

# *Echinococcus* Cinsinin Moleküler Genetik Karakterizasyonu

Armağan Erdem ÜTÜK, Sami ŞİMŞEK, Ergün KÖROĞLU

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Elazığ

**ÖZET:** *Echinococcus* cinsinin, erişkin ve metacestod safhalarının; morfolojik, biyolojik ve epidemiyolojik özellikleri tür karakterizasyonunda en çok kullanılan kriterlerdir. Fakat suş tayini daha karmaşık olup morfolojik, biyolojik, biyokimyasal, epidemiyolojik ve moleküler kriterlere bağlıdır. Morfolojik ve biyolojik çalışmalar suş tayininde çok faydalı bilgiler sağlamasına rağmen, bu özelliklerin değişken olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bunlar konak ve çevresel faktörlerden etkilenebilir ve genetik düzeydeki farklılığı yansıtmayabilirler. Klasik teknikler çevreden ve konaktan etkilenmesine rağmen, moleküler teknikler parazit genomunun direk karakterizasyonuna olanak sağlar ve çevresel faktörlerden etkilenmezler. Bu derlemede *Echinococcus* cinsinin tiplendirilmesinde kullanılan moleküler teknikler özetlenmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** *Echinococcus* , Moleküler karakterizasyon

## Molecular Genetic Characterization of Genus *Echinococcus*

**SUMMARY:** Morphological, biological and epidemiological features of the adult and metacestode stage of the genus *Echinococcus* have been the most frequently used criteria for the characterization of species. But strain characterization is more complex and is based on the morphological, biological, biochemical, epidemiological and molecular features. Although morphological and biological studies have provided extremely useful information for strain characterization, that these features may be variable must be taken into consideration. They may be influenced by host and environmental factors and may not reflect distinctness at a genetic level. Although, conventional techniques may be affected by the environment or host, molecular techniques allow a direct characterization of the genome of the parasite and they are not affected by environmental factors. In this review, various data concerning molecular typing methods of the genus *Echinococcus* have been summarized.

**Key Words:** *Echinococcus* , molecular characterization

## GİRİŞ

Günümüzde, *Echinococcus* cinsi içerisinde *Echinococcus granulosus*, *E.multilocularis*, *E.oligarthus* ve *E.vogeli* olmak üzere toplam dört türün varlığı bilinmektedir. Bu dört türün erişkinleri, son konak karnivorların ince bağırsaklarında, metacestodları ise omnivorların ve herbivorların karaciğer ve akciğerleri başta olmak üzere çeşitli organ ve dokularında bulunmaktadır. İnsanlar bu dört türün yumurtalarına duyarlı olup metacestodlar insanların çeşitli organ ve dokularında gelişerek "echinococcosis"e neden olmaktadır. *Echinococcus granulosus* ve *E.multilocularis*'in sebep olduğu kistik ve alveolar echinococcosis oldukça yaygın olmasına rağmen *E.oligarthus* ve *E.vogeli*'nin oluşturduğu hastalık Orta ve

Güney Amerika ile sınırlı kalmaktadır. Her ne şekilde olursa olsun bütün *Echinococcus* türleri insanlarda oldukça ciddi ve bazen ölümcül olabilen hastalık tablosuna yol açarken, hayvanların çeşitli organ ve dokularında oluşturduğu yapısal ve fonksiyonel bozukluklar nedeniyle de ekonomik kayıpların oluşmasına neden olmaktadır (1, 19).

*Echinococcus* cinsi içerisinde bulunan genetik varyasyonu belirlemek amacıyla, moleküler düzeyde çok sayıda çalışma yapılmış ve bu varyasyonu destekler nitelikte veriler elde edilmiştir (11, 49). Bu yazıda, bir süredir üzerinde çalıştığımız bir konu olan, *Echinococcus* cinsi paraziter sestodlar ile ilgili çeşitli çalışmalarda farklı amaçlarla uzun süredir uygulandığı halde ülkemizde yeni yeni kullanılmaya başlayan moleküler tekniklerin bir araya getirilerek kısaca prensiplerinin ve kullanım alanlarının açıklanması ve bu konudaki kaynakların araştırmacılarımıza sunulması amaçlanmıştır.

Geliş tarihi/Submission date: 16 Eylül/16 September 2004

Düzeltilme tarihi/Revision date: -

Kabul tarihi/Accepted date: 14 Ocak/14 January 2005

Yazışma /Corresponding Author: Armağan Erdem Ütük  
Tel: (+90) (424) 237 00 00 / 6736 Fax: (+90) (424) 238 81 73  
E-mail: aeutuk@firat.edu.tr

*Echinococcus* cinsinin metacestod ve erişkinlerinin tür ayrımı; morfolojik, biyolojik ve epidemiyolojik kriterlere göre yapılmaktadır. Ancak suş ayrımı; morfolojik, biyolojik, biyokimyasal, epidemiyolojik ve moleküler kriterler gibi birçok parametrenin birlikte değerlendirildiği kompleks bir olaydır (5, 7, 8, 9, 47, 48).

Morfolojik ve biyolojik çalışmalar, suş tayininde çok değerli bilgiler sağlmasına rağmen, bunların konak ve çevresel faktörlerden etkilenebileceği ve genetik düzeydeki farklılığı yansıtmayacağı asla unutulmamalıdır. Halbuki moleküler teknikler, parazit genomunun doğrudan karakterizasyonunu sağladığı için, konağa ve çevreye ait faktörlerden etkilenmemektedir (7, 23).

Moleküler çalışmalar neticesinde *Echinococcus* cinsindeki türler ve bunların suşları ile ilgili olarak elde edilen veriler şöyle özetlenebilir;

- 1- *E.granulosus* türü içerisinde; koyun suşu (G1), Tazmanya koyun suşu (G2), buffalo suşu (G3), at suşu (G4), sığır suşu (G5), deve suşu (G6), domuz suşu (G7), geyik suşu (G8), vahşi yaşam suşları (Aslan suşu, lagomorph suşu), domuz suşuna çok benzeyen ancak ondan genetik olarak farklılık gösteren G9 suşu ve Fennoscandian geyik suşu (G10) olmak üzere çok sayıda suş bulunmaktadır (11, 26, 40, 49).
- 2- *E.granulosus*'un bazı suşları içerisinde dahi genetik varyasyonlar bulunmaktadır (35).
- 3- *E.granulosus*'un bazı suşlarındaki (G4, G5) genetik farklılıklar, bu suşların tür (G4 için *E.equinus*, G5 için *E.ortleppi*) statüsünde ele alınmasını gerektirecek kadar fazladır (49).
- 4- *E.multilocularis*'in genotipleri arasındaki nükleotid farklılığı, *E.granulosus*'un farklı suşları arasındaki nükleotid farklılığından 10 kat daha düşüktür (21).
- 5- *E.oligarthus* ve *E.vogeli* türlerine bağlı suşlar bulunmamaktadır (11).
- 6- Suş varyasyonunun mevcudiyeti ve miktarı, hastalığın epidemik olduğu bölgelerde lokal bulaşma şekli, etkene karşı aşı ve ilaç geliştirme çalışmaları, hastalığın teşhis ve tedavi teknikleri üzerinde etkilidir (29, 46).

Bundan sonraki kısımlarda *Echinococcus* cinsine bağlı türler içerisinde bulunan suş farklılıklarının belirlenmesinde oldukça güvenilir olan moleküler teknikler ayrı ayrı ele alınacak, testlerin uygulanışı ve özgülüğü hakkında kısaca bilgi verilecektir.

#### **Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)**

Restriksiyon enzimleri (RE), çift iplikçikli DNA'da spesifik bölgelerden kesim yaparak, DNA'dan bir genin veya gen taşıyan bir DNA segmentinin çıkarılmasında etkin fonksiyonları olan enzimlerdir (4). DNA'nın bu enzimlerden bir veya birkaçı ile kesime uğratıldıktan sonra, agaroz jel elektroforezine

tabi tutulması ve sonra ethidium bromid ile boyanan jelde oluşan DNA bantlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe "restriction fragment length polymorphism" adı verilmektedir (53).

Bu yöntem PZR-RFLP ile karşılaştırıldığında; uygulaması ve değerlendirmesi daha güçtür, sonuçlar daha uzun sürede alınmaktadır ve maliyeti daha yüksektir. Diğer tiplendirme teknikleri ile kıyaslandığında ise her iki yöntemin de (RFLP, PZR-RFLP) ayırım gücü orta düzeydedir ancak laboratuvarlar arası uyumları daha iyidir (53).

Çin'in dört bölgesinden toplanan *E.granulosus* izolatlarından elde edilen DNA'nın RFLP ve Southern blot analizi ile incelenmesi sonucunda bu dört bölgedeki koyunlardan toplanan izolatlar arasında ayrıca yak ve koyun izolatları arasında genetik bir varyasyonun olmadığı belirlenmiştir (52), ayrıca Çin'in kuzeybatısında insanların da dahil olduğu birçok ara konaktan elde edilen 117 izolat RFLP, PZR-RFLP ve mitokondrial genom analizi tekniklerinin kombine olarak kullanıldığı bir çalışmada incelenmiş ve bu izolatlar arasında genetik bir varyasyon olmadığı belirlenmiştir (30).

#### **Polimeraz Zincir Reaksiyonu - Restriction Fragment Length Polymorphism (PZR-RFLP)**

Bu yöntemde bilinen RFLP'den farklı olarak genomik DNA'nın belirli bir bölgesi spesifik primerler kullanılarak amplifiye edilmektedir. Amplifiye edilen ürünler bir veya daha fazla sayıda restriksiyon enzimi ile kesilmekte, agaroz jel elektroforez ile ayrılmakta, jel ethidium bromid ile boyanmakta ve son olarak ultraviyole ışık altında görüntüleme işlemi yapılmaktadır (4). PZR-RFLP, *Echinococcus* izolatlarının yada öteki parazit gruplarının ayırımında kullanılan oldukça basit, duyarlı ve hızlı bir yöntemdir (14).

Bu teknik ile İspanya'nın çeşitli bölgelerinden elde edilen 53 izolat incelenmiş ve *E.granulosus*'un *E.multilocularis*'ten ayrımı yapılarak, İspanya'daki *E.granulosus* suşları tanımlanmıştır. Ayrıca *E.granulosus*'un domuz izolatı içerisinde iki farklı genotipin bulunduğu da belirlenmiştir. Domuz suşunun ileri ayırımını sağlamak amacıyla da NDI ve COI genleri amplifiye edilip sekanslanmıştır. Çalışma sonucunda İspanya'da G1 ve G7 genotiplerinin bulunduğu bir kez daha ortaya konmuştur (18). Tekniğin DNA sekanslama tekniği ile kombine olarak kullanıldığı bir çalışmada ise İran'da koyun ve deve genotiplerinin bulunduğu belirlenmiş (22, 54), deve suşunun insanlar için enfektif olduğu ve bu suşun hem koyunları hem de sığırları enfekte ettiği ortaya konulmuştur (22). Yine DNA sekanslama ve PZR-RFLP tekniklerinin kombine olarak kullanıldığı bir çalışmada Arjantin'de *E.granulosus*'un dört farklı suşu (G1, G2, G6, G7) olduğu belirlenmiş, G2 ve G7 suşlarının insan enfeksiyonuna neden olduğu ortaya konmuştur (38). PZR-RFLP analizi ile geyik suşunun *E.granulosus*'un diğer suşlarından ayrılabilmesi de belirlenmiştir (6). Slovakya'da G7 genotipinin bulunduğu (44) Rusya ve Kaza-

kistan'daki suşların önceden belirtilen suşlardan farklı olmadığı (32) Polonya'da ise domuz suşuna çok benzeyen ancak bu suştan ve bilinen diğer suşlardan genetik olarak ayrılan bir suşun (G9) insan enfeksiyonlarına sebep olduğu ortaya konmuştur (40).

#### Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PZR)

Arbitrary primed PCR (AP-PCR) olarak da adlandırılan Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PZR), genomik DNA'nın rastgele seçilmiş bir veya daha fazla primer ile çoğaltılması prensibine dayanmaktadır. Kullanılan primerler genellikle 9-10 bazlık kısa primerler olup G-C bakımından zengindir (En az %40 mol G+C içermeli) (33, 36).

Reddy ve ark. (37), *E.granulosus*'un buffalo ve sığır suşlarını ayırmak amacıyla yaptıkları RAPD-PZR analizinde, G+C oranları %60 ile %81.8 arasında değişen 10-11 bazlık dört oligonükleotid primeri test etmişler ve yüksek G+C oranının primer stabilitesini artırdığını ve daha fazla RAPD profili oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Bu teknikte primerlerin bağlanma ısısı 40-50°C'ye düşürülmüştür. Düşük sıcaklık derecesinde gerçekleştirilen bağlanma aşamasında, seçilen primerler kromozom üzerinde hem kendilerine özgü bölgelere, hem de özgü olmayan bölgelere bağlanmaktadır. Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık farklılıkları agaroz jelde saptanabilen farklı sayı ve uzunlukta bantların oluşumuna neden olmaktadır. Aynı tür içerisindeki farklı suşlarda primerlerin bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirine olan uzaklıkları değişik olacağından, agaroz jel elektroforezinde, amplifiye edilen parçaların sayı ve büyüklüğü de farklılık göstermektedir. Suşlar arasında primerlerin bağlanma yerlerinde gerçekleşmiş olan mutasyonlar (delesyon, insersiyon) bant polimorfizminin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Amplifikasyon sonucunda jel elektroforezinde gözlenen her bir izolata ait bant profilleri birbirleri ile karşılaştırılmaktadır. Aynı bant profili gösteren izolatlar "epidemiolojik olarak ilişkili" şeklinde yorumlanmaktadır. Bant profilleri benzer olan izolatlar yeni primerlerle tekrar test edilmeli ve diğer tiplendirme yöntemleri ile çalışılmalıdır (33, 36).

Yöntemin avantajları; hızlı ve kolay uygulanabilir olması, çok miktarda DNA'ya ve DNA sekans bilgilerine gereksinim duyulmaması, tüm genomun incelenmesine olanak sağlaması ve RFLP'den daha fazla polimorfizm elde edilmesidir. Yöntemin dezavantajları ise; PZR artefaktlarına bağlı olarak her zaman verimli sonuçlar alınamaması, sonuçların tekrarlanabilirliğinin düşük olması, agaroz jel elektroforezinde birkaç bant oluşumu ile sonuçlanan zayıf profillerin oluşabilmesi, RFLP'de olduğu gibi polimorfizm tanısının sınırlı olması şeklinde ifade edilmektedir (2, 12, 28).

Bu teknik kullanılarak yapılan çalışmalarda; *E.granulosus*'un İsveç ve İspanyol izolatlarının karakteristik bant özelliği gösterdiği (43) ve İspanya'da *E.granulosus*'un üç farklı suşunun

bulunduğu (42), *E.granulosus*'un buffalo ve sığır suşunun genetik olarak farklı olduğu (37), İtalya'da koyun izolatlarında suş içi farklılıkların bulunduğu (35), Slovakya'da domuz izolatlarında belirgin farklılıklar bulunduğu belirlenmiştir (51). Tekniğin *echinococcus* cinsine bağlı türlerin tiplendirilmesinde uygun olduğu ancak RAPD-PZR tekniğinin diğer moleküler tekniklerle doğrulanması gerektiği ifade edilmiştir (35, 51).

#### PZR-SSCP (PCR-Single Stranded Conformation Polimorphism) Analizi

Single Stranded Conformation Polimorphism (SSCP); sekans farklılığı gösteren DNA örneklerinin belirlenmesinde kullanılan ucuz, kolay, duyarlı ve güvenilir bir yöntemdir (45). Sekans farklılıklarının belirlenmesinde kullanılan diğer yöntemlere göre oldukça büyük avantajları bulunmaktadır. Örneğin DNA fragmentlerinin PZR-RFLP veya RAPD-PZR teknikleri ile analizi, bu fragmentlerin büyüklüklerine göre agaroz jelde ayrımı prensibine dayanmaktadır. Ancak aynı büyüklükte olan fakat sekans varyasyonu gösteren fragmentler jelde birlikte göç edecek ve belki de yanlışlıkla tek bir sekans olarak algılanacaktır. SSCP analizinde ise böyle bir durum söz konusu değildir. Çünkü uygun büyüklükteki bir fragmentte tek bir nükleotid farklılığı dahi belirlenebilmektedir. Bu metodun prensibini tek iplikçikli DNA'nın şekil ve büyüklüğüne bağlı olarak, denature olmayan jel içerisindeki elektroforetik hareketi oluşturmaktadır (34).

Çift iplikçikli DNA'nın jeldeki elektroforetik hareketi onun büyüklüğü ve uzunluğu ile yakından ilişkilidir. Ancak nükleotid farklılıkları bu hareketi fazla etkilemez. Oysa tek iplikçikli DNA'nın jeldeki elektroforetik hareketi yüzlerce nükleotid içerisindeki tek bir nükleotid farklılığından dahi etkilenir. Çünkü komplementeri olmayan DNA stabil değildir (31). Tek iplikçikli DNA, jeldeki elektroforetik göçü esnasında sekonder ve tersiyer yapılar kazanmaktadır. Bu şekil değişiklikleri; DNA iplikçığının uzunluğuna, baz eşleşmelerinin sayısına ve yerine bağlıdır. Denature olmayan poliakrilamid jel elektroforezinde DNA'nın yapısındaki tek bir baz farklılığı dahi oluşan konformasyon ve hareket değişikliği sayesinde belirlenebilmektedir (15). Tek iplikçikli DNA bantlarının belirlenmesinde gümüş boyama tercih edilir (4). Ethidium bromid her zaman güvenilir sonuçlar vermeyebilir. Ayrıca sonuçlar otoradyografi ile de belirlenebilir (3, 15, 50). SSCP analizinin sensitivitesi; DNA konsantrasyonu, incelenen fragmentlerin uzunluğu, elektroforez ısısı, jel kompozisyonu, kullanılan tampon ve pH gibi birçok parametreden etkilenebilir (13, 24). Fragmentlerin boyu SSCP analizinin sensitivitesi üzerinde en etkili faktörlerden birisidir. Bu teknik ile 100-200 bp'lik fragmentlerdeki mutasyonların belirlenme oranı %50-95'tir. Ancak bu oran uygun koşullar sağlandığında %100'e kadar çıkabilmektedir (10). Optimal fragment boyu 150 bp'dir. Ancak büyük fragmentlerin kullanıldığı durumlarda sensitivite fragmentin artan büyüklüğüne paralel olarak düş-

mektedir (41). SSCP'nin en büyük avantajı çok sayıda PZR örneğinin eş zamanlı olarak incelenmesine olanak sağlamasıdır. Kullanılan tarak ölçüsüne bağlı olarak tam uzunluktaki bir sekanslama jelinde 49-97 PZR ürünü analiz edilebilmektedir. Bu teknik PZR ürünlerini görüntülemek, incelenen genlerde yeterli polimorfizmin olup olmadığını ortaya koymak, polimorfizmin çok olduğu gen bölgelerini belirlemek, çok kopyalı genlerde polimorfizm olup olmadığını tespit etmek ve intraspesifik varyasyonları belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (50).

Bu teknik kullanılarak yapılan çalışmalarda; *Echinococcus* cinsi içerisinde bulunan farklı suşların bu teknikte rahatlıkla belirlenebileceği (17), Arjantin'de *E.granulosus*'un beş farklı suşunun bulunduğu (25), *E.multilocularis*'in genotipleri arasındaki nükleotid farklılığın, *E.granulosus*'un farklı suşları arasındaki nükleotid farklılığından 10 kat daha düşük olduğu ve (21), *E.granulosus*'un farklı suşlarının SSCP profillerine göre DNA sekans analizinden önce tanınarak *Echinococcus* izolatlarının rutin laboratuvar tanısında kullanılabileceği (55), belirtilmiştir.

#### DNA Baz Dizi Analizi

Dizi analizinde; Klenow, Tag DNA polimeraz, reverse transkriptaz veya sekans enzimlerinden birisi kullanılarak dizisi saptanacak DNA iplikliğinin komplementeri sentezlenmektedir. Çalışmaların çoğunda zincir uzamasının sonlandırılması yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem, DNA polimerazların dNTP'ler yanında, deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri de substrat olarak kullanılmaları esasına dayanır. Sentezlenen DNA iplikliğine dNTP eklendiğinde uzama devam ederken, ddNTP eklenmesi halinde zincir uzaması durmaktadır. Kalıp DNA'lar, primer, dNTP karışımı ve enzimin bulunduğu dört reaksiyon tüpünün her birine bir ddNTP eklenmesinden sonra bağlanma ve uzama işlemleri uygulanmaktadır. Böylece reaksiyon tüplerinde farklı uzunluklarda DNA parçalarının oluşması gerçekleşmektedir. Sonuçta ortaya çıkan farklı uzunluktaki DNA parçaları poliakrilamid jelde elektroforeze tabi tutulmaktadır. Dizi analiz sonucunu görünür hale getirmek için radyoaktif madde, kemilüminesans veya floresan veren boya ile işaretleme yapılmaktadır.

Otomatize sistemlerin çoğunda reaksiyonun başlangıcında floresans veren madde ile işaretli primer veya nükleotidler kullanılarak baz dizilimi gözlemlenebilir hale getirilmektedir. Ancak baz dizi analizinde yöntemin uygulanması ile ilgili zorluklar vardır. Sonuçların yorumlanmasında son derece dikkatli olunması gerekmektedir çünkü artefaktlar problem oluşturabilmektedir. Her iki DNA zincirinin dizi analizi yapılarak, artefakt ve diğer faktörlere bağlı hatalar en aza indirilmelidir. Jele bağlı olmayan dizi analiz yöntemleri (hibridizasyona dayalı, gene-spesifik-chips) geliştirilerek bu problemlerin önüne geçilebilir. Yöntem pahalıdır ve uygulanabilmesi için gelişmiş laboratuvar olanaklarına gereksinim duyulmaktadır (33).

Bu teknik kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda, *echinococcus* cinsine bağlı türlerde çapraz döllenme olayının nadiren şekillendiği, *E.granulosus*'un at suşunun taksonomik statüsünün yeniden gözden geçirilmesinin gerektiği (20, 27) ve Finlandiya geyik suşunun (G10) Amerikan geyik suşundan farklı olduğu ortaya konulmuştur (26). Bu teknik ayrıca RFLP, PZR-RFLP gibi moleküler tekniklerle kombine olarak kullanılmış ve Çin'in kuzeybatısından elde edilen izolatlar arasında genetik bir varyasyon olmadığı, İspanya'da G1 ve G7 genotiplerinin, İran'da G1 ve G6 genotiplerinin bulunduğu belirlenmiştir (18, 22, 30, 54).

#### Dideoxy Fingerprinting (ddF)

Dideoxy fingerprinting, nükleik asitlerin jel elektroforezi boyunca kazandığı fiziksel özelliklere dayanan ve PZR ile çoğaltılan DNA segmentlerindeki sekans varyasyonlarının belirlenmesinde kullanılan oldukça etkili bir tekniktir (13, 16).

İlk defa Sarkar ve ark.(39), tarafından bildirilen bu teknik, Sanger sekanslama ve SSCP tekniklerinin bir kombinasyonudur. Bu metotta sadece tek bir dideoksinükleotidin kullanıldığı Sanger sekanslama yöntemini, denature olmayan (non-denaturing) jel elektroforez sistemi izlemekte ve bu teknik ile PZR ile amplifiye edilen fragmentlerdeki tek bir sekans değişikliği bile belirlenebilmektedir. DNA'daki mutasyonlar, bantların pozisyon değişiklikleri ya da otoradyografide bir bantın oluşumu veya kaybı ile belirlenebilir (16). Bu teknik ile sekans uzunluğu 150-250 bp olan fragmentlerdeki tek bir baz mutasyonu dahi %100 oranında belirlenebilmektedir (16, 39).

Diğer moleküler tekniklere göre ddF'nin üstünlükleri bulunmaktadır. Örneğin PZR-RFLP'de DNA fragmentlerinde sınırlı sayıda bulunan restriksiyon enzimi kesim bölgelerindeki varyasyonlar belirlenebilmektedir. Oysa bu teknikte, primer amplikon uzunluğunda hemen hemen hiçbir sınırlama olmadan tüm sekans incelenebilmektedir. RAPD-PZR'nin aksine, ddF'de spesifik primerler kullanılmaktadır; bu da hata yapma olasılığını en aza indirirken, verimliliği maksimum düzeye çıkarmaktadır. Bu teknikte hem mobilite farklılıkları hem de bant farklılıkları belirlenebilmektedir. Bu özellikler de ddF'yi, DNA sekanslamaya gereksinim kalmadan, çok sayıda nükleotid farklılıklarının belirlenmesinde güçlü, güvenilir ve ekonomik bir teknik haline getirmektedir (16).

Gasser ve ark.(16), bu teknik ile *Echinococcus* cinsinde bulunan yedi farklı genotipi (G1, G4, G6, G8, O, V ve M2) birbirinden ayırt etmiş ve G1 genotipine ait sekiz izolatın bazılarında gizli bir varyasyon bulunduğunu, G4 ve M2 genotipine ait iki örnekte ise varyasyon bulunmadığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar (16), O, V ve M2 genotiplerini sırasıyla *E.ortleppi*, *E.vogeli* ve *E. multilocularis*'ten elde etmişlerdir. Ayrıca bu teknik ile DNA sekanslamaya gerek kalmaksızın *Echinococcus* cinsi ve bunun dışında kalan parazitlerin tiplendirilebileceğini belirtmişlerdir.

Sonuç olarak, *Echinococcus* cinsine bağlı türlerin tiplendirilmesinde kullanılan moleküler tekniklerin hedefinin, direkt olarak parazitin DNA'sı olması, morfolojik ve çevresel faktörlerden bağımsız oluşu bu yöntemlerin tiplendirme gücünü artırmaktadır. *Echinococcus* cinsine bağlı türlerin farklı suşlarının belirlenmesi, echinococcosis'in epidemiyolojisi, teşhisi, tedavisi ve kontrol tedbirlerinin alınması gibi birçok konuda hayati öneme sahiptir. Adı geçen tiplendirme yöntemlerinden hangilerinin kullanılacağı, mevcut laboratuvar koşullarına, konuya hakim deneyimli elemanların varlığına ve ulaşılmak istenilen bilgiye bağlı olarak değişmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. **Amman RW, Eckert J**, 1995. Clinical diagnosis and treatment of echinococcosis in humans. Thompson RCA, Lymbery AJ Eds. *Echinococcus and Hydatid Disease*. Wallingford, Oxon: CAB International. p. 411-463.
2. **Anon**. RAPDs. İnternet erişim adresi. [http://www.usask.ca/agriculture/plantsci/classes/plsc416/projects\\_2002/pawlin/resources](http://www.usask.ca/agriculture/plantsci/classes/plsc416/projects_2002/pawlin/resources)
3. **Anon**. SSCP (Single Stranded Conformational Polymorphism). İnternet erişim adresi. <http://www.egn.wageningenur.nl/pgr/research/molgen/sses.htm>
4. **Arda M**, 1994. *Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler)*. İkinci baskı. Ankara: Kükem Derneği Bilimsel Yayınları. No:2
5. **Bowles J, Blair D, McManus DP**, 1992. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol.*, 54: 165-173.
6. **Bowles J, Blair D, McManus DP**, 1994. Molecular genetic characterization of the cervid strain ("northern form") of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 109(2): 215-221.
7. **Bowles J, McManus DP**, 1993. Molecular variation in *Echinococcus*. *Acta Trop.*, 53: 291-305.
8. **Bowles J, McManus DP**, 1993. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. *Mol Biochem Parasitol.*, 57: 231-239.
9. **Bowles J, McManus DP**, 1993. NADH dehydrogenase I gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int J Parasitol.*, 23: 969-972.
10. **Cotton RGH**, 1997. *Mutation Detection*. Oxford : Oxford University Pres.
11. **Eckert J, Thompson RCA**, 1997. Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphises on their infectivity to humans. *Acta Tropica*, 64: 19-34.
12. **Ellsworth DL, Rittenhouse KD, Honeycutt RL**, 1993. Artfactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Bio Techniques*, 14(2): 214-217.
13. **Gasser RB**, 1997. Mutation scanning methods for the analysis of parasite genes. *Int J Parasitol.*, 27: 1449-1463.
14. **Gasser RB**, 1999. PCR-based technology in veterinary parasitology. *Vet Parasitol.*, 84: 229-258.
15. **Gasser RB, Monti JR**, 1997. Identification of parasitic nematodes by PCR-SSCP of ITS-2 rDNA. *Mol Cell Prob.*, 11: 201-209.
16. **Gasser RB, Zhu X, McManus DP**, 1998. Dideoxy fingerprinting: application to the genotyping of *Echinococcus*. *Int J Parasitol.*, 28: 1775-1779.
17. **Gasser RB, Zhu X, McManus DP**, 1998. Display of sequence variation in PCR-amplified mitochondrial DNA regions of *Echinococcus* by single-strand conformation polymorphism. *Acta Tropica*, 71: 107-115.
18. **González LM, Daniel-Mwambete K, Montero E, Rosenzvit MC, McManus DP, Gárate T, Cuesta-Bandera C**, 2002. Further molecular discrimination of Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Exp Parasitol.*, 102: 46-56.
19. **Güralp N**, 1981. *Helmintoloji*. İkinci baskı. Ank. Üniv. Vet. Fak. Yayın. No:368. Ankara
20. **Haag KL, Araújo AM, Gottstein B, Zaha A**, 1998. Selection, recombination and history in a parasitic flatworm (*Echinococcus*) inferred from nucleotide sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 93(5): 695-702.
21. **Haag KL, Zaha A, Araujo AM, Gottstein B**, 1997. Reduced genetic variability within coding and non-coding regions of the *Echinococcus multilocularis* genome. *Parasitology*, 115: 521-529.
22. **Harandi MF, Hobbs RP, Adams PJ, Mobedi I, Morgan-Ryan UM, Thompson RCA**, 2002. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Iran. *Parasitology*, 125: 367-373.
23. **Hobbs RP, Lymbery AJ, Thompson RCA**, 1990. Rostellar hook morphology of *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) from natural and experimental Australian hosts, and its implications for strain recognition. *Parasitology*, 101(2): 273-281.
24. **Hongyo T, Buzard GS, Calvert RJ, Weghorst CM**, 1993. Cold SSCP: a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acid Research*, 21: 3637-3642.
25. **Kamenetzky L, Gutierrez AM, Canova SG, Haag KL, Guarnera EA, Parra A, García GE, Rosenzvit MC**, 2002. Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infection Genetics and Evolution*, 2: 129-136.
26. **Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvela-Koski V, Meri S**, 2003. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 127(3): 207-215.
27. **Le TH, Pearson MS, Blair D, Dai N, Zhang LH, McManus DP**, 2002. Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse-dog and sheep-dog strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 124: 97-112.
28. **MacPherson JM, Eckstein PE, Scoles GJ, Gajadhar AA**, 1993. Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration. *Molecular and Cellular Probes*, 7(4): 293-294.

29. **McManus DP**, 2002. The molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* and cystic hydatid disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 96(1): 151-157.
30. **McManus DP, Ding Z, Bowles J**, 1994. A molecular genetic survey indicates the presence of a single, homogeneous strain of *Echinococcus granulosus* in north-western China. *Acta Trop.*, 56(1): 7-14.
31. **Melcher U**, 2003. SSCP's  
<http://opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MGW1/MG11129.html>.
32. **Nikulina NA, Benediktov H, Garaev MM**, 2003. *Echinococcus* genotyping by PCR-RFLP. *Med Parasitol.*, 2: 29-32.
33. **Olive M, Bean P**, 1999. Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol.*, 37: 1661-1669.
34. **Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K**, 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5(4): 874-879.
35. **Ortona E, Margutti P, Rigano R, Siracusano A**, 1996. Genetic variability in Italian sheep isolates of *Echinococcus granulosus*. *Appl Parasitol.*, 3: 205-208.
36. **Ralp D, McClelland M**, 1998. Arbitrary primed PCR methods for studying bacterial disease. Woodforn N, Johnson P, Eds. *Methods in Molecular Medicine*. Humana Pres Inc, Totowa, NJ, p.60-75.
37. **Reddy YA, Rao JR, Butchaiah G, Sharma B**, 1998. Random amplified polymorphic DNA for the specific detection of the bubaline *Echinococcus granulosus* by hybridization assay. *Vet Parasitol.*, 79: 315-323.
38. **Rozenzvit MC, Zhang LH, Kamenetzky L, Canova SG, Guarnera EA, McManus DP**, 1999. Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology*, 118(5): 523-530.
39. **Sarkar G, Yoon HS, Sommer SS**, 1992. Dideoxy fingerprinting: a rapid and efficient screen for the presence of mutations. *Genomics*, 13(2): 441-443.
40. **Scott JC, Stefaniak J, Pawlowski ZS, McManus DP**, 1997. Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 114: 37-43.
41. **Sheffield VD, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom D, W&Stone EM**, 1993. The sensitivity of single strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*, 16: 325-332.
42. **Siles-Lucas M, Benito MC, Cuesta-Bandera C**, 1996. *Echinococcus granulosus*: genomic and isoenzymatic study of Spanish strains isolated from different intermediate hosts. *Vet Parasitol.*, 63: 273-282.
43. **Siles-Lucas M, Felleisen R, Cuesta-Bandera C, Gottstein B, Eckert J**, 1994. 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.
44. **Snabel V, D'Amelio S, Mathiopoulos K, Turcekova L, Dubinsky P**, 2000. Molecular evidence for the presence of a G7 genotype of *Echinococcus granulosus* in Slovakia. *J Helminth.*, 74(2): 177-181.
45. **Sunnucks P, Wilson ACC, Beheregaray LB, Zenger K, French J, Taylor AC**, 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*, 9: 1699-1710.
46. **Thompson RCA**, 1998. Species and strains in the genus *Echinococcus*-epidemiological and evolutionary perspectives. *Parasit Int.*, 47: 133-281.
47. **Thompson RCA, Lymbery AJ**, 1988. The nature, extent and significance of variation within the genus *Echinococcus*. *Adv Parasitol.*, 27: 209-258.
48. **Thompson RCA, Lymbery AJ, Constantine CC**, 1995. Variation in *Echinococcus*: towards a taxonomic revision of the genus. *Adv Parasitol.*, 35: 145-176.
49. **Thompson RCA, McManus DP**, 2002. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends in Parasitology*, 18(10): 452-457.
50. **Travis Glenn**, 1996. Step by step SSCP.  
[http://www.uga.edu/srel/DNA\\_Lab/SSCP96V2.rtf](http://www.uga.edu/srel/DNA_Lab/SSCP96V2.rtf).
51. **Turčeková L, Šnábel V, D'Amelio S, Busi M., Dubinský P**, 2003. Morphological and genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in the Slovak Republic. *Acta Tropica.*, 85: 223-229.
52. **Xue HC, Qiu LS, Zhu CW**, 1993. RFLP analysis of DNA from *Echinococcus granulosus* collected from four provinces/autonomous region in China. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.*, 11(3): 201-203.
53. **Yağcı A**, 2001. Restriction Fragment Length Polymorphism ve Polimeraz Zincir Reaksiyon Bazlı Tiplendirme Yöntemleri. Durmaz R, Ed. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*, 2.baskı, Malatya: İnönü Üniv.Tıp Fak. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, p.149-160.
54. **Zhang L, Eslami A, Hosseini H, McManus DP**, 1998. 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.
55. **Zhang L, Gasser RB, Zhu X, McManus DP**, 1999. Screening for different genotypes of *Echinococcus granulosus* within China and Argentina by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 93: 329-334.