler Akademisi ile ortaklaşa yaptıkları çalışmada Türkiye kökenli insan, sığır, domuz ve koyun rneklerinin ND1 ve CO1 gen dizilimlerini ortaya koymuşlardır. Araştırıcılar (YOLASIĞMAZ ve ark., 2006), çalıştıkları örneklerde genel olarak G1, sadece domuz örneklerinde G7 alt türüne

rastladıklarını bildirmektedirler. ŞİMŞEK ve ark., bir katırda, daha sonra bir eşekte G4 (*Echinococcus equinus*)’ü ilk kez bildirmişlerdir ŞİMŞEK et al., 2014; ŞİMŞEK et al., 2015).

1.3. Türkiye’de *E. granulosus*’un Yayılışı

Echinococcus granulosus’ un Türkiye’de köpeklerdeki yayılışı Tablo 3’te görülmektedir (ALTINTAŞ N 2003).

Tablo 1. Otopsi bakısında *E. granulosus*’un köpeklerde yayılışı

ŞEHİR	YIL	SAYI	ENFEKSİYON ORANI
Ankara	1933 – 1960	627	0.3
Elazığ	1981-1982	100	4
İzmir	1989	600	5.5
Bursa	1989	36	36.0
Sivas	1990	25	16.0
Kayseri	1990 – 1993	100	24.0
Ankara	1997	106	0.9
Kars	1997	42	40.5
Elazığ	1997	bildirilmemiş	18,9

Kist hidatikin çiftlik hayvanlarında yayılışı, 1975-1976 yıllarında koyunlarda %3,9; sığırlarda %2,8, keçilerde %2; mandalarda %3,7; Konya mezbahasında yapılan sayımda koyun, sığır ve keçilerde sırasıyla %51,9, 11,2 ve 29,3; Sivasta koyun akciğerlerinde %32,6, karaciğerde %16,7 belirlenmiştir (ALTINTAŞ N, 2003).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Örneklerin toplanması

Koyunlardan *Echinococcus granulosus* kistlerinin toplanması amacıyla düzenli olarak Tekirdağ Süleymanpaşa ve Malkara mezbahaları haftalık olarak Kasım 2015- Haziran 2016 tarihleri arasında ziyaret edilmiştir. Adı geçen mezbahalarda kesim için getirilen hayvanlar Trakya bölgesinden olup koyun, sığır ve keçi kesimlerine ait işlemlere tanık olunmuştur. İncelenen hayvan sayısı Tablo 1 de görülmektedir. Kesimhanede sadece 2 yaş üstü hayvanlar takip edilmiştir. Kistler bulundukları organa göre tasnif edilmiş, her kist için ayrı enjektör kullanılarak her kiste ait protoskoleksler ayrı tüplere alınmış ve numaralandırılmıştır. Protoskolekslerin canlılığı için flame cell activity gözlenmiştir. Protoskoleksler steril FTS ile yıkanıp %70 etil alkolde tespit edilmiştir. İşlem göreceği güne kadar oda sıcaklığında saklanmıştır.

Tablo 2. İncelenen toplam hayvan sayısı ve türleri

Hayvan türü	Örnek sayısı Kesime gelen 2 yaş üstü hayvanlar
Sığır	1800
Koyun	624
Keçi	73
Toplam	2497

2.2. Moleküler analiz

Moleküler analiz için 35 koyun, 10 sığır ve 5 keçi olmak üzere toplam 50 örnek seçilmiştir. Moleküler analizler NKÜ Merkezi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

DNA ekstraksiyonu

Protoskolekslerden total genomik DNA, High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) ile elde edilmiştir. Protoskoleksler lisis için bir gece Ben Mari'de 55 °C de bırakılmıştır. Bütün işlemler kit prospektusuna göre gerçekleştirilmiştir.

Jel elektroforezi

0,55 g Agarose jel

37 ml. TBE karıştırılarak (SAMBROOK ve RUSSEL, 2001)

2 dakika 350 W mikrodalgada ertilmiş ve tanka boşaltılmıştır.

Örnekler jele yüklendikten sonra 55 W da 1 saat yürütülmüştür.

Primerler

PCR için gerekli forward ve reverse primerler belirlenerek (BOWLES ve ark., 1993) özel şirkete yaptırılmıştır.

Yaptırılan CO1 primerler;

Forward 5'TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT3'

Reverse 5'TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG3'

Polimerase Chain Reaction (PCR)

SAMBROOK ve RUSSEL (2001)' a göre gerçekleştirilmiştir.

Bir örnek için 60 µl lik PCR reaksiyonu oluşturulmuştur;

30 µl master miks

2,4 µl forward primer

2,4 µl reverse primer

15,2 µl steril distile su

10 µl DNA örneği

Termocycler koşulları;

94 °C 5 dak. 1 siklus

94 °C 30sn.	}	30 siklus
55 °C 30sn.		
72 °C 30sn.		

72 °C 5 dak. 1 siklus

Saflaştırma

High pure PCR product Purification Kit (Roche) ile yapılmıştır.

Saflaştırılan örneklerin jel elektroforezi

0,55 g Agarose jel

37 ml. TBE (SAMBROOK ve RUSSEL, 2001)

2 dakika 350 W mikrodalgada ertilmiş ve tanka boşaltılmıştır.

Örnekler jele yüklendikten sonra 55 W da 1 saat yürütölmüştür.

Sekanslama (Dizi analizi)

Saflaştırılan örnekler sekans cihazında dizilenmiştir.

Sekans sonuçlarının karşılaştırılması

National Center for Biotechnology Information (NCBI) ‘nin aşağıdaki sayfasından yapılmıştır

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

3. BULGULAR

Mezbaha ziyaretleri sonucu kesime girmiş toplam 2497 hayvan izlenmiştir. Bunların 1800'ü sığır olup, kesimhaneye getirilen sığırların tamamı kapalı sistemde yetiştirilen sığırlardır. Sığırlardaki enfeksiyon oranı %4 olarak saptanmıştır. Mezbahaya kesim için getirilen 2 yaş üstü 624 koyun ve 73 keçi muayene edilmiştir. Tespit edilen kist hidatik oranı sırasıyla %22,9 ve %8,8 dir. Saptanan kist hidatiklerin organlara göre dağılımına bakıldığında çoğunluğun akciğerde gözlendiği saptanmış olup sığırlarda enfekte 72 organın 48'i akciğer; 24'ü karaciğerdir. Koyunlarda akciğer ve karaciğer enfeksiyonu başa baş olarak tespit edilmiş olup 72 karaciğer, 71'i akciğer olarak saptanmıştır. Keçilerde ise sadece akciğer enfeksiyonu gözlenebilmiştir Tablo 3. Fertilite oranlarına bakıldığında koyunlarda ve keçilerde %92 fertil kist bulunmuş olup; sığırlarda fertil kiste rastlanmamıştır.

Her bir örnek standart PCR ile çalışıldıktan ve saflaştırıldıktan sonra jel elektroforezi yapılarak kontrol edilmiştir. Yürütülen PCR ürünü 444 baz çifti uzunluğunda jelde görüntülenmiştir (Şekil 1).

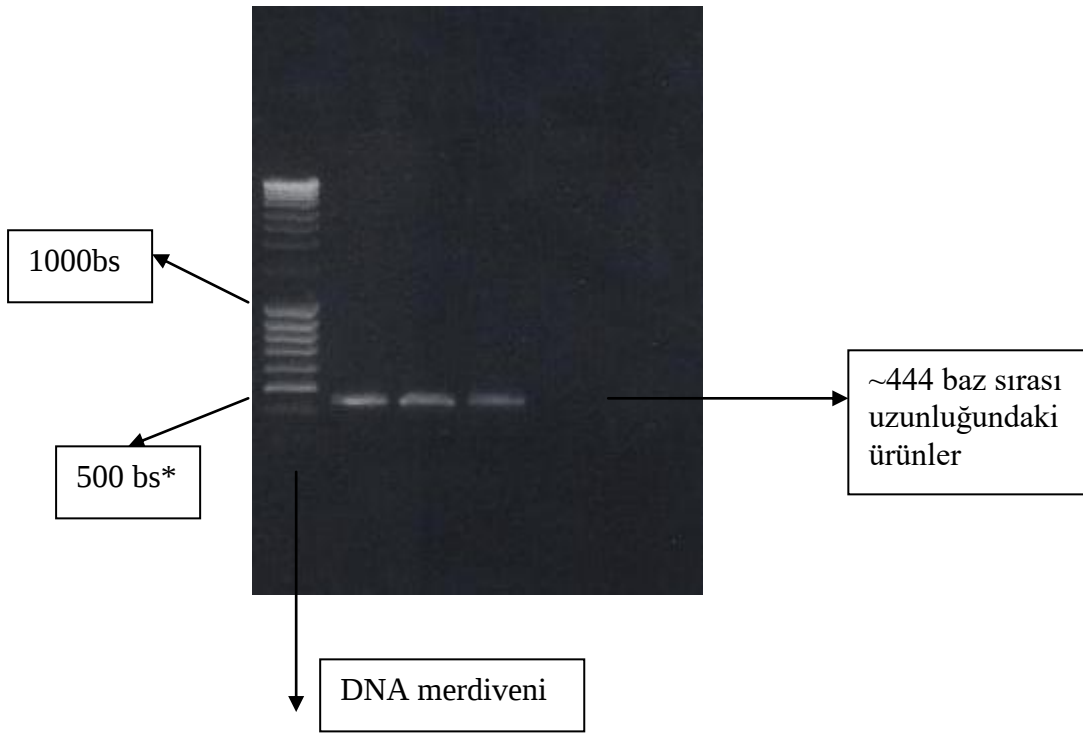
Tablo 3. Toplanan kist örneklerinin türlere ve organlara dağılımı

Hayvan türü	Örnek sayısı 2 yaş üstü	Bulundukları Organlar	Toplam enfekte organ (%)
Sığır	1800	48 AC 24 KC	72 (%4)
Koyun	624	72 KC 71 AC	143 (%22,9)
Keçi	73	6 AC	6 (%8,2)
Toplam	2497	221	221 (%8,8)

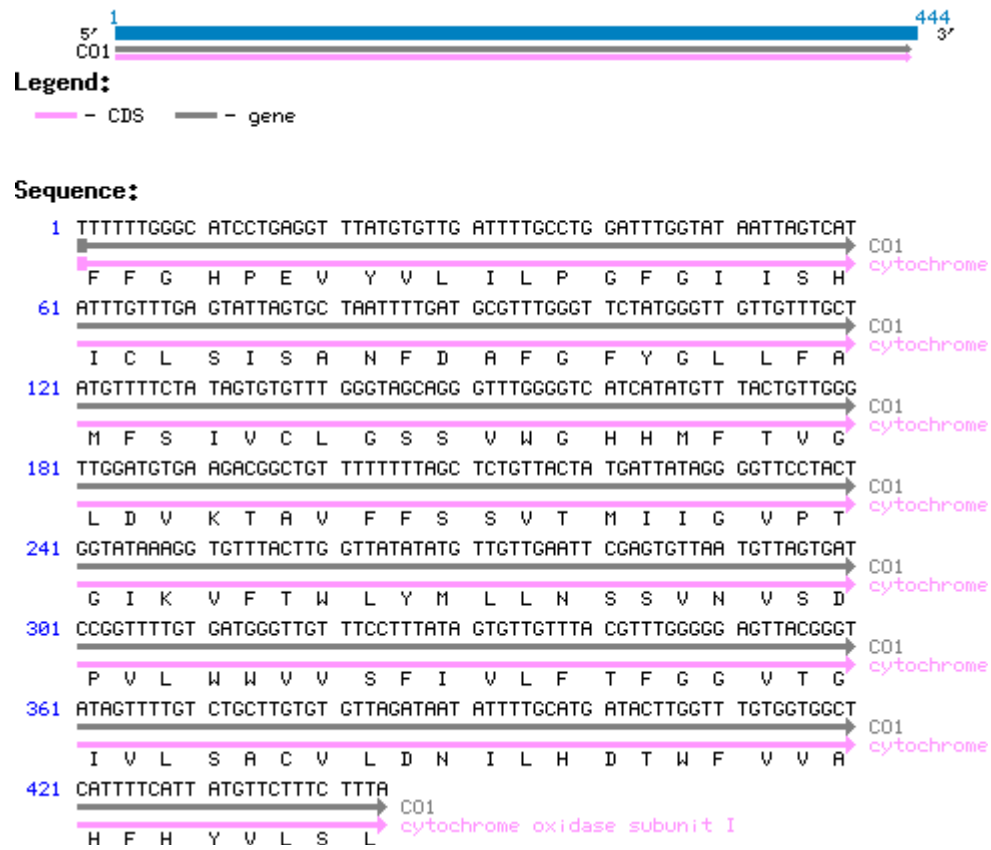
Sekanslama (Dizi analizi)

Sekanslanan 50 örnekten tek çeşit nukleotid dizisi elde edilmiştir. Elde edilen nukleotid dizisi Gen Bankasındaki diğer sekanslarla ve daha önce kayıt altındaki Türkiye örnekleri ile karşılaştırılmıştır.

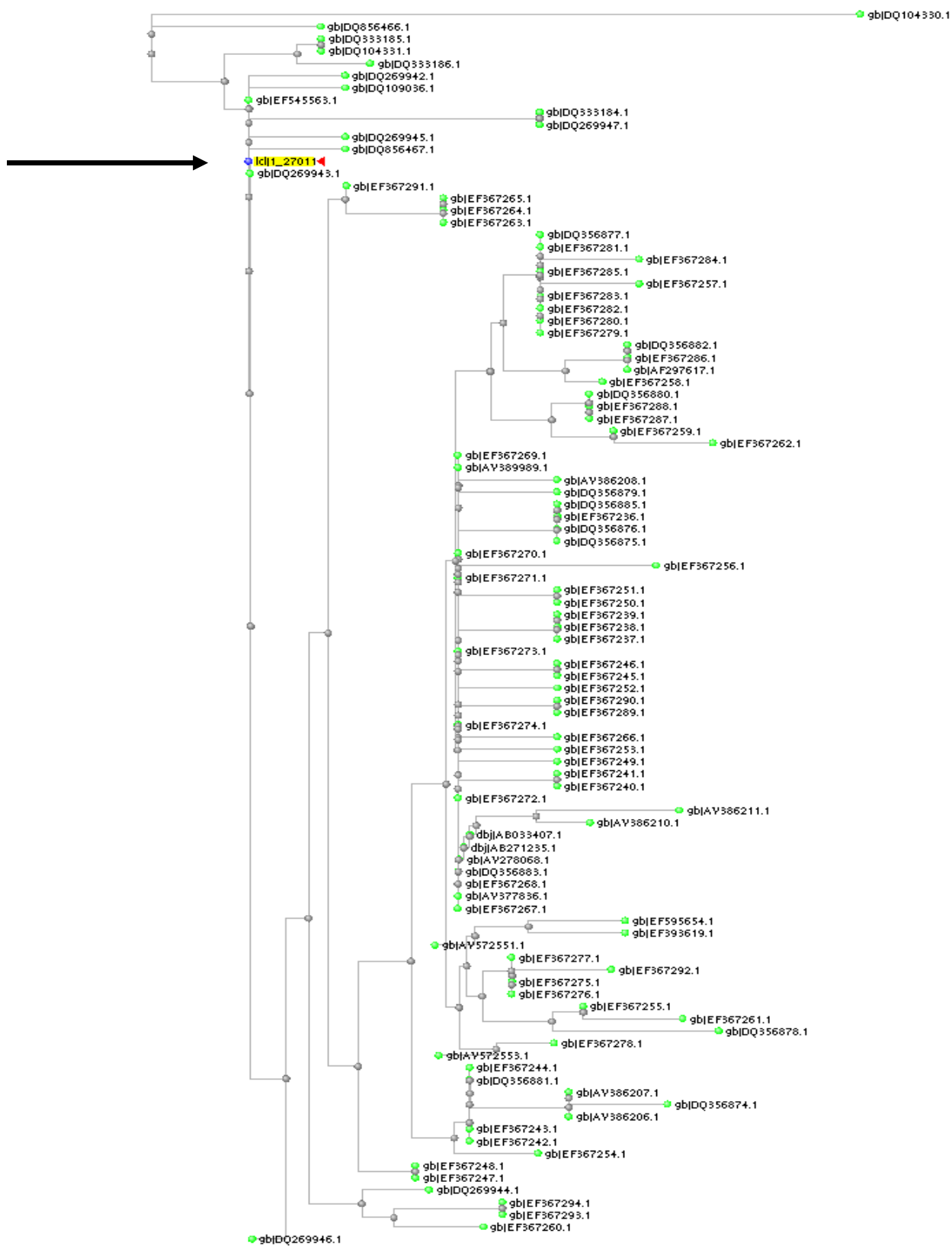
Şekil 1. Bazı örneklerin CO1 geni çoğaltılıp saflaştırıldıktan sonra jelde görüntüsü (*bs: baz sayısı)



Şekil 2. Trakya örneklerinin ortak nükleotid ve amino asit dizilimi.



Şekil 3. Dünyada *Echinococcus granulosus* CO1 gen analizi sonucu kayıt altına alınmış örneklerle Trakyada bulunan örneklerin filogenetik ağaçtaki yeri



4. TARTIŞMA

Ekinokokların alttürlerini belirlemek için yapılan bir çok çalışma (BART ve ark., 2004; CAPUANO ve ark., 2006; OBWALLER ve ark., 2004) mitokondrial genomdan köken alan genlerin nükleotid dizilerindeki değişiklikleri temel almaktadır. Mitokondrial DNA mutasyona yatkındır ve nükleotidlerdeki ilk değişiklikler burada başlamaktadır. Bu nedenle yakın türler arasındaki farklılığı ortaya koymada bu yol daha güvenilir olmaktadır.

Moleküler tekniklerin gelişiminden önce, taksonomik çalışmalar parazitin morfolojik özelliklerine (kancalarının şekli ve büyüklüğü, testislerin sayısı, ovaryumların şekli gibi fenotipik farklılıklar) dayanarak yapılmaktaydı. Bu durum alt türlerin birbirinden ayrılmasında yeterli olmamakta, karışıklıklara yol açmaktaydı. (THOMPSON ve MCMANUS, 2002). Bu nedenle son yirmi yıldır, ayırırda genetik farklılıkların ortaya konması, özellikle *Echinococcus* türlerinde belirli gen tanımlarına başvurulması yoluna gidilmiştir.

Echinococcus granulosus 'un moleküler çalışmalarında en yaygın kullanımı olan genler mitokondrial NDI, COI ve ribozomal ITS1 dir. Bu genlerdeki sekans değişimlerinin belirlenmesi ile alttürler arasındaki farklar ortaya konmaktadır. (BOWLES ve ark., 1993; THOMPSON ve MCMANUS, 2001; ROZENZVIT ve ark., 1999; MWAMBETE ve ark., 2004). Mitokondrial hedef kullanımının bir faydası da Gen Bankasında tüm dünyada bulunan diğer sekanslarla karşılaştırma olanağının bulunmasıdır.

İran'da yapılan bir çalışma (AHMADI ve DALIMI, 2006) koyunlardan toplanan protoskoleks örneklerinin ribosomal DNA ITS bölgesi sekans sonuçlarına dayanarak tüm koyun örneklerinin G1 formunda olduğunu göstermiştir. Bulgaristan'da koyun kökenli Ekinokoklarda ND1 sekans analizi yapan BREYER ve ark (2004), elde ettikleri tüm protoskoleks formlarının G1 olduğunu tespit etmişlerdir. Yunanistan'da yapılan bir çalışmada

(VARCASIA ve ark., 2007) 20 koyundan toplanan örneklere CO1 ne ND1 analizi yapılmıştır. Çalışmada 18 örneğin G1, iki örneğin G3 olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada yapılan analizler sonucunda toplam 50 (35 koyun, 10 sığır ve 5 keçi) örneğin tamamının *E. granulosus sensu stricto* (G1-G3) olduğu belirlenmiştir.

Tüm dünyada epidemiyolojik ve zoonotik öneme sahip alttür yaygın koyun alt türü G1 dir (MCMANUS ve THOMPSON, 2003; ECKERT ve ark., 2002. Bu alttür en fazla arakonak çeşidine sahiptir ve aynı zamanda insan enfeksiyonlarından sorumlu ana alttür olarak kabul edilmektedir (MWAMBETE ve ark., 2004). G1 hem silvatik hem de pastoral döngüye sahiptir. Dolayısı ile yabani arakonaktan evcil son konağa ya da yabani son konaktan evcil arakonağa geçiş mümkündür.

Bazı araştırmacılar (MWAMBETE ve ark., 2004; DINKEL ve ar., 2004) yabani karnivorların parazitin epidemiyolojisinde önemli role sahip olduğunu ve asıl son konakta bulunan olgun *Echinococcus granulosus* 'un alttürünün belirlenmesinin daha önemli olduğunu bildirmektedirler. Çünkü yabani karnivoların hangi genotipleri pastoral sıklusa taşıdıkları bilinmemektedir.

Bu çalışmada tüm örneklerde tespit edilen *E. granulosus sensu stricto* daha önce Vural ve ark (2008) tarafından bildirilen Tekirdağ'da egtr01 (G1) variantı ile aynı bulunmuştur. Trakya'da sekiz yıl sonra aynı variantın bulunması bu yapının korunduğunu göstermektedir. Bu bölgeye Anadolu'dan hayvan sevkiyatı olmaması *E. granulosus*'un bu variantının bu bölgede korunmakta olduğu fikrini uyandırmaktadır.

Echinococcus türleri içindeki kalıtsal çeşitliliğin, konağın enfeksiyona ve ilaçlara olan duyarlılığını etkileyeceği kaydedilmektedir (ECKERT ve ark., 2002). Bunun yanında bazı alt türlerin prepatent periyodunda değişikliklerin olduğu bilinmektedir (ROSENZVIT ve ark., 1999) . Alt tür farklılıklarının, ekinokokkosisin epidemiyolojinde ve kontrol stratejilerinin oluşturulmasında önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada mezbahada kesilen 2 yaş üstü hayvanlardaki echinococcosisin yayılışına bakıldığında sığırlarda görülen düşük oranın bu bölgede sığırların meraya salınmayıp kapalı yetiştiricilik tarzında bir işletme yönetimi olmasından kaynaklandığı söylenilebilir. Ancak 2 yaş üstü koyunlarda tespit edilen %22,9 luk kist hisatik oranı gerçekten yüksek bir oran olup halk sağlığını tehdit edici niteliktedir. Koyunlarda tespit edilen bu yüksek oranın keçilerde saptanamaması (%8,8) keçilerin beslenme biçiminden kaynaklandığı, yerden yüksekçe çalılıklarla beslenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Eğer böyle ise %8,8 lik oran yüksektir.

5. KAYNAKLAR

- AHMADI N., DALİMİ A., Characterization of *Echinococcus granulosus* isolates from human, sheep and camel in Iran, *Infection, Genetics and Evolution*, 6, 85-90, (2006).
- ALTINTAŞ N., Past to present: echinococcosis in Turkey, *Acta Tropica*, 85, 2: 105–112, 2003.
- BART JM., Bardonnnet K., Elfegoun Mcb., Dumon H., Dia L., Vuitton Da., Piarroux R., *Echinococcus granulosus* strain typing in North Africa: comparison of eight nuclear and mitochondrial DNA fragments, *Parasitology*, 128, 229-34, (2004).
- BOWLES J., Blair D., Mc Manus DP., Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing, *Molecular and Biochemical Parasitol*, 54, 165-74, (1992).
- BREYER I., Georgieva D., Kurdova R., Gotttein B., *Echinococcus granulosus* strain typing in Bulgaria: the G1 genotype is predominant in intermediate and definitive wild hosts, *Parasitol. Res*, 93, 127-30, (2004).
- CAPUANO F., Rinaldi L., Maurelli MP., Perugini AG., Veneziano V., Garippa G., Genchi C., Musella V., Cringoli G., Cystic echinococcosis in water buffaloes: epidemiological survey and molecular evidence of ovine (G1) and buffalo (G3) strains, *Veterinary Parasitology*, 137, 262-8, (2006).
- DE LA RUE ML., Dinkel, A., Mackenstedt U., Roming T., New data on *Echinococcus spp.* in southern Brazil, *Rev Inst Med Trop S Paulo.*, 48, 103-4, (2006).
- DINKEL A., Njoroge Em., Zimmerman A., Walz M., Zeyhle E., Elmahdi Ie., Mackenstedt U., Roming T. 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 Parasitol.*, 34, 645-53, (2004).
- DUNN,M.A.: Veterinary Helminthology. 2nd ed. William Heinemann Medical Books Ltd. London, 1978.
- ECKERT J., Gemmell MA., Meslin FX., Pawłowski DZS., Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern, World Organisation for Animal Health (Office International des Epizooties), Reprinted: January 2002
- GASSER RB. What is in that band? *Int J Parasitol.*, 28, 989-96, (1998).
- KAMANETZKY L., Gutierrez AM., Canova SG., Haag KI., Guarnera EA., Parra A., Garcia GE., Rosenzvit MC., Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina, *Infection, Genetics and Evolution.*, 2, 129-136, (2002).

KEDRA AH., Swiderski, Z., Tkach VV., Dubinsky P., Pawlowski Z., Stefaniak J., Pawlovski J., Genetic analysis of *Echinococcus granulosus* from humans and pigs in Poland, Slovakia and Ukraine, A multicenter study, *Acta Parasitol.*, 44, 248-54, (1999).

LAHMAR S., Debbek H., Zhang LH., McManus DP., Souissi A., Chell S., Torgerson, PR., Transmission dynamics of *Echinococcus granulosus* sheep-gog strain (G1 genotype) in camels in Tunisia, *Veterinary Parasitology.*, 121, 151-6, (2004).

LAVIKAINEN A., Lehtinen MJ., Meri T., Hirvela-Koski V., Meri, S., Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol.*, 127, 207-15, (2003).

MARAVILLA P., Thompson RCA., Palacios-Ruiz JA., Estcourt A., Ramirez-Solis E., Mondragon-De-La-Pena C., Moreno-Moller M., Cardenas-Mejia A., Mata-Miranda P., Aquirre-Alcantara MT., Bonilla-Rodriguez C., Flisser A., *Echinococcus granulosus* cattle strain identification in an autochthonous case of cystic echinococcosis in central Mexico, *Acta Tropica.*, 92, 231-6, (2004).

McMANUSD.P., Bowles J., Molecular genetic approaches to parasite identification their value in diagnostic parasitology and systematics, *Int J Parasitol.*, 26, 687-704, (1996)

McMANUS DP., Thompson RCA., Molecular epidemiology of cystic echinococcosis, *Parasitology.*, 127, 37-51, (2003).

MWAMBETE KD., PONCE-GORDO F., CUESTA-BANDERA C., Genetic identification and host range of the Spanish strains of *Echinococcus granulosus*, *Acta Tropica.*, 91, 87-93, (2004).

NAKAO, M., MCMANUS, D., SCHANTZ, P., CRAIG, P. AND ITO, A. (2007). A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* 134, 713–722.

NAKAO, M., LI, T., HAN, X., MA, X., XIAO, N., QIU, J., WANG, H., YANAGIDA, T., MAMUTI, W. AND WEN, H. (2010). Genetic polymorphisms of *Echinococcus* tapeworms in China as determined by mitochondrial and nuclear DNA sequences. *International Journal for Parasitology* 40, 379–385.

NAKAO, M., YANAGIDA, T., KONYAEV, S., LAVIKAINEN, A., ODNOKURTSEV, V. A., ZAIKOV, V. A. AND ITO, A. (2013). Mitochondrial phylogeny of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae) with emphasis on relationships among *Echinococcus canadensis* genotypes. *Parasitology* 140, 1625–1636.

NAKAO, M., LAVIKAINEN, A. AND HOBERG, E. (2015). Is *Echinococcus intermedius* a valid species? *Trends in Parasitology* 31, 342–343.

OBWALLER A., Schneider R., Walochnik

- J., Gollackner B., Deutz A., Janitschke K., Aspöck., Auer H., *Echinococcus granulosus* strain differentiation based on sequence heterogeneity in mitochondrial genes of cytochrome c oxidase-1 and NADH dehydrogenase-1, *Parasitol.*, 128, 569-75, (2004).
- ROSENZVIT MC., Canova S.G., Kamenetzky L., Guarnera EA., *Echinococcus granulosus*: intraspecific genetic variation assessed by a DNA repetitive element. *Parasitol.*, 123, 381-8, (2001).
- ROSENZVIT MC., Zhang LH., Kamenetzky L., Canova SG., Guarnera E.A., McManus DP., Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina, *Parasitol.*, 118, 523-30, (1999).
- SAMBROOK J., Russel DW., Molecular Cloning, A laboratory manual, Cold spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001
- SCOTT JC., Stefaniak J., Pawlowski ZS., McManus DP., Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*, *Parasitol.*, 114, 37-43, (1997).
- SOULSBY, E.J.L.: Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. 7th ed., Bailliere, Tindal, London, 1986.
- THOMPSON RCA., McManus DP., Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends in Parasitology*, 18, 452-7, (2002).
- TINAR R., Echinococcosis, ed: ALTINTAŞ N., TINAR R., ÇOKER A., Hidatidoloji Derneği, Yayın No: 1, Ege Üniversitesi Matbaası, İzmir, (2004). Pp: 1-12.
- ÜTÜK A., Şimşek S., Koroğlu E., *Echinococcus granulosus*' un koyun suşunun (G1) RAPD-PCR ve DNA analizi ile tanısı, 3. Ulusal Hidatidoloji Kongresi, Samsun, Türkiye, (2006) pp:60.
- VARCASIA A, CANU S, Kogkos A, Pipa AP, Scala A, Garippa G, Seimenis A., Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in sheep and goats of Peloponnesus, Greece. *Parasitol Res.*, [Epub ahead of print], 7 May, (2007);
- ŞİMSEK, S., ROİNİOTİ, E. AND EROKSUZ, H. (2015). First report of *Echinococcus equinus* in a donkey in Turkey. *Korean Journal of Parasitology* 53, 731–735.
- ŞİMSEK S, BALKAYA I, CİFTÇİ AT, UTUK AE. Molecular discrimination of sheep and cattle isolates of *Echinococcus granulosus* by SSCP and conventional PCR in Turkey. *Vet Parasitol.* 2011 10;178(3-4):367-9.
- ŞİMSEK S, CEVİK A. First detection and molecular characterization of *Echinococcus equinus* in a mule in Turkey. *Acta Parasitologica.* 2014;59:773–777.

XIAO N., Qiu J., Nakao M., Li T., Yang W., Chen X., Schantz PM., Craig PS., Ito A., *Echinococcus shiquicus*, a new species from the Qinghai-Tibet plateau region of China: discovery and epidemiological implications, *Parasitology international*, 55, 233-6, (2006).

YOLASIĞMAZ A., Güneş K., Turcekova L., Snabel V., Dubinsky P., Altıntaş N., Moleküler teknikler ve izoenzim çalışmalarıyla ülkemizdeki genotiplerin araştırılması, 3. Ulusal Hidatidoloji Kongresi, Samsun, Türkiye, (2006) pp:46.

VURAL G AND ET AL.

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.*, 59, 171-4, (1998).

ZHANG L., Gasser RB., Zhu X., McManus DP., Screening for different genotypes of *Echinococcus granulosus* within China and Argentina by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis, *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.*, 93, 329-34, (1999).

ZHANG L., Joshi DD., McManus DP., Three genotypes of *Echinococcus granulosus* identified in Nepal using mitokondrial DNA markers. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.*, 94, 258-60 , (2000).