

Echinococcus granulosus sensu stricto'nun G1 ve G3 Genotiplerinin Ayırımında PZR-RFLP ve SSCP Metotlarının Eş Zamanlı Kullanımı

Figen ÇELİK^{1,a,✉}, Muhammed Ahmed SELÇUK^{1,2,b}, Muhammet USLUĞ^{1,c}, Afra Sena TEKİN^{1,3,d}, Sami ŞİMŞEK^{1,e,c}

¹Firat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Elazığ, TÜRKİYE

²Siirt Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Siirt, TÜRKİYE

³Çukurova Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Adana, TÜRKİYE

ORCID: 0000-0002-2188-0196^a, 0000-0003-1769-4558^b, 0009-0003-3402-3606^c, 0009-0009-5637-5075^d, 0000-0002-3567-326X^e

✉ Corresponding Author

Figen ÇELİK

Firat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Parazitoloji Anabilim Dalı, Elazığ,
TÜRKİYE

f.celik@firat.edu.tr

Received

12.02.2025

Accepted

14.05.2025

Published

30.06.2025

DOI

10.47027/duvetfd.1638862

How to cite: Çelik F, Selçuk MA, Usluğ M, Tekin AS, Şimşek S (2025). *Echinococcus granulosus sensu stricto*'nun G1 ve G3 Genotiplerinin Ayırımında PZR-RFLP ve SSCP Metotlarının Eş Zamanlı Kullanımı. *Dicle Univ Vet Fak Derg.*, 18(1):28-32.

This journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).



Öz

Kistik ekinokokkozis (KE), dünya çapında insan ve hayvanlarda yaygın olarak rastlanan ihmal edilmiş bir halk sağlığı ve ekonomik sorundur. Bu çalışmanın amacı, *E. granulosus* s.s. (G1/G3) izolatları içerisinde G1 ve G3 genotiplerinin PZR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PZR-RFLP) ve takiben Single Stranded Conformation Polymorphism (SSCP) teknikleriyle ayırımının yapılmasıdır. Çalışmada kullanılan insan, sığır ve koyun hidatik kist izolatlarına ait genomik DNA (gDNA)'lar *E. granulosus* s.s. (G1/G3) olduğu DNA dizi analizi ile teyit edilen örnekler arasından seçilmiştir. Genomik DNA'lar, *E. granulosus* s.s.'nin G1 ve G3 genotiplerini ayırt eden mt-nad5 bölgesini çoğaltan primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. Bu PZR ürünleri *MbolI*, *HindIII* ve *HphI* restriksiyon enzimleriyle ayrı ayrı kesildi. Daha sonra hazırlanan SSCP jeline bu kesim ürünleri yüklendi ve elektroforeze tabi tutulup jel gümüş nitrat ile boyanarak bantlar görünür hale getirildi. Bu çalışmada hepsi Elazığ ilinden elde edilen ikisi insan, altısı sığır ve 13'ü koyun olmak üzere toplam 21 izolat analiz edildi. Bütün örneklerde *E. granulosus* s.s.'un 759 bp'lık mt-nad5 gen bölgesi PZR ile başarılı bir şekilde çoğaltıldı. RFLP neticesinde *MbolI* enzimi G1 ve G3 genotiplerine ait PZR ürünlerini dört farklı pozisyonundan, *HindIII* iki farklı ve yine *HphI* de iki farklı pozisyonundan kesti. Takiben yapılan SSCP analizinde bütün örneklerin aynı bant profilini göstermesi nedeniyle *E. granulosus* s.s.'nin G1 ve G3 genotiplerinin bu yöntemle ayırt edilemeyeceği anlaşıldı.

Anahtar Kelimeler: *Echinococcus granulosus*, genotip, PZR, RFLP, SSCP

Simultaneous Use of PCR-RFLP and SSCP Methods for Differentiation of G1 and G3 Genotypes of *Echinococcus granulosus sensu stricto*

Abstract

Cystic echinococcosis (CE) is a neglected public health and economic problem affecting both humans and animals worldwide. The study aimed to differentiate G1 and G3 genotypes among *E. granulosus* s.s. (G1/G3) isolates using PCR-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) followed by Single Stranded Conformation Polymorphism (SSCP) techniques. The study selected genomic DNA (gDNA) from confirmed *E. granulosus* s.s. (G1/G3) human, cattle, and sheep hydatid cyst isolates. PCR was used to amplify the mt-nad5 region of *E. granulosus* s.s. with primers that distinguish G1 and G3 genotypes. The resulting PCR products were digested separately with *MbolI*, *HindIII*, and *HphI* restriction enzymes. The digestion products were then loaded onto the prepared SSCP gel and subjected to electrophoresis. Finally, the gel was stained with silver nitrate to make the bands visible. The study analysed a total of 21 isolates, comprising two human, six cattle, and 13 sheep, all obtained from Elazığ province of Türkiye. The PCR successfully amplified the 759 bp mt-nad5 gene region of *E. granulosus* s.s. in all samples. As a result of RFLP, *MbolI* enzyme cut the PCR products of G1 and G3 genotypes at four different positions, *HindIII* at two different positions and *HphI* at two different positions. The subsequent SSCP analysis revealed that the G1 and G3 genotypes of *E. granulosus* s.s. could not be differentiated using this method, as all samples displayed an identical band profile.

Key Words: *Echinococcus granulosus*, genotype, PCR, RFLP, SSCP

GİRİŞ

Kistik Ekinokokkozis (KE), *Echinococcus granulosus* sensu lato'nun larvası olan hidatik kist tarafından oluşturulan, ihmal edilmiş bir zoonotik hastalıktır. Parazitin erişkin formu köpek, kurt, çakal ve diğer bazı etçillerin ince bağırsaklarında yaşarken, larvası olan hidatik kist ise insanlar dahil koyun, keçi, sığır, domuz ve diğer birçok evcil ve yabani memelide çoğunlukla karaciğer ve akciğer olmak üzere çeşitli organ ve dokularda yerleşmektedir (1). Mitokondriyal ve nükleer DNA dizilemesine dayanarak, *E. granulosus* s.l. içerisinde beş türü tanımlanmıştır. Bu türler arasında *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1 ve G3), *E. equinus* (G4), *E. ortleppi* (G5), *E. canadensis* (G6/7, G8 ve G10) ve *E. felidis* bulunmaktadır (2-4).

Başlangıçta *E. granulosus* s.s. G1, G2 ve G3 olmak üzere üç genotipten oluşmaktaydı. Ancak son yıllarda yapılan tam genom sekansları neticesinde G2'nin ayrı bir genotip olmadığı, G3'ün bir mikrovaryantı olduğu ortaya konmuştur (5). *E. granulosus* s.s.'nin G1 ve G3 genotiplerinin ayrımı genellikle mitokondriyal sitokrom c oksidaz subunit 1 (mt-CO1) geninin sekans analizi ile yapılır (6). Bununla birlikte son çalışmalarda *E. granulosus* s.s. genotiplerinin ayırt edilmesi için daha uzun mt-CO1 gen bölgelerinin analiz edilmesi gerektiği gösterilmiştir (7, 8). Filogenetik analizlere göre, G1 ve G3 arasında 37 nükleotidlik bir fark vardır (5). Daha uzun mt-CO1 gen dizilerinin (1609 bp) yanı sıra kısmi mt-CO1 (366 bp) ve nad1 (471 bp) dizileri bile G1 ve G3 arasında doğru bir ayırım yapamamaktadır (5). Nitekim son çalışmalar, mt-nad5 geninin kısa bir parçasında, G1 ve G3 genotiplerinin tamamen ayırt edilmesini sağlayan üç tek nükleotid polimorfizminin ve altı informatif pozisyonun varlığını ortaya koymuştur (5).

Türkiye'de *E. granulosus* s.l.'nin tür ve genotiplerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda, hayvan ve insan konaklarından elde edilen izolatlarda *E. granulosus* s.s. (G1/G3), *E. equinus* (G4), *E. ortleppi* (G5) ve *E. canadensis* (G6/G7) tespit edilmiştir (2-4, 9, 10). Cengiz ve Gönenç (11), Türkiye'nin farklı illerinden 49 kist hidatik izolatını (10 sığır ve 39 koyun) mt-nad5 genini dizileyerek analiz etmiş ve G1 (n = 36) ve G3 (n = 13) genotiplerini ayırt etmişlerdir. Türkiye'de yapılan başka bir çalışmada, 12'si insan, 28'i sığır ve 31'i koyun hidatik kist izolatlarının 759 bp uzunluğundaki mt-nad5 gen fragmanı PZR ile çoğaltılarak sekanslatılmıştır. Sekans sonuçlarına göre 61 örneğin *E. granulosus* s.s. G1 genotipi, 10 örneğin ise G3 genotipi olduğu belirlenmiştir (12). Elazığ ve Erzurum illerinden toplanan 54 koyun ve sığır örneği ile yapılan başka bir çalışmada ise PZR-Single Stranded Conformation Polymorphism (PZR-SSCP) analizi denenmiştir. Analiz sonucunda G1 ve G3 arasındaki fark tanımlanamazken, G5 ve G7'nin diğer izolatlardan farkı ortaya konmuştur (13).

Bu çalışmanın amacı, *E. granulosus* s.s. (G1/G3) izolatları içerisinde G1 ve G3 genotiplerinin PZR-Restriction fragment length polymorphism (PZR-RFLP) ve takiben SSCP teknikleriyle ayrımının yapılabilirliğinin araştırılmasıdır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada kullanılan insan, sığır ve koyun hidatik kist izolatlarına ait genomik DNA (gDNA)'lar *E. granulosus* s.s. (G1/G3) olduğu DNA dizi analizi ile teyit edilen örnekler ara-

sından seçilmiştir (12). Bu izolatların isimleri, GenBank erişim numaraları, konakları ve genotipleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *E. granulosus* s.s. izolatlarının Genbank erişim numaraları, ait olduğu konaklar ve genotipleri.

No	İzolat Adı	Genbank Erişim Numarası	Konak	Genotip
1	TRH04	OP889045	İnsan	G1
2	TRC02	OP889055	Sığır	G1
3	TRC03	OP889056	Sığır	G1
4	TRC11	OP889064	Sığır	G1
5	TRC13	OP889066	Sığır	G1
6	TRC28	OP889081	Sığır	G1
7	TRS02	OP889083	Koyun	G1
8	TRS05	OP889086	Koyun	G1
9	TRS06	OP889087	Koyun	G1
10	TRS08	OP889089	Koyun	G1
11	TRS09	OP889090	Koyun	G1
12	TRS10	OP889091	Koyun	G1
13	TRS12	OP889093	Koyun	G1
14	TRS14	OP889095	Koyun	G1
15	TRH10	OP889051	İnsan	G3
16	TRC04	OP889057	Sığır	G3
17	TRS21	OP889102	Koyun	G3
18	TRS23	OP889104	Koyun	G3
19	TRS25	OP889106	Koyun	G3
20	TRS28	OP889109	Koyun	G3
21	TRS29	OP889110	Koyun	G3

Mitokondriyal NADH Dehydrogenase Subunit 5 (mt-nad5) Geninin PZR ile Çoğaltılması

Genomik DNA'lar, Kinkar ve ark. (5) tarafından dizayn edilen ve *E. granulosus* s.s.'nin G1 ve G3 genotiplerini ayırt eden EGnd5F1 (5'-GTTGTTGAAGTTGATTGTTTGTG-3') ve EGnd5R1 (5'-GGAACACCGGACAAACCAAGAA-3') primerleri kullanılarak 759 bp'luk mt-nad5 gen bölgesi PZR ile çoğaltıldı. PZR reaksiyonu şu şekilde oluşturuldu: 5 µL 10X PZR tamponu, 5 µL MgCl₂ (25 mM), her dNTP'den 400 µM, her primerden 20 pmol, 0.2 µL Taq DNA Polimeraz (1.25 IU) ve 28.8 µL steril saf su ile toplam hacim 45 µL olarak hazırlanıp üzerine 5 µL kalıp DNA eklendi. Kinkar ve ark. (5) tarafından daha önce belirlenen bir touch-down PZR protokolü kullanıldı (5). Thermal cycler koşulları, 95 °C'de 1 dk ön denatürasyon, takiben 95 °C'de 20 sn, 55 °C'de 45 sn (tavla sıcaklığı her döngüde kademeli olarak 0,5 °C azaltıldı), 68 °C'de 1 dk olacak şekilde 10 siklus ve ardından 95 °C'de 20 sn, 50 °C'de 45 sn, 68 °C'de 1 dk olacak şekilde 25 siklus ve 68 °C'de 3 dk son uzama işlemine tabi tutuldu. PZR ürünleri daha sonrasında %1.4'lük agaroz jelde 100 volt akımda 40 dk elektroforeze tabi tutuldu ve sonrasında jel görüntüleme cihazında (Quantum, Vilber Lourmat, France) görüntülendi.

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Çalışmada kullanılan *E. granulosus* s.s. izolatlarına ait mt-nad5 sekanslarını kesen restriksiyon enzimleri (RE)'nin belirlenmesi amacıyla bütün sekans verileri ayrı ayrı Restriction-Mapper (<https://www.restrictionmapper.org/>) veri tabanında kontrol edildi ve bu sekansları en az iki noktadan kesen üç enzimin kullanılmasına karar verildi. Bu enzimler, *MbolI* (5 U/µL, 300U Thermo Scientific), *HindII* (5 U/µL, 300U Thermo

Scientific) ve *HphI* (5 U/μL, 300U Thermo Scientific) idi. Enzim kesim reaksiyonu 10 μL PZR ürünü, 1 μL RE, 2 μL 10X Buffer B ve 18 μL steril saf su ile toplam hacim 31 μL olacak şekilde ayrı eppendorf tüplerde hazırlandı. Daha sonra üretici firmanın (Thermo Fisher, Bartlesville, USA) belirlediği koşullarda 37 °C'deki su banyosunda 8 saat enzim kesimi gerçekleştirildi. Bu sürenin sonunda ise 65 °C'de 20 dk enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi. Sonrasında kesim ürünleri %3'lük agaroz jelde 100 volt akımında 40 dk elektroforeze tabi tutuldu ve jel görüntüleme cihazında (Quantum, Vilber Lourmat, France) görüntülendi (4).

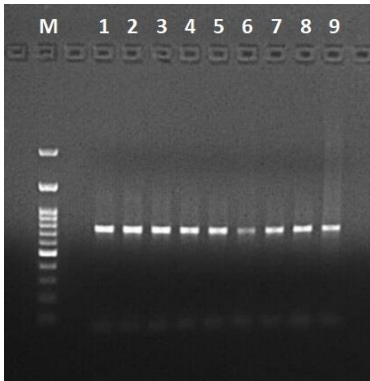
Single Stranded Conformation Polymorphism (SSCP)

Bu yöntem Simsek ve ark. (13) tarafından bildirilen yöntemle gerçekleştirildi. SSCP jeli, 2 ml %40 akrilamid-N,N' Metilenbisakrilamid (39:1), 825 μL 5X Tris Borik Asit-EDTA (TBE), 1 ml gliserol, 500 μL 1M üre, 150 μl %10 amonyum peroksit disülfat, 4575 μL saf su ve 4 μL Tetrametiletildiamin (TEMED) ile hazırlandı. PZR ürünlerinin tek iplik haline getirilmesi için 5 μL hem PZR hem de enzim kesimine uğramış PZR ürünlerinden ayrı tüplere alınarak 11 μL denatüre edici tampon (10 mM NaOH, %95 formamit, %0.05 bromfenol blue ve %0.05 ksilen siyanol) ile homojen bir şekilde karıştırıldı. Elde edilen karışım Thermal Cycler'da 95 °C'de 10 dk denatürasyona maruz bırakıldı. Ardından hemen buz blok üzerine alınarak (-20 °C) SSCP jelinin kuyucuklarına her örnekten 5 μL yüklendi ve 175 volt akımda 2 saat elektroforeze tabi tutuldu. Sürenin sonunda plakalardan çıkarılan jel, gümüş nitrat ile boyandı. Bu amaçla, poliakrilamid jel %10 etanol, %5

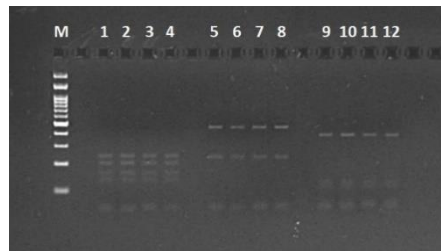
asetik asit ve % 85 distile su içerisine alınarak 6 dk boyunca çalkalanıp fikse edildi. Ardından jel %0.1 gümüş nitrat boyası içerisine alınarak 15 dk orta hızda çalkalanıp boyandı. Bantların görünür hale gelmesi için %1.5 Sodyum hidroksit (NaOH) ve %0.15 formaldehit içerisinden 30 dk çalkalandı. Jel, son olarak %0.75 sodyum karbonat (Na₂CO₃) içerisine alınarak 10 dk çalkalandı ve distile su küvetine alınarak 5 dk yıkama işlemi yapıldıktan sonra görüntülendi.

BULGULAR

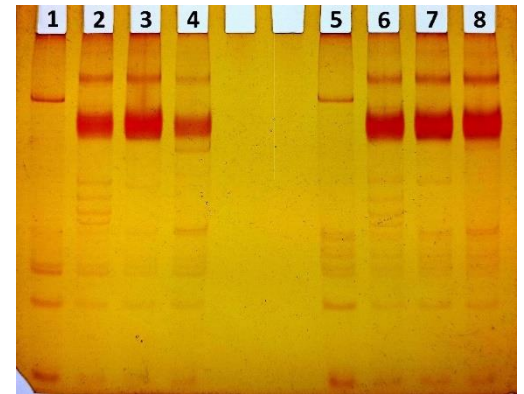
Bu çalışmada hepsi Elazığ ilinden elde edilen ikisi insan, altısı sığır ve 13'ü koyun olmak üzere toplam 21 izolat analiz edildi. Tüm örneklerde *E. granulosus* s.s.'nin 759 bp'lik mt-nad5 gen bölgesi PZR ile başarılı bir şekilde çoğaltıldı (Şekil 1). Sonrasında bu örnekler SSCP analizine tabi tutuldu, ancak yeterli ayırım sağlanamadığı için öncelikle PZR-RFLP yapıp kesim ürünlerinin SSCP yapılmasına karar verildi. Böylelikle bütün izolatların mt-nad5 PZR ürünleri *MbolI*, *HindII* ve *HphI* enzimleri ile kesime tabi tutuldu. Enzim kesimi sonrası farklı DNA fragmentlerinin oluştuğu görüldü (Şekil 2). *E. granulosus* s.s.'nin her iki genotipi de *MbolI* ile kesildiğinde dört farklı, *HindII* ile iki farklı ve yine *HphI* ile iki farklı yerden kesimin olduğu görüldü. Takiben PZR-RFLP ürünleri SSCP jeline yüklenip gümüş nitrat ile boyandı, ancak elde edilen bantlar incelendiğinde hepsinin aynı bant profilini gösterdiği (Şekil 3) ve bu nedenle *E. granulosus* s.s.'nin G1 ve G3 genotiplerinin bu yöntemle ayırt edilemeyeceği ortaya kondu.



Şekil 1. *E. granulosus* s.s. (G1/G3) mt-nad5 genine ait PZR sonuçlarının jel görüntüsü. M: Marker (100 bp); 1-9: Rastgele seçilen bazı örneklerin bant profilleri (759 bp)



Şekil 2. *E. granulosus* s.s. (G1/G3) mt-nad5 genine ait PZR-RFLP sonuçlarının jel görüntüsü. M: Marker (100 bp); 1-4: *MbolI*; 5-8: *HindII*; 9-12: *HphI*.



Şekil 3. *Echinococcus granulosus* s.s.'nin mt-nad5 PZR ürünlerinin SSCP analizi. 1: PZR ürünü (G1); 2: *MbolI* ile kesilmiş PZR ürünü (G1); 3: ile *HindII* kesilmiş PZR ürünü (G1); 4: *HphI* ile kesilmiş PZR ürünü (G1); 5: PZR ürünü (G3); 6: *MbolI* ile kesilmiş PZR ürünü (G3); 7: *HindII* ile kesilmiş PZR ürünü (G3); 8: *HphI* ile kesilmiş PZR ürünü (G3).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) neticesinde elde edilen ürünlerdeki mutasyonların tanımlanması için altın standart yöntem sekans analizidir. Ancak, özellikle popülasyon çalışmalarında çok sayıda örnek çalışmak gerektiğinde tüm PZR amplikonlarının dizilenmesi, masraflı ve zaman alıcıdır (14). Bu nedenle, PZR sonrası mutasyon tespitinde alternatif yöntemler kullanılabilmektedir. Bunlardan biri pratik bir elektroforetik mutasyon tarama yaklaşımı olan SSCP'dir (15). Bu teknik, tek sarmallı bir DNA molekülünün denatüre olmayan bir

jel içindeki elektroforetik hareketliliğinin yapısına ve boyutuna büyük ölçüde bağlı olduğu ilkesine dayanır ve <500 bp'lik PZR ürünlerinde tek nokta mutasyonlarını tespit etme kapasitesi sunar. PZR-SSCP'nin yüksek mutasyon saptama kapasitesi ve nispeten basit bir teknik olması, onu türlerin veya genotiplerin tanımlanması, çok sayıda örnek içinde ve örnekler arasında genetik değişkenliğin taranması ve daha da önemlisi bilinmeyen mutasyonların belirlenmesi için güçlü bir araç haline getirmektedir (15). Böylelikle, bir popülasyondaki genetik varyasyonun kapsamını değerlendirmek için bir tarama aracı olarak kullanıldığında, örneklerin hedef-

lenen dizilemesinden önce PZR-SSCP analizi yapılması dizileme gerektiren örneklerin sayısında önemli bir azalmaya (genellikle %70-90) ve dolayısıyla analizlerle ilişkili maliyetlerin düşmesine imkân sağlamaktadır (15). PZR-SSCP'nin pratik, hassas, spesifik ve tekrarlanabilir olduğu kanıtlanmıştır (16). Yöntemin standartlaştırılmış bir protokol izlemesi (böylece yüksek bir mutasyon tespit oranı elde edilmesi) ve sonuçların dikkatli bir şekilde yorumlanması koşuluyla, SSCP önemli bir tanısal kapasiteye sahip olup seçilen örneklerin dizilenmesi ve dizi verilerinin filogenetik analizleri ile birlikte örneklem prosedürlerine ve genetik belirteçlere dikkat edilirse, *E. granulosus*'un popülasyon genetiği ve epidemiyolojisinin araştırılması için uygundur (17,18). Ancak, PZR-SSCP 500 bp fragmanlara kadar polimorfizmi tespit edebilir. PZR-SSCP'den maksimum verimi almak için ampikonların optimum boyutu 330 ila 380 bp arasında olmalıdır (19). Bu handikapı gidermek için mevcut çalışmada öncelikle PZR ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle küçük parçalara ayrılması (PZR-RFLP) ve daha sonra SSCP yapılmasının mutasyon tespit kapasitesini artırabileceği düşünülmüştür. PZR-RFLP tekniğinde, bir PZR ürünü çeşitli boyutlarda birkaç DNA parçası oluşturmak için tanıma bölgesi olarak bilinen bölgelerden DNA'yı kesen belirli restriksiyon enzimleriyle muamele edilir. Daha sonra, kesilmiş ampikonlar bir jele yüklenir ve elektroforeze tabi tutulur. Böylelikle, farklı boyutlardaki bantlar jel boyunca farklı büyüklüklerde bant oluşturacaktır (20). Simsek ve ark. (13), *E. granulosus* s.l.'nin 446 bp'lik mt-CO1 gen bölgesini PZR ile çoğalttıktan sonra yaptıkları PZR-SSCP analizi ile G5 ve G7 genotiplerini ayırt ederken, *E. granulosus* s.s. (G1/G3) içerisindeki G1 ve G3 genotiplerini tanımlayamamışlardır. Benzer şekilde Zhang ve ark. (21) ve Oudni-M'rad ve ark. (22) da *E. granulosus* s.s. içerisindeki G1 ve G3 genotiplerinin PZR-SSCP yöntemiyle ayırt edememişlerdir. Bu çalışma ile *E. granulosus*'un 759 bp'lik mt-nad5 gen bölgesinin önce RFLP ile parçalara ayrılması ve takiben PZR-SSCP yapılmasına rağmen G1 ve G3 genotiplerinin ayırımında başarı sağlanamamıştır.

Sonuç olarak, *E. granulosus* s.s. (G1/G3) içerisindeki genotip farklılıklarının tanımlanmasında PZR-SSCP'nin yetersiz kaldığı, bu nedenle özellikle mt-nad5 sekans analizinin gerekli olduğu kanaatine varılmıştır.

TEŞEKKÜR

İnsan hidatik kist materyallerinin temini konusundaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Ünal BAKAL'a teşekkür ederiz.

FİNANSAL BEYAN

Bu araştırmanın yürütülmesinde herhangi bir kuruluştan destek alınmamıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemektedir.

YAZAR KATKILARI

Metodoloji, orijinal taslak yazma, inceleme ve düzenleme FC; Metodoloji, biçimsel analiz MAS, MU, AST; Danışmanlık, inceleme ve düzenleme SS. Tüm yazarlar makalenin yayım öncesi son halini okumuş ve kabul etmişlerdir.

ETİK BEYAN

Bu çalışma da kullanılan kist materyali mezbananede kesimi yapılan hayvanların takibi sonucu elde edildiği, canlı insan ve hayvan materyali kullanılmadığı için; etik kurul iznine ihtiyaç duyulmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Rickard MD, Lightowlers MW (1986). The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease (In): Immunodiagnosis of Hydatid Disease. Thompson RCA (Editors). George Allen and Unwin. London, England., 217-249.
2. Kesik HK, Simsek S, Kilinc SG, Koroglu E (2019). Identification of Antigen B (AgB) gene polymorphism in cattle and sheep isolates of Echinococcus granulosus and investigation of effects on serological diagnosis. *Acta Trop.*, 199:105099.
3. Simsek S, Balkaya I, Koroglu E (2010). Epidemiological survey and molecular characterization of Echinococcus granulosus in cattle in an endemic area of eastern Turkey. *Vet Parasitol.*, 172(3-4):347-349.
4. Utuk AE, Simsek S, Koroglu E, McManus DP (2008). Molecular genetic characterization of different isolates of Echinococcus granulosus in east and southeast regions of Turkey. *Acta Trop.*, 107(2):192-194.
5. Kinkar L, Laurimae T, Acosta-Jamett G, et al. (2018). Distinguishing Echinococcus granulosus sensu stricto genotypes G1 and G3 with confidence: a practical guide. *Infect Genet Evol.*, 64:178-184.
6. Yanagida T, Mohammadzadeh T, Kamhawi S, et al. (2012). Genetic polymorphisms of Echinococcus granulosus sensu stricto in the Middle East. *Parasitol Int.*, 61(4):599-603.
7. Kinkar L, Laurimae T, Simsek S, et al. (2016). High-resolution phylogeography of zoonotic tapeworm Echinococcus granulosus sensu stricto genotype G1 with an emphasis on its distribution in Turkey, Italy and Spain. *Parasitol.*, 143(13):1790-1801.
8. Laurimae T, Kinkar L, Andresiuk V, et al. (2016). Genetic diversity and phylogeography of highly zoonotic Echinococcus granulosus genotype G1 in the Americas (Argentina, Brazil, Chile and Mexico) based on 8279 bp of mtDNA. *Infect Genet Evol.*, 45:290-296.
9. Simsek S, Roinioti E, Erosuz H (2015). First report of Echinococcus equinus in a donkey in Turkey. *Korean J Parasitol.*, 53(6): 731-735.
10. Avcioglu H, Guven E, Balkaya I, et al. (2021). The situation of echinococcosis in stray dogs in Turkey: the first finding of Echinococcus multilocularis and Echinococcus ortleppi. *Parasitol.*, 148(9):1092-1098.
11. Cengiz G, Gonenc B (2020). Comparison of molecular and morphological characterization and haplotype analysis of cattle and sheep isolates of cystic echinococcosis. *Vet Parasitol.*, 282: 109132.
12. Celik F, Selcuk MA, Kilinc SG, et al. (2024). Molecular discrimination of G1 and G3 genotypes of Echinococcus granulosus sensu stricto obtained from human, cattle, and sheep using the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 5 marker. *Acta Trop.*, 252:107124.
13. Simsek S, Balkaya I, Ciftci AT, Utuk AE (2011). Molecular discrimination of sheep and cattle isolates of Echinococcus granulosus by SSCP and conventional PZR in Turkey. *Vet Parasitol.*, 178(3-4):367-369.
14. Gulija TK, Ivancic-Jelecki J, Santak M, Forcic D (2011). Comparative analysis of CE-SSCP to standard RFLP-CE-FLA method in quantification of known viral variants within an RNA virus quasispecies. *Electrophoresis.*, 32(14):1852-1859.

15. **Jabbar A, Gasser RB (2013).** Mutation scanning analysis of genetic variation within and among *Echinococcus* species: implications and future prospects. *Electrophoresis.*, 34(13):1852-1862.
16. **Gasser RB, Hu M, Chilton NB, et al. (2006).** Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nat Protoc.*, 1(6):3121-3128.
17. **Gasser RB (2006).** Molecular tools-advances, opportunities and prospects. *Vet Parasitol.*, 136(2):69-89.
18. **Gasser RB (2013).** A perfect time to harness advanced molecular technologies to explore the fundamental biology of *Toxocara* species. *Vet Parasitol.*, 193(4):353-364.
19. **Hashim HO, Al-Shuhaib MBS (2019).** Exploring the potential and limitations of PZR-RFLP and PZR-SSCP for SNP detection: A review. *J Appl Biotechnol Rep.*, 6(4):137-144.
20. **Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980).** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.*, 32(2):314-331.
21. **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(3):329-334.
22. **Oudni-M'rad M, Cabaret J, M'rad S, et al. (2006).** Genetic differences between Tunisian camel and sheep strains of the cestode *Echinococcus granulosus* revealed by SSCP. *Parasite.*, 13(2):131-136.