

Kırıkkale Bölgesinde Koyun Kökenli *Echinococcus granulosus* İzolatlarının Moleküler Karakteri ^[1]

F. Azize BUDAK YILDIRAN * Kader YILDIZ ** ✍
Şükran ÇAKIR * Aycan N. GAZYAĞCI **

[1] Bu çalışma Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2006/22)

* Kırıkkale Üniversitesi, Fen - Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 71450 Kırıkkale - Türkiye

** Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, 71450 Kırıkkale - Türkiye

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2009-638

Özet

Bu çalışmada, koyunlardan elde edilen *Echinococcus granulosus*'ün moleküler karakterizasyonunu belirlemek amaçlandı. Bunun için enfekte koyunların değişik organlarından elde edilen 24 adet kist hidatit'e ait germinal membran ve protoskoleks örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı ve daha sonra DNA örnekleri 16 primer kullanılarak RAPD-PCR metodu ile tarandı. *Echinococcus granulosus* G1 suşu referans materyali olarak kullanıldı. Kullanılan 16 primerden 4'ü (AP2, AP4, OPB12 ve G05) koyun izolatları ve referans G1 suşunun her ikisinde de tipik RAPD band kalıpları verdi. AP2 primeri ile oluşan 250 baz çiftlik tek bant koyun izolatları ve G1 suşunun her ikisinde de ortak. Sonuçlar bu çalışmada örneklenen koyun izolatlarının hepsinin aynı *Echinococcus granulosus* suşu olacağına işaret etmektedir.

Anahtar sözcükler: *Echinococcus granulosus*, Hidatit kist, Polimorfizm, RAPD-PCR

The Molecular Characterization of *Echinococcus granulosus* Isolates from Sheep in Kırıkkale Region

Summary

In present study, it was aimed to determine molecular characterization of *Echinococcus granulosus* obtained from sheep. For this purpose, DNA isolation was done from germinal membrans and protoscolices of 24 hydatid cyst samples obtained from different organs of infected sheep and then DNA samples were scanned by RAPD-PCR using 16 primers. *Echinococcus granulosus* G1 strain was used as reference material. Only 4 of these 16 primers (AP2, AP4, OPB12 and G05) gave the typical RAPD band patterns in both sheep isolates and the reference G1 strain. The single band of 250 bp occurred by AP2 primer was common in both sheep isolates and G1 strain. According to result, AP2 primer can be successfully used for separation of G1 strain in different isolates. The results indicated that all sheep isolates sampled in this study can be assumed in the same *Echinococcus granulosus* strain.

Keywords: *Echinococcus granulosus*, Hydatid cyst, Polymorphism, RAPD-PCR

GİRİŞ

Echinococcus granulosus köpeklerin ince bağırsaklarında yaşayan zoonoz bir sestottur. Bu parazitin larva formu olan hidatit kist koyun, keçi, sığır ve insanın da arasında bulunduğu pek çok canlıda bulunmakta ve şekillendirdiği hastalığa kistik ekinokokkozis adı verilmektedir ^{1,2}. WHO, sosyo-ekonomik öneminden dolayı bu hastalığı tüm dünyayı ilgilendiren zoonoz bir hastalık olarak tanımlamaktadır ¹.

Akdeniz ülkeleri ile Ortadoğu'da oldukça yaygın olan

kistik ekinokokkozis ülkemizde koyun, keçi ve sığırlarda değişen oranlarda yaygınlık göstermektedir ³⁻¹⁰. Erişkin parazitin köpeklerde yaygınlığı ise %0.32-40.5 oranındadır ¹¹⁻¹⁴. Türkiye'de kistik ekinokokkozise her 100.000 insanda 0.87-6.6 oranında rastlanmaktadır ¹⁵.

Hidatit kistlerin fertilitesi hastalığın epidemiyolojisi-ndeki önemli faktörlerden biridir. Fertilitate, arakonağın türüne, parazitin genotipine ve coğrafik farklılıklara bağlı değişmektedir. *Echinococcus granulosus*'ün koyun suşu

✍ İletişim (Correspondence)

☎ +90 318 3574242/3155

✉ kaderyildiz@hotmail.com

sığır ve domuzlarda genellikle steril, koyunlarda ise neredeyse tamamı fertil kistler oluşturmaktadır ¹⁶.

Echinococcus granulosus'un pek çok intraspesifik suşa sahip olduğu belirlenmiştir ^{1,17}. Bu suşlar arasında yaşam çemberi konak özgüllüğü, gelişim hızı, patojenite, antijenite ve kemoterapötiklere duyarlılık ile bulaşma dinamikleri arasında farklılık bulunmaktadır. Parazitin epidemiyolojisinin anlaşılmasında ve etkili biçimde mücadelesinde suşun belirlenmesi önemli olmaktadır ^{1,17}.

Echinococcus suşlarının belirlenmesine yönelik ilk çalışmalarda arakonak tercihindeki farklılıklar ve morfoloji esas alınmıştır ^{18,19}. Daha sonraları parazitin *in vivo* ve *in vitro* gelişimi, serotipi, kimyasal yapısı, metabolizması, enzim elektroforez ve DNA analizi suş belirlenmesinde kullanılmıştır ^{19,20}. Bugüne dek nükleer ve mitokondriyal genom çalışmaları sonucunda *Echinococcus granulosus*'un on genotipi saptanmıştır (G1-10) ^{1,17}. Dünya üzerinde bazı ülkelerde yapılan çalışmalarda bu genotiplerden en yaygın olan G1 genotipi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca insanı enfekte eden genotipin de genellikle G1 olduğu, diğer genotiplerle insanın nadiren enfekte olduğu hatta bazı genotiplerle hiç insan enfeksiyonu saptanmadığı bildirilmiştir ^{1,16,21}.

Parazitin tür ve suş identifikasyonu analizlerinde DNA temelli yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri olan RAPD-PCR; genomik DNA'nın isteğe bağlı olarak seçilmiş nükleotid dizisinin tek bir oligonükleotid primeri kullanılarak amplifiye edilmesine dayanan bir polimorfizm inceleme yöntemidir. Tekniğin önemli özelliklerinde biri uygun primerlerin sentezi için dizi bilgisinin önceden bilinmesinin gerekmemesidir. Bu teknik konağa ait kontaminasyon olsa bile *Echinococcus* tür ve suşlarının ayırt edilmesinde etkin şekilde kullanılabilir ¹. RAPD-PCR'da genellikle 9-10 bazlık kısa primerler tercih edilmektedir. Suşlar arasında primerlerin bağlanma yerlerinde gerçekleşmiş olan mutasyonlar band polimorfizminin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Amplifikasyon sonucu jelde gözlenen her bir izolata ait bantlar karşılaştırılarak aynı bant profili gösteren izolatlar epidemiyolojik olarak ilişkili olarak yorumlanmaktadır ²²⁻²⁵.

Ülkemizde önemli ekonomik kayıp oluşturan kistik ekinokokkozis ile ilgili hazırlanan epidemiyolojik haritalarda Türkiye endemik bölge olarak gösterilmektedir ¹. Bu çalışmada koyunlardaki kist hidatitlerden elde edilen germinal membranlardan DNA izolasyonu ve amplifikasyonu yapılarak kistik ekinokokkozis oluşturan *Echinococcus granulosus* izolatlarının moleküler karakterinin RAPD-PCR tekniği kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

DNA'nın Ekstraksiyon Aşamaları

Koyunlardan hidatit materyalin toplanması amacıyla Kırıkkale Mezbahasına gidilmiş ve kist hidatit bulunan organlar Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne soğuk zincirde getirilmiştir. Toplam 24 kist hidatit toplanmıştır. Laboratuvarında hidatit kistlerin germinal membranları ve protoskoleksleri ayrılarak steril kaplara alınmıştır. Kist materyalleri birbiri ile karıştırılmamış ve her bir örnek bir izolat olarak değerlendirilmiştir. Germinal membranlar üç kez PBS ile yıkandıktan sonra DNA izolasyonu Dneasy® Blood&Tissue (Qiagen) kiti ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri daha sonra -20°C'de saklanmıştır.

Primer Seçimi

Bu çalışmada kullanılan primerlerin (sentetik oligonükleotitlerin) seçiminde guanin ve sitozin bazlarının toplamının, toplam baz sayısına oranının %50 ile %80 arasında olması, primerlerin 10 baz çifti uzunluğunda olması ve primerlerin birbirinin tamamlayıcısı olmaması gibi bazı hususlara dikkat edilmiştir. Operon Technology®'den 16 adet primer seçilmiş olup bu primerlerin baz dizileri ve guanin-sitozin oranları *Tablo 1*'de verilmiştir. Elde edilen sonuçların güvenilirliği bakımından daha önce sekanslanarak G1 suşu olduğu doğrulanmış örnek denemelerde referans olarak kullanılmıştır ²¹.

PCR Koşullarının Optimizasyonu

Optimizasyon sonucunda PCR karışımında 0.4 µM olacak şekilde: Taq polimeraz (500 u/µl stok çözeltiden) 0.2 u/µl, 10X reaksiyon çözeltisi ticari stoktan (10 mM Tris, %0.1 Triton X-100, sığır serum albümini), MgCl₂ çözeltisi (25 mM stok) 2.5-3 mM, dNTP (10 mM stok) 1.25 mM, primerler 100 ng/µl yoğunluğunda steril distile su ile sulandırılarak kullanılmıştır. Hazırlanan karışım 0.2 ml'lik ependorf tüplerine eşit olarak dağıtıldıktan sonra tüplere her bireye ait genomik DNA örnekleri konulmuş ve tüpler PCR ısı düzenleme cihazına (Thermocycler, Thermo Hybaid®) yerleştirilmiştir. PCR cihazına yerleştirilen DNA ipliklerin birbirinden ayrılması (denatürasyon) için 94°C, primerlerin DNA zincirinde uygun bölgelere bağlanması (annealing) için 35°C, zincirin uzaması (elongation) için 72°C sıcaklık uygulanmıştır (bir döngü). Toplam 35 döngü uygulandıktan sonra sentez işleminin tamamlanabilmesi için 72°C'de 10 dak bekletilmiştir. Bu çalışmada RAPD-PCR işlemi her örnek için en az 2 kez tekrarlanmıştır.

Agaroz Jel Elektroforezi

Elektrolit çözeltisi olarak TBE (Tris-Borat-EDTA) kul-

Tablo 1. Primerlerin baz dizileri ve guanin-sitosin (G-C) oranı**Table 1.** Primer base compositions and guanine-cytosine (G-C) ratio

Primer	Primer Dizileri (5'---3')	G-C (%)
AP1	GTGACGTAGG	60
AP2	TGCCGAGCTG	70
AP3	GTGGTGGTGG	70
AP4	TCACGCTGCA	60
OPB4	GGACTGGAGT	60
OPB7	GGTGACGCAG	70
OPB12	CCTTGACGCA	60
OBP13	TCCCCCGCT	70
OPG05	CTGAGACGGA	70
OPG16	AGCGTCCTCC	60
OPL12	GGCGGTACTION	70
OPM02	ACAACGCCTC	70
OPM04	GGCGGTTGTC	60
OPM12	GGGACGTTGG	70
OPN18	GGTGAGGTCA	70
OPO13	GTCAGAGTCC	60

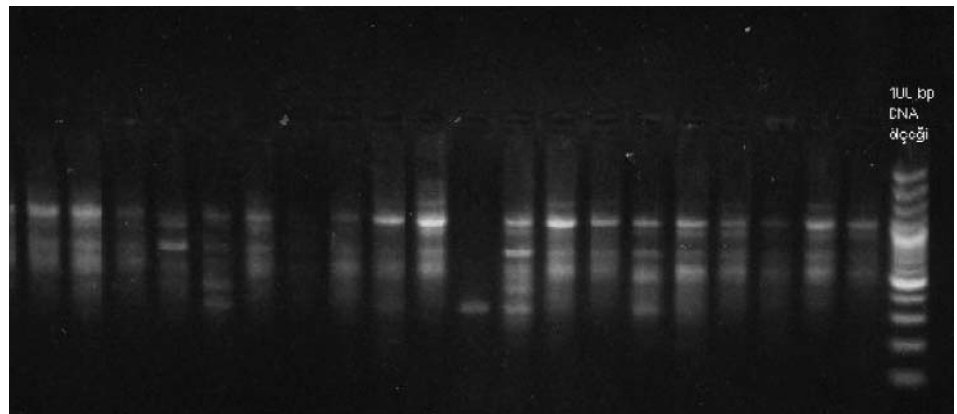
lanılmıştır. Konsantre olarak hazırlanan (54 g Tris, 27.5 g Borik asit, 20 ml 0.5 M EDTA) çözelti 10 katı distile su ile sulandırılmıştır. Her uygulama için 150 ml 10X TBE kullanılmıştır. Hazırlanan jel 50-60°C sıcaklığa kadar soğutulduktan sonra tarafları takılmış olan jel tepsinine dökülmüş, katılaştıktan sonra tankın içine 1X TBE çözeltisi eklenmiştir. PCR ürünleri kuyucuklara yüklenmeden önce yükleme boyası ile boyanmıştır. Örnekler 5 Volt/cm'de 2 saat yürütüldü.

RAPD Bantlarının Gözlenmesi ve Verilerin Kaydedilmesi

Çalışmada şekillenen RAPD bantları UV görüntüleme sehпасı üzerinde gözlenmiştir. Bu bantların uzunluklarını tespit etmek için 100 bç (MBI Fermentas® SM0321) ve 1 kb (MBI Fermentas® SM0311) DNA ölçeği kullanılmıştır. Gözlenen RAPD bantları Polaroid® (DS-34) fotoğraf makinesi ile yeşil lens kullanılarak siyah-beyaz olarak görüntülenmiştir.

Şekil 1. Koyun kökenli *Echinococcus granulosus* izolatlarının AP3 primeri ile çoğaltılmış agaroz jel elektroforez (%1,7'lik) RAPD bantları (sağda 100 bç DNA ölçeği)

Fig 1. Agarose gel electrophoresis (1.7%) of RAPD-PCR products using AP3 primer in *E.granulosus* isolates from sheep (right line is 100 bp DNA marker)



Verilerin İstatistiksel Analizi

Elde edilen veriler POPGENE Software (versiyon 1.31 Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis) istatistik paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Mevcut olan bantlar için "1" olarak, mevcut olmayan bantlar için "0" yazılarak veri tablosu oluşturulmuştur.

BULGULAR

Bütün örnekler daha önce belirlenmiş olan 16 primer ile taranmış, kullanılan primerlerin 7'sinin tüm izolatlarda RAPD bantları şekillendirdiği gözlenmiştir. **Tablo 2'**de bu primerlerin adları ve gözlenen RAPD bantlarının yaklaşık olarak büyüklükleri verilmiştir. Kullanılan primerlere ait bantlar incelendiğinde tipik RAPD amplifikasyonunda 1-6 RAPD bandının şekillendiği görüldü. Koyun orijinli izolatların tümünde aynı bantlar görülmüştür. Bu çalışmada primerlerin yükseltgenmesi sonucu elde edilen bant yoğunluklarında farklılıklar gözlenmiştir. AP1 ve OPG05 primerlerinde 600-1100 ve 200-900 bç'lik bantlar gözlenirken AP3 (**Şekil 1**) ve OPG05 primerlerinde 200-1250 bç arasında değişen bantlar izlenmiştir. AP2 primerinde ise 250 bç'lik tek bant gözlenmiştir (**Şekil 2**). Kullanılan primerlerden 4'ü için (AP2, AP4, OPB12 ve OPG05) tüm izolatlarda ve referans olarak kullanılan G1 örneğinde RAPD bantları gözlenmiştir.

Tablo 2. Tüm izolatlarda 7 primer için gözlenen RAPD bantlarının büyüklükleri (bç)**Table 2.** Base pair size of observed RAPD bands for 7 primers in all isolates (bp)

Primer	Şekillenen bantların yaklaşık büyüklükleri (bç)
AP1	600-1100
AP2	250
AP3	300-1200
AP4	350-800
OPB12	350-500
OPG05	200-900
OPG16	200-1250

Şekil 2. Koyun izolatlarının AP2 primeri ile çoğaltılmış agaroz jel elektroforez (%1.7'lik) RAPD bantları, (sağdan 1. ve 9.hat 100 bç DNA ölçüğü)

Fig 2. Agarose gel electrophoresis (1.7%) of RAPD-PCR products using AP2 primer in *Echinococcus granulosus* isolates from sheep (right 1st and 9 th lines are 100 bp DNA marker)



Tablo 3. Koyun izolatlarında genetik çeşitliliğin istatistik analiz sonuçları

Tablo 3. The statistical results of genetic diversity in sheep samples

Örnek	n	Na ¹	Ne ²	H ³	I ⁴	# p. lokus ⁵	% p. lokus ⁵
Koyun izolatu	24	1.61±0.49	1.30±0.32	1.19±0.18	0.29±0.27	22	61.11

¹ Na = Gözlenen allel sayısı
² Ne = Etkili allel sayısı
³ h = Gen çeşitliliği
⁴ I = Shannon'un bilgi içeriği
⁵ # = Polimorfik lokus

Değerlendirilen 7 RAPD primeri için 36 allelden 32'si polimorfik lokus olarak değerlendirilmiştir. Polimorfik lokusların yüzdesi taranan örneklerde yüzde 61.11 olarak gözlenmiştir. Bütün alleler aynı sıklıkta olduğu zaman gözlenen allel sayısı (Na) ile etkili allel sayısı (Ne) birbirine eşittir. Bu durum dışında ise zararlı genlerin bulunması durumunda, Ne her zaman için Na'dan daha küçüktür. Bu çalışmada da Ne sayısı her zaman için daha küçük çıkmıştır. Gözlenen allel sayısı 1.0-2.0 arasında iken, etkili allel sayısı 1.0000-1.8824 arasında değişmektedir. İzolatlarda genetik çeşitlilik istatistiğinin özeti **Tablo 3**'te verilmiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Echinococcus, Taeniidae ailesine bağlı *Echinococcus* cinsine ait sestodların erişkini ve larvasının oluşturduğu zoonoz karakterli dünya üzerinde yaygın bir hastalıktır^{1,2,17}. Türkiye, kist hidatit ile ilgili oluşturulan epidemiyolojik haritalarda endemik bölge olarak gösterilmektedir¹. Pek çok ülkede yapılan moleküler çalışmalarda *Echinococcus granulosus*'un farklı genotipleri bildirilmiştir. Avrupa'da *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1), *Echinococcus ortleppi* (G5), *Echinococcus equinus* (G4) domuz suşu (G7) ve geyik suşunun (G10)

bulunduğu bilinmektedir²⁶. *Echinococcus granulosus* suş ayırımında kullanılan tekniklerden biri olan RAPD-PCR hızlı ve basit bir test olup analiz için az miktarda DNA'ya ihtiyaç duyulmaktadır²⁷. Aynı zamanda primer seçimi de tekniğin gücünü belirlemektedir²⁶. Hidatit kist izolatlarında suş ayırımı amacıyla bu yöntemin kullanıldığı pek çok çalışma mevcuttur^{24,25,27-31}.

Mısır'da üç farklı konağa ait *Echinococcus granulosus* izolatları RAPD-PCR tekniği ile incelendiğinde develerin insanlara hidatidozunun geçişinde en önemli konak olduğu belirlenmiş, aynı tip konaklardaki izolatlar arasında bazı varyasyonların görüldüğü bildirilmiştir²⁷. *Echinococcus granulosus*'un sığır ve manda suşlarının ayırımı amacıyla RAPD-PCR metodunun kullandığı diğer bir çalışmada kuvvetli DNA polimerizasyonu gözlenmiştir. Sığır ve mandaya ait izolatlarda AP1 primerinin 260-1100 bç, AP2, AP3 ve AP4 primerlerinin ise 340-2200 bç büyüklüğünde bantlar şekillendirdiği belirlenmiş olup bu yöntemin sığır ve manda suşunun tanımlanmasında kullanılabileceği belirtilmiştir³⁰. Bu çalışmada ise koyun izolatlarında AP2 primerinde 250 bç'lik tek bant gözlenirken, AP1 primerinde 600-1100 bç'lik bantlar gözlenmiştir. AP3 ve AP4 primerlerinde ise 300-1200 bç arasında değişen bantlar izlenmiştir. Sonuçların literatür bilgi³⁰ ile paralellik gösterdiği saptanmıştır.

Köpekten alınan erişkin parazit ile domuzdan alınan kist hidatit izolatlarının OPB7 ve OPB12 primerleri kullanılarak RAPD-PCR ile analizi sonucunda her iki primerde de farklı bant profili rapor edilmiştir²⁷. OPB7 primerinde şekillenen bantların izolatların bazılarında 300-1600 bç'lik, bazılarında ise 500-1100 bç'lik alanda şekillendiği bildirilmiştir²⁷. Bu çalışmada ise OPB7 primeri ile 24 koyun izolatının tamamında anlamlı sonuç alınmamıştır.

Siğir, manda ve koyun orijinli *Echinococcus granulosus* izolatlarının OPI-01 ve OPI-15 primerleri kullanılarak RAPD-PCR ile analizi sonucunda siğir ve koyun suşlarındaki bant profilinin manda izolatında görülmemiş olması mandada birden çok genotipin olduğunun göstergesi kabul edilmiştir³³. Bu çalışmada ise örneklenen 24 koyun izolatında gözlenen bantların aynı profilde olduğu belirlenmiş ve bu bantların referans olarak kullanılan G1 suşunda da görülmesi sebebiyle çalışmadaki koyun izolatlarının G1 suşu olduğu düşünülmüştür.

RAPD-PCR analizinde şekillenen band profilindeki polimorfizm nedeniyle parazit suşunun tam olarak tanımlanması güç olmaktadır. Polimorfik DNA yapıları dominant alleller olarak kabul edilir. Bazı durumlarda çalışmada kullanılan primer polimorfizm göstermeden suş ayırımı yapmaktadır²⁹. Bu çalışmada kullanılan AP2 primerinde koyunlardan elde edilen tüm izolatlarda ve G1 suşunda 250 bç'lik tek bant gözlenmiş olup alınan sonuçlar AP2 primerinin G1 suşunun ayırımında kullanılabilirliğini göstermektedir.

Echinococcus granulosus'un suş ayırımında kullanılan yöntemlerden birisi morfolojik analizdir. Bu analizde protoskolekste bulunan rostellar çengellerin sayısı ile uzunluk ölçüleri esas alınmaktadır. Ayrıca farklı son konaklara geçse bile protoskolekslerin çengel özelliklerinin değişmediği belirlenmiştir¹⁸. Siğir ve koyuna ait kist hidatit izolatlarının morfometrik analizi sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizi siğir örneklerinin koyun grubu içerisinde yer aldığını göstermiş, araştırılan tüm örneklerde görülen varyantın "koyun suşu" olarak işaretlenebileceği ileri sürülmüştür³². Ancak çevresel faktörler tarafından oluşturulabilecek değişiklikler *Echinococcus granulosus* tür ya da alt türlerinin ayırımında morfolojinin tek başına yeterli bir teknik olma özelliğini azaltmış olup morfolojinin moleküler metotlardan elde edilen verilerle uyumlu olması önem kazanmıştır¹⁸. Bu çalışmada RAPD-PCR ile koyunlardan elde edilen sonuçlar daha önce yapılmış olan morfometrik analizi ile elde edilen verileri destekler niteliktedir.

Hidatit kistlerin fertilitelerini belirleyen faktörler arasında suş farklılığı gelmektedir¹. *Echinococcus granulosus* koyun suşunun siğir ve domuzda genelde steril kist oluşturduğu buna karşın koyunda şekillendirdiği fertil

kist oranının ise %90'ı bulunduğu rapor edilmiştir¹⁶. Koyunlarda hidatit kistlerin %61.2-93'ünün^{5,7,33}, sığırlardakilerin ise %6.6-49.57'sinin protoskoleks taşıdığı bildirilmiştir^{8,33}. Bu durum koyun suşunu akla getirmektedir. Bu çalışmada RAPD-PCR ile elde edilen bulgular da bunu doğrulamaktadır.

Bu çalışmada AP2, AP4, OPB12 ve OPG05 primerleri incelenen tüm koyun izolatlarında hem de referans olarak kullanılan G1 suşunda RAPD bantları şekillendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar bu çalışmada örneklenen koyun izolatlarının aynı *Echinococcus granulosus* suşuna ait olduğunun göstergesidir.

TEŞEKKÜRLER

Çalışmada referans olarak kullanılan *Echinococcus granulosus* G1 suşunun temininde yardımcı olan Dr. A. Erdem Ütük'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Eckert J, Gemmel MA, Meslin FX, Pawlowski ZS: WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern. 2001.
2. McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB: Echinococcosis. *Lancet*, 362, 1295-1304, 2003.
3. Gıcık Y, Arslan MÖ, Kara M, Köse M: Kars ilinde kesilen siğir ve koyunlarda kistik ekinokokkozisin yaygınlığı. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 28, 136-139, 2004.
4. Oge H, Kalınbacak F, Gıcık Y, Yıldız K: Ankara yöresinde kesilen koyun, keçi ve sığırlarda bazı metasestodların (Hidatik kist, *Cysticercus tenuicollis*, *Cysticercus bovis*) yayılışı. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 45, 123-130, 1998.
5. Şenlik B: Bursa yöresi koyunlarında hidatidoz'un yaygınlığı ve yaş, ırk, cinsiyetle ilişkisi. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 24, 304-308, 2000.
6. Umur S: Prevalence and economic importance of cystic echinococcosis in slaughtered ruminants in Burdur, Turkey. *J Med Vet B*, 50, 247-252, 2003.
7. Yıldız K, Gurcan S: Prevalence of hydatidosis and fertility of hydatid cysts in sheep in Kırıkkale, Turkey. *Acta Vet Hung*, 51, 181-187, 2003.
8. Yıldız K, Tunçer Ç: Kırıkkale'de sığırlarda kist hidatik'in yayılışı. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 29, 247-250, 2005.
9. Arslan MÖ, Umur Ş: Erzurum mezbahalarında kesilen koyun ve sığırlarda hidatidozun yayılışı ve ekonomik önemi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 3, 167-171, 1997.
10. Yılmaz H, Taş Cengiz Z, Çiçek M: The problem of cystic echinococcosis in Van Province. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15, 607-610, 2009.
11. Ataş AD, Özçelik S, Saygı G: Sivas sokak köpeklerinde görülen helmint türleri, bunların yayılışı ve halk sağlığı yönünden önemi. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 21, 305-309, 1997.
12. Doğanay A: Ankara köpeklerinde görülen helmint türleri, bunların yayılışı ve halk sağlığı yönünden önemi. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 30, 550-561, 1983.

- 13. Pamukcu AM, Ertürk E:** 1933-1960 yılları arasında Ankara ve yöresi köpeklerde görülen hastalıklara toplu bir bakış. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 8, 323-346, 1961.
- 14. Umur Ş, Arslan MÖ:** Kars yöresi sokak köpeklerinde görülen helmint türlerinin yayılışı. *Türkiye Parazit Derg*, 22, 188-193, 1998.
- 15. Altıntaş N:** Past to present: Echinococcosis in Turkey. *Acta Trop*, 85, 105-112, 2003.
- 16. Kamenetzky L, Gutierrez AM, Canova SG, Haag KL, Guarnera EA, Parra A, Garcia GE, Rosenzvit MC:** Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infect Gen Evol*, 2, 129-136, 2002.
- 17. Altıntaş N, Tınar R, Çoker A:** Echinococcosis. Hidatidoloji Derneği Yayın No.1, Ege Üniv Matbaası, Bornova, İzmir. 2004.
- 18. 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*, 101, 273-281, 1990.
- 19. Kumaratilake LM, Thompson RCA:** Morphological characterization of Australian strains of *Echinococcus granulosus*. *Int J Parasitol*, 14, 467-477, 1984.
- 20. Nakao M, McManus DP, Schantz M, Craig PS, Ito A:** A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology*, 134, 713-722, 2007.
- 21. Utuk AE, Simsek S, Koroglu E, McManus DP:** Molecular genetic characterization of different isolates of *Echinococcus granulosus* in east and southeast regions of Turkey. *Acta Trop*, 107, 192-194, 2008.
- 22. Thompson RCA, McManus DP:** Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol*, 18, 452-457, 2002.
- 23. Thompson RCA, Lymbery AJ, Constantine CC:** Variation in *Echinococcus*: Towards a taxonomic revision of the genus. *Adv Parasitol*, 35, 145-176, 1995.
- 24. Ortona E, Margutti P, Rigano R, Siracusano A:** Genetic variability in Italian sheep isolates of *Echinococcus granulosus*. *Appl Parasitol*, 3, 205-208, 1996.
- 25. Siles-Lucas M, Felleisen R, Cuesta-Bandera C, Gottstein B, Eckert J:** Comparative genetic analysis of Swiss and Spanish isolates of *Echinococcus granulosus* by southern hybridization and random amplified polymorphic DNA technique. *Appl Parasitol*, 35, 107-117, 1994.
- 26. Romig T, Dinkel A, Mackenstedt U:** The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol Int*, 55, 187-191, 2006.
- 27. Turcekova L, Snabel V, D'Amelio S, Busi M, Dubinsky P:** Morphological and genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in the Slovak Republic. *Acta Trop*, 85, 223-229, 2003.
- 28. Azab ME, Bishara SA, Helmy H, Oteifa NM, El-Hoseiny LM, Ramzy RMR, Ahmed MA:** Molecular characterization of Egyptian human and animal *Echinococcus granulosus* isolates by RAPD-PCR technique. *J Egypt Soc Parasitol*, 34, 83-96, 2004.
- 29. 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.
- 30. Reddy YA, Rao JR, Butchiaiah G, Sharma B:** Random amplified polymorphic DNA for the specific detection of bubaline *Echinococcus granulosus* by hybridization assay. *Vet Parasitol*, 79, 315-323, 1998.
- 31. Siles-Lucas M, Cuesta-Bandera C, Cezar-Benito M:** Random Amplified polymorphic DNA techniques for speciation studies of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol Res*, 79, 343-345, 1993.
- 32. Bhattacharya D, Bera AK, Bera BC, Pan D, Das SK:** Molecular appraisal of Indian animal isolates of *Echinococcus granulosus*. *Indian J Med Res*, 127, 383-387, 2008.
- 33. Yıldız K, Gurcan IS:** The detect of *Echinococcus granulosus* strain using larval rostellar hook morphometry. *Türkiye Parazit Derg*, 33, 199-202, 2009.
- 34. Güralp N, Doğru C:** Ankara mezbahasında kesilen değişik yaşlardaki koyun ve sığırların organlarında görülen ekinokok kistlerinin fertilitite durumları. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 18, 195-205, 1971.