

KİST HİDATİK TANISINDA KULLANILAN MOLEKÜLER YÖNTEMLER

13. BÖLÜM

Ahmet YILMAZ¹

Giriş

Hidatik kist olarak da bilinen Kistik ekinekokozis (KE), *Echinococcus granulosus* metasesstodlarının insanlarda neden olduğu zoonotik bir enfeksiyondur^(1, 2). *E. granulosus*'un bugüne kadar tanımlanmış on suşu bulunmaktadır (G1-G10). Bu alanda yapılan son çalışmalara göre, G9 (insan suşu) olarak tanımlanmaktadır⁽³⁾. Parazitlerin rutin laboratuvar tanısında çoğunlukla optik mikroskop gibi geleneksel yöntemler kullanılmaktadır^(4, 5). Özellikle son 25 yılda moleküler biyoloji ve biyoteknoloji gibi bilimlerde yaşanan gelişmeler sağlık ve temel yaşam bilimlerinde önemli değişikliklere yol açmıştır⁽⁶⁾. Parazitolojide parazitlerin teşhisi ve tanımlanması biyoteknolojik gelişmelerden önce parazitlerin morfolojik yapılarına, patolojik etkilerine, konak spesifitesine ve coğrafik orijinine göre yapılmaktaydı fakat bunlar çoğu zaman yetersiz kalmaktaydı. Moleküler parazitolojide kullanılan nükleik asit temelli teknikler özgüllüğü ve duyarlılığı arttırarak bu alanda kullanılan yeni ve daha iyi tanı araçları olmuştur⁽⁷⁾. Endemik bölgelerde kontrol ve eradikasyon programlarının başlaması ve başarıya ulaşabilmesi için çalışma yapılan bölgelerde baskın özellikte suş veya suşların belirlenmesi önem taşımaktadır. Günümüzde farklı suşların ayırımında morfolojik ve biyolojik kriterler değerlendirmeye

katılsa da suşların kesin olarak ayırt edilmesinde moleküler yöntemler yerini gittikçe sağlamlaştırmaktadır^(8, 9).

Polimeraz zincir reaksiyon tekniğinin (PZR) ortaya çıkışı, *Echinococcus* türlerine ait yumurtaların ayırt edilmesi de dâhil olmak üzere *Echinococcus* tanımlama amaçları için sahada yaygın olarak kullanımıyla hassas bir yaklaşım sağlamıştır⁽¹⁰⁾.

Moleküler Yöntemler

Moleküler teknikler, tanı ve teşhisten daha çok, elde edilen kist örneklerinde tür ve suş düzeyinde ayırım yapılabilme imkânını sağlamakta olup, bu gayeyle günümüzde kullanılan birçok yöntem bulunmaktadır^(11,12). Farklı amaçlarla gerçekleştirilen bilimsel araştırmalarda çok büyük katkı sağlayan moleküler tanımlama yöntemlerine her geçen gün yenileri eklenmektedir. Dünyada kullanılan bu yöntemlerin yaygınlığını etkileyen başlıca unsurlar maliyet ve yetkin personel ihtiyacı olsa da her yöntemin kendisine özgü avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Türkiye'de son zamanlarda moleküler tanı yöntemlerinin kullanıldığı bilimsel çalışmalar ivme kazanmıştır⁽¹³⁾.

Günümüzde PZR, RFLP, PZR-RFLP, RAPD-PZR, SSCP, DNA dizileme ve ddF gibi çok sayıda mole-

¹ Dr Öğr Üyesi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu/ Tıbbi Laboratuvar Bölümü/ Erzurum, aymet25@hotmail.com

DNA parçalarının büyüklüğü, elektroforez ısısı, pH ve kullanılan tampon gibi birçok parametreden etkilenebilir. Bu yöntemin en önemli avantajlarından biri çok sayıda PZR örneğinin aynı zamanda incelenmesine imkân sağlamasıdır^(15, 47). Bu yöntemden yararlanılarak polimorfizmin çok olduğu gen bölgeleri belirlenebilmekte, intraspesifik varyasyonların ortaya çıkarılması gerçekleştirilmektedir⁽⁴⁸⁾.

Bu yöntemden yararlanılarak yapılan araştırmalarda; *Echinococcus* cinsi içerisinde yer alan farklı suşların kolaylıkla belirlenebileceği bildirilmiş ve *E. granulosus*'a ait farklı suşların gösterdiği SSCP şekillerine göre DNA dizi analizinden önce tanıma özelliğinden yararlanılarak *Echinococcus* izolatlarının rutin laboratuvar tanısında kullanılabileceği bildirilmiştir^(14, 15, 49).

Dideoxy Fingerprinting (ddF)

Nükleik asitlerin jel elektroforezi esnasında kazanmış olduğu özelliklerin incelendiği ve PZR ile amplifiye edilen DNA segmentlerindeki sekans farklılıklarının saptanmasında oldukça etkili bir yöntemdir. Bu yöntem, Sanger sekanslama ve SSCP tekniklerinin kombinasyonudur. Bu yöntemle 150-250 bp sekans uzunluğuna sahip fragmentlerdeki tek bir mutasyon bile %100 oranında tespit edilebilmektedir⁽⁴⁸⁾. Bu yöntemden yararlanılarak *Echinococcus* cinsinde yer alan 7 farklı genotipin (G1, G4, G6, G8, M2, O ve V) ayırt edilebileceği, yine bu yöntemle DNA dizi analizine ihtiyaç duymaksızın *Echinococcus* ve diğer parazitlerin tiplendirilebileceği bildirilmiştir^(14, 50).

Sonuç

Moleküler yöntemlerde son zamanlarda yaşanan gelişmeler, hiç kuşkusuz Kist hidatik hastalığı etkeni *Echinococcus*'un tanısı ve genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde parazitoloji alanında bilim adamlarına yeni imkânlar sunmuştur. Bu yöntemlerden hangisinin kullanılacağı araştırmacının hedeflerine ve çalışma yapacağı laboratuvar şartları ve imkânlarına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir.

Kaynaklar

1. Chaya D, Parija SC. Performance of polymerase chain reaction for the diagnosis of cystic echinococcosis using serum, urine, and cyst fluid samples. *Tropical parasitology*. 2014;4:43.
2. Yılmaz A, Uslu H, Aktaş F. 2009-2013 yılları arasında Erzurum Bölge Hastanesindeki kistik ekinokokkozis şüpheli hastaların İndirekt Hemaglutinasyon (İHA) metoduyla değerlendirilmesi. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2016;5:23-32.
3. Nakao M, Lavikainen A, Yanagida T, et al. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *International Journal for Parasitology*. 2013;43:1017-1029.
4. Adnan A, Yaman T, Keleş ÖF, et al. Examination of some endoparasites prevalence in Romanov sheep imported from Ukraine. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2019;8:99-103.
5. Kompalic-Cristo A, Britto C, Fernandes O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. *J Bras Patol Med Lab*. 2005;41:229-35.
6. Van Pelt-Verkuil, E., Van Leeuwen, W., & te Witt, R. (2019). *Molecular Diagnostics*. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd.
7. McPherson, M., & Moller, S. (2000). *The basics from background to bench: PCR* (First Edition ed.). Bios Scientific Publishers LTD, Oxford, UK: Springer-Verlag Telos.
8. De La Rue M, Dinkel A, Mackenstedt U, et al. New data on *Echinococcus* spp. Southern Brazil *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2006;48:103-104.
9. Erdoğan E, Özkan B, Mutlu F, et al. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* isolates obtained from different hosts. *Mikrobiyol Bul*. 2017;51:79-86.
10. Siles-Lucas M, Gottstein B. Molecular tools for the diagnosis of cystic and alveolar echinococcosis. *Trop Med Int Health*. 2001;6:463-475.
11. Ütük A, Şimşek S, Köroğlu E. *Echinococcus* cinsinin moleküler genetik karakterizasyonu. *Türkiye Parazitol Derg*. 2005;29:171-176.
12. Boufana BS, Campos-Ponce M, Naidich A, et al. Evaluation of three PCR assays for the identification of the sheep strain (genotype 1) of *Echinococcus granulosus* in canid feces and parasite tissues. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78:777-783.
13. Çetinkaya E, Ayhan K. Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler. *Karaelmas Science and Engineering Journal*. 2012;2:53-62.
14. Ütük A. *Echinococcus granulosus*' un Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesi izolatlarının moleküler ayrımı [doktora]. Sağlık Bilimleri Enstitüsü: Firat Üniversitesi; 2008.
15. Altıntaş N, Yolasiğmaz A, Kilimcioğlu A, et al

- (2009). *Echinococcus granulosus*'da moleküler biyolojik yapı ve çalışmalar. M.A. Özcel, M. Tan-yüksel, H. Eren (Ed.) *Moleküler parazitoloji* içinde (s.593-630). İzmir: Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri.
16. Kamenetzky L, Gutierrez AM, Canova SG, et al. Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infection, Genetics and Evolution*. 2002;2:129-136.
 17. McManus D, Rishi A. Genetic heterogeneity within *Echinococcus granulosus*: isolates from different hosts and geographical areas characterized with DNA probes. *Parasitology*. 1989;99:17-29.
 18. Örsten S. İnsan kaynaklı kistik ekinokokkozis' in moleküler epidemiyolojisi [Doktora]. Sağlık Bilimleri Enstitüsü: Hacettepe Üniversitesi; 2017.
 19. Christofi G, Deplazes P, Christofi N, et al. Screening of dogs for *Echinococcus granulosus* copro-antigen in a low endemic situation in Cyprus. *Veterinary Parasitology*. 2002;104:299-306.
 20. Rodriguez J. Detection of animal pathogens by using the polymerase chain reaction (PCR). *The Veterinary Journal*. 1997;153:287-305.
 21. Somma M, Querci M. Gıda örneklerinde genetiği değiştirilmiş organizma analizleri. *World Health Organisation, Regional Health For Europe*; 2010.
 22. Türkyılmaz S, Esendal M. Polimeraz zincir reaksiyonu ve mikrobiyolojide kullanım alanları. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*. 2002;8:71-6.
 23. Ayan, A. (2019). Parazitolojide kullanılan moleküler teşhis yöntemleri. Atilla Atik (Ed.), *Sağlık bilimleri alanında yeni ufuklar içinde* (S. 11-24). Ankara: Gece Akademi.
 24. Gasser RB. Molecular tools—advances, opportunities and prospects. *Vet Parasitol*. 2006;136:69-89.
 25. Özyalın Ö. Kist hidatikli vakalardan elde edilen izolatlarda *Echinococcus granulosus*'un moleküler karakterizasyonu [Doktora]. Sağlık Bilimleri Enstitüsü: Malatya İnönü Üniversitesi; 2019.
 26. Dinkel A, Njoroge EM, Zimmermann A, et al. A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus*-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa. *Int J Parasitol*. 2004;34:645-653.
 27. Kurt A, Avcioglu H, Guven E, et al. Molecular Characterization of *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus granulosus* from Cysts and formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples of human isolates in Northeastern Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2020.
 28. Wen H, Vuitton L, Tuxun T, et al. *Echinococcosis*: advances in the 21st century. *Clinical microbiology reviews*. 2019;32:e00075-18.
 29. Kartal K. Afyonkarahisar'da sığır, manda, koyun ve keçilerde bulunan *Echinococcus granulosus* izolatlarının moleküler karakterizasyonu [Doktora]. Sağlık Bilimleri Enstitüsü: Afyon Kocatepe Üniversitesi; 2014.
 30. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2002;16:47-51.
 31. Kolören Z, Elif Ç, Emine A, et al. RFLP yönteminin parazitolojide uygulama alanları. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*. 2017;7:215-225.
 32. Xue H, Chen W, Qiu L, et al. 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= Chinese journal of parasitology & parasitic diseases*. 1993;11:201-203.
 33. McManus DP, Ding Z, Bowles J. A molecular genetic survey indicates the presence of a single, homogeneous strain of *Echinococcus granulosus* in north-western China. *Acta Tropica*. 1994;56:7-14.
 34. Kartal K, Köse M, Erdoğan M. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* isolates found in cattle, buffaloes, sheep and goats in Afyonkarahisar, Turkey. *Kocatepe Veteriner Dergisi*. 2020;13:152-160.
 35. Aydın-Öz S. RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) belirleyicileri ve bitki sistematiği. *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 2004;6:113-130.
 36. Mwambete KD, Ponce-Gordo F, Cuesta-Bandera C. Genetic identification and host range of the Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Acta Tropica*. 2004;91:87-93.
 37. Ütük A, Şimşek S, Köroğlu E. *Echinococcus granulosus*' un koyun suşunun (G1) RAPD-PCR ve DNA dizi analizi ile tanısı. 3. Ulusal Hidatidoloji Kongresi, 2006, Samsun, 06-9.
 38. Siles-Lucas M, Felleisen R, Cuesta-Bandera C, et al. Comparative genetic analysis of Swiss and Spanish isolates of *Echinococcus granulosus* by southern hybridization and Random Amplified Polymorphic DNA technique. *Applied Parasitology*. 1994;35:107-117.
 39. Moro PL, Nakao M, Ito A, et al. Molecular identification of *Echinococcus* isolates from Peru. *Parasitology International*. 2009;58:184-186.
 40. Šnáběl V, Altintas N, D'amelio S, et al. Cystic echinococcosis in Turkey: genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country. *Parasitology Research*. 2009;105:145.
 41. Butler, J. M. (2005). *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers* (Second edit). Tokyo: Elsevier Academic Press.
 42. Sürmen ES. Türkiye yerli keçi ırklarında mikrosa-

tellit DNA polimorfizm tekniğinin kullanılması ile ebeveyn tayini [Yüksek Lisans Tezi]. Fen Bilimleri Enstitüsü: Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi; 2018.

43. Gadgil R, Barthelemy J, Lewis T, et al. Replication stalling and DNA microsatellite instability. *Biophysical chemistry*. 2017;225:38-48.
44. Karanlı T, Karabağ K, Şahin E. DNA İşaretleyici Yöntemleri ve Hayvancılıkta Kullanımı. II. Ulusal Zooteknik Öğrenci Kongresi, 2006. Adana, p. 25-26.
45. Leung K, Yip S. Molecular biomethods handbook. In: Walker J, Rapley R, editors. Single strand conformation polymorphism. New Jersey: Humana Press; 2008. p. 117-131.
46. Sunnucks P, Wilson A, Beheregaray LB, et al. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular ecology*. 2000;9:1699-1710.
47. Gasser RB. Mutation scanning methods for the analysis of parasite genes. *International Journal for Parasitology*. 1997;27:1449-1463.
48. Erdoğan E. Farklı konaklardan elde edilen *Echinococcus granulosus* izolatlarının moleküler karakterizasyonu [Yüksek Lisans]. Sağlık Bilimleri Enstitüsü: Kayseri Erciyes Üniversitesi; 2015.
49. Yolasıgımaz A, Turčeková L, Türk M, et al. editors. Genetic variation in *Echinococcus granulosus* from Turkey and Slovakia demonstrated by sequence and SSCP analysis. XXist International Congress of Hydatidology; 2004; Nairobi, Kenya.
50. Gasser RB, Zhu X, McManus DP. Dideoxy fingerprinting: application to the genotyping of *Echinococcus*. *International journal for parasitology*. 1998;28:1775-1779.