

# Farklı Konaklardan Elde Edilen *Echinococcus granulosus* İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu

## Molecular Characterization of *Echinococcus granulosus* Isolates Obtained From Different Hosts

Emrah ERDOĞAN<sup>1</sup>, Bora ÖZKAN<sup>2</sup>, Fatih MUTLU<sup>3</sup>, Serkan KARACA<sup>1</sup>, İzzet ŞAHİN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

<sup>1</sup> Erciyes University Medical Faculty, Department of Medical Parasitology, Kayseri, Turkey.

<sup>2</sup> Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay.

<sup>2</sup> Mustafa Kemal University Medical Faculty, Department of Medical Parasitology, Hatay, Turkey.

<sup>3</sup> Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Aydın.

<sup>3</sup> Adnan Menderes University Medical Faculty, General Surgery Department, Aydın, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 16.06.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 11.01.2017

### ÖZ

*Echinococcus granulosus* dünya genelinde görülebilen bir parazittir. Bugüne kadar *Echinococcus* cinsinin insanda parazitlendiği belirlenen beş türü tanımlanmıştır: *E.granulosus*, *E.multilocularis*, *E.vogeli* ve *E.oligarthrus*, *E.shiquicus*. Parazitin larval (metasestod) formu; tırnaklı hayvanlar (sığır, keçi, domuz, at, koyun vs.) ve insanın iç organlarında yerleşirken; erişkin formu son konak köpekgillerinin ince bağırsağında bulunur. Parazitin neden olduğu "kistik ekinokokkozis (KE)" yurdumuzun da içinde bulunduğu hayvancılığın yaygın olduğu birçok ülkede önemli sağlık sorunları oluşturmakta ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ara konaklar enfektif yumurtaları oral yolla ve nadiren de olsa solunum yoluyla alarak enfeksiyona yakalanırlar. Alınan yumurtalar ara konakların mide ve ince bağırsaklarında açılarak onkosferin serbest kalmasına neden olur. Onkosfer çengelleri ve histolitik enzimleri ile süratle villus epitelinde lamina propriyaya ulaşmaktadır. Buradan venüllere geçerek genellikle karaciğer ve akciğerlere, daha az sıklıkla da kas, beyin, dalak, böbrek ve diğer organlara taşınır. Yapılan moleküler çalışmalarda taksonomik olarak doğrulanmış beş türün yanında; *E.granulosus* türünün varyasyonları veya suşları denilen 10 farklı suş tanımlanmıştır. Suşlar arasındaki ara konak farklılıkları ve gelişimsel farklılıklar parazitle mücadeleyi ve kontrol çalışmalarını olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu çalışmada, Türkiye'de farklı bölgelerden ve farklı ara konaklardan elde edilen hidatik kist materyallerinden moleküler yöntemlerle *E.granulosus* suş tayini yapılması amaçlanmıştır. Çalışmada, 25 insan, 8 sığır, 6 koyun ve 2 keçiden elde edilen kist materyali incelemeye alınmıştır. Hidatik kist sıvısındaki protoskoleklerden total genomik DNA izolasyonu yapılmış

**İletişim (Correspondence):** Arş. Gör. Emrah Erdoğan, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Melikgazi 38039, Kayseri, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 352 207 6666, **E-posta (E-mail):** emrah@erciyes.edu.tr

olup COX-1(L) ve COX-1(S) primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizi yapılmıştır. PCR ürünlerinin her birine DNA dizi analizi yaptırılmıştır. DNA dizi analiz sonuçları, BLAST analizi ve MEGA program ile filogenetik analiz yapılarak değerlendirilmiştir. DNA dizi analizi sonucunda bu çalışmaya dahil edilen tüm izolatların *E.granulosus sensu stricto* (G1) olduğu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz verilerin; KE'nin ülkemiz için önemli bir halk sağlığı sorunu olması sebebiyle; parazitin kontrolü, etkin teşhis ve tedavi teknikleri, eradikasyon, aşı ve ilaç geliştirme çalışmalarına önemli kaynak teşkil edeceği kanısındayız. Ülke genelinde etkin ve başarılı kontrol programlarının yapılabilmesi için benzer çalışmaların tüm bölgeleri kapsayacak şekilde planlanması yararlı olacaktır.

**Anahtar sözcükler:** Kistik ekinokokkozis; *Echinococcus granulosus*; suş; moleküler karakterizasyon.

## ABSTRACT

*Echinococcus granulosus* is a parasite that can be seen throughout the world. So far, five species of genus *Echinococcus* have been identified as parasite in people: *E.granulosus*, *E.multilocularis*, *E.vogeli*, *E.oligarthus*, *E.shiquicus*. Larval (metacestod) form of parasite settles in internal organs of hoofed animals (cattle, goats, pigs, horses, sheep, etc.) and human; the adult form is found in small intestine of final host, canine. Disease caused by parasite called as "Cystic echinococcosis" (CE) is an important health problem and causes economic losses in many countries including our country that livestock is common. Infective eggs cause infections in intermediate hosts by taking oral way and rarely inhalation. Received egg opens in the stomach and intestines of intermediate host and oncosphere is released. Oncosphere quickly reaches the lamina propria of the villus epithelium by its histolytic enzymes and hooks. It usually transported from here to the liver and lungs, less frequently, muscle, brain, spleen, kidney and to other organs through the veins. By molecular studies, five species have been validated taxonomically and 10 different variants or strains of *E.granulosus* have been identified. Host and developmental differences between strains may negatively affect control studies and fight against the parasite. This study aimed to determinate *E.granulosus* strains obtained from cyst material of different intermediate hosts from different regions of Turkey by molecular methods. In the study, 25 human, 8 cattle, 6 sheep and 2 goat cysts material has been collected. Total genomic DNA was isolated from protoscolexes in cyst fluid and analyzed by PCR with COX-1 (L) and COX-1 (S) genes specific primers. DNA sequence analysis for each PCR product has been made. DNA sequence analysis results evaluated phylogenetically by MEGA analyze and BLAST software. As a result of this study, all isolates were identified as *E.granulosus sensu stricto* (G1) by DNA sequence analysis. CE is a major public health problem for our country so we believe that obtained data from this study is an important source for parasite control, effective diagnosis, treatment techniques, eradication, vaccination and drug development. Similar studies will be beneficial to cover all other regions of Turkey and to develop effective and successful control programs.

**Keywords:** Cystic echinococcosis; *Echinococcus granulosus*; strains; molecular characterization.

## GİRİŞ

Ekinokokkozis, *Echinococcus* türlerinin sebep olduğu bir hastalıktır. *Echinococcus granulosus* dünya genelinde görülebilmektedir. Parazitin neden olduğu kistik ekinokokkozis (KE) yurdumuzun da içinde bulunduğu hayvancılığın yaygın olduğu birçok ülkede önemli sağlık sorunlarından biridir ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır<sup>1</sup>. Parazitin metasestod (larval) dönemi; keçi, sığır, at, domuz, koyun ve insanın iç organlarında yerleşirken; erişkin dönemi son konak köpekçillerin ince bağırsağında yerleşir. Larval form, ara konaklarda ekinokokkozise sebep olmaktadır<sup>2-5</sup>.

Enfektif yumurta içeren kesin konak dışısının toprağa atılması ve bu yumurtaların ağız yoluyla alınması sonucunda ara konaklarda enfeksiyon başlar. Yumurtalar kontamine çiğ sebze, meyve gibi bitkilerin yenmesi ile alınabildiği gibi kontamine suların içilmesi de enfeksiyon için önemli kaynaklardır. Son konaklar için en önemli kaynak enfekte koyun içorganlarıdır<sup>2,3,6</sup>. Kistik ekinokokkoziste klinik belirtiler kistin boyutu, konumu ve durumuna göre değişebilmektedir. Enfeksiyon başlangıcı ile klinik belirti vermesi arasındaki süre genellikle birkaç yılı bulabilir. Oluşan kistlerin ortalama %60'ı karaciğer, %25'i akciğer lokalizasyonludur. Hastaların %20'sinde birden fazla bölgede tutulum vardır. Kistlerin rüptüre olma ihtimali vardır ve rüptüre olduğunda; ateş, pruritus, ürtiker, anafilaktik şok ve ölüm gözlenebilir. Bakterilerin kiste girmesi sonucu kiste piyojenik apse gelişebilir<sup>7-9</sup>. Tanı; klinik bulgular yanında görüntüleme teknikleri, serolojik ve moleküler yöntemlerle elde edilen verilerin değerlendirilmesi ile yapılmaktadır<sup>7,9</sup>.

*E.granulosus*'un günümüze kadar tanımlanmış on suşu bulunmaktadır. Suşlar arasındaki ara konak farklılıkları ve gelişimsel farklılıklar parazitle mücadeleyi ve kontrol çalışmalarını olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Son yapılan çalışmalara göre, bu suşlardan *E.granulosus sensu stricto* (G1= evcil koyun suşu), G2 (Tazmanya koyun suşu) ve G3 (manda suşu), *Echinococcus equinus* (G4= at suşu), *Echinococcus ortleppi* (G5= sığır suşu), G6 (deve suşu), G7 (domuz suşu), G8-G10 (geyik suşu) ve G9 (insan suşu) olarak sınıflandırılmaktadır<sup>10</sup>.

Bu çalışmada; Türkiye'de farklı bölgelerden ve farklı ara konaklardan elde edilen hidatik kist materyalleri moleküler yöntemlerle incelenerek *E.granulosus*'un mitokondriyal Cox-1 (S ve L) gen bölgelerine göre moleküler karakterizasyonu amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Örneklerin Toplanması

01.05.2013 ile 31.08.2014 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Sağlık Bakanlığı Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde KE tanısı ile opere edilen hastaların parazitolojik inceleme için gönderilen hidatik kist materyalleri çalışmaya alındı. Aynı zamanda Kayseri'de faaliyet gösteren bazı kesimhanelerde ve Bitlis ili Tatvan ilçesinde kesimi yapılan kasaplık hayvanların (iki koyun) hidatik kist materyalleri de çalışmaya dahil edildi. Toplamda; 25 insan, 8 sığır, 6 koyun ve 2 keçiden elde edilen kist materyali incelemeye alındı.

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 06.11.2012 tarihli ve 2012/630 karar no'su ile onaylanmıştır.

### DNA İzolasyonu

Hidatik kist sıvısındaki protoskolekslerden total genomik DNA izolasyonu Qiagen genomic DNA purification kiti (QIAGEN, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için öncelikle kist sıvıları her bir örnek için 18000 rpm de santrifüj edildi. DNA izolasyonunun geriye kalan aşamaları kit prosedürüne uygun bir şekilde tamamlanarak genomik DNA'lar elde edildi. Genomik DNA'lar çalışmada kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

## Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Total genomik DNA'lardan aşağıdaki primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile PCR ürünü elde edildi (Tablo I).

Toplam 50µl'lik hacimde hazırlanan PCR karışımına 25 µl 2X Taq PCR master miks (BIOMATİK, Kanada), COX-1 (L) F ve COX-1 (L) R primerlerinin her birinden 20 pmol ve 1 µl, DNA'dan ise 1 µl olacak şekilde ilave edildi. PCR amplifikasyonunda 94°C'de 10 dakika başlangıç denatürasyonunu takiben, toplam 35 döngü 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 52°C'de 45 saniye primer birleşmesi, 72°C'de bir dakika sentez olarak gerçekleştirildi. Son döngüyü takiben 72°C'de 7 dakika son uzama işlemi yapıldı. COX-1 (S) F ve COX-1 (S) R primerlerinin kullanıldığı diğer PCR reaksiyonunda toplam yine 50 µl olacak şekilde örnekler hazırlandı. PCR amplifikasyonunda 95°C'de 10 dakika ön denatürasyon aşamasını takiben, toplam 35 PCR siklusu 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 52°C'de 40 saniye primer birleşmesi, 72°C'de 45 saniye sentez olarak gerçekleştirildi. Son siklusu takiben 72°C'de 7 dakika son uzama işlemi yapıldı.

PCR ürünleri %1.5'luk etidyum bromürle boyanmış agaroz jelde yürütüldü ve GelLogic 212 Pro Jel görüntüleme cihazında (Carestream, ABD) görüntülendi.

## DNA Dizi Analizi

PCR ürünlerinin her birine DNA dizi analizi hizmet satın alma kapsamında "BM Laboratuvar Sistemleri" firmasına yaptırılmıştır. DNA dizi analiz sonuçları, BLAST analizi ve MEGA program ile filogenetik analiz yapılarak değerlendirilmiştir.

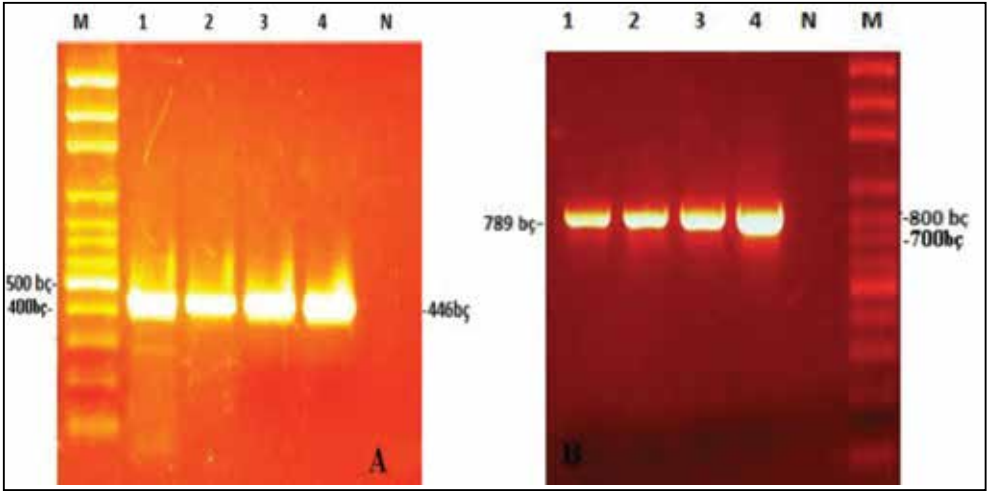
## BULGULAR

Bu çalışmada; Türkiye'de farklı konaklardan elde edilen *E.granulosus* izolatları kullanılmıştır. Hidatik kistlerdeki protoskolekslerden total genomik DNA, genomik DNA'lardan ise PCR ile 789 bp büyüklüğünde Cox-1 (L) ve 446 baz çifti (bp) büyüklüğünde Cox-1 (S) PCR ürünleri elde edilmiştir (Şekil 1).

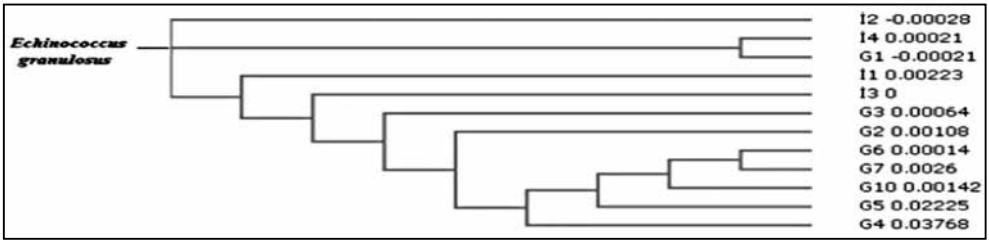
PCR ürünlerinden elde edilen DNA dizileri 789 ve 446 nükleotitden oluşan mitokondriyal COX-1 geninin uzun (L) ve kısa (S) kısmi dizilerini içermektedir. Bu dizilerin BLAST analizi sonucunda referans suşlarla benzerlikleri Şekil 2 ve Şekil 3'te gösterilmiştir.

**Tablo I.** *Echinococcus granulosus* İzolatlarının PCR Analizinde ve Tiplendirilmesinde Kullanılan Primerler

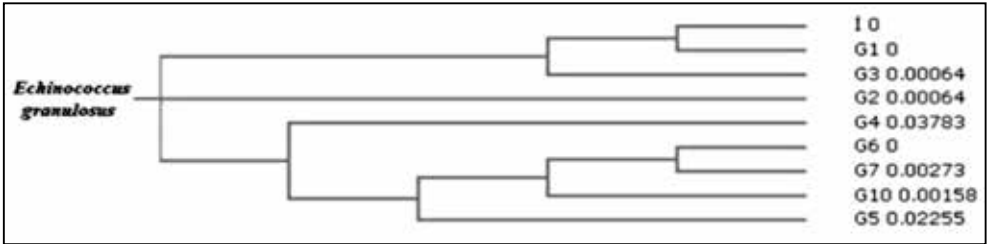
Primer	Gen bölgesi	Nükleotit dizisi
COX-1 (L)-F	COX-1	(5'-TTGAATTTGCCACGTTTGAATGC 3')
COX-1 (L)-R	COX-1	(5'-GAACCTAACGACATAACATAATGA-3')
COX-1 (S)-F	COX-1	(5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3')
COX-1 (S)-R	COX-1	(5'-TAAAGAAAG AC ATAATGAAAATG -3')



**Şekil 1.** *E. granulosus* PCR ürünlerinin %1.5'lik etidyum bromürle boyanmış agaroz jeldeki görüntüsü, (A) Cox1 (S) PCR ürünleri. M: 100 bp DNA ladder (BIOMATİK), 1-4: Pozitif örnekler, N: Negatif kontrol. (B) Cox1 (L) PCR ürünleri. M: 100 bp DNA ladder (BIOMATİK) 1-4: Pozitif örnekler, N: Negatif kontrol.



**Şekil 2.** Çalışmada elde edilen izolatların ve referans dizilerin COX-1 (S) gen bölgelerinin Neighbour-Joining filogenetik ilişkisi.



**Şekil 3.** Çalışmada elde edilen izolatların ve referans dizilerin COX-1 (L) gen bölgelerinin Neighbour-Joining filogenetik ilişkisi.

Elde edilen verilerin BLAST search ile Genbank'a daha önce girilmiş sonuçlarla karşılaştırılması sonucunda; Kayseri ve Bitlis (iki koyun izolatı) illerinden toplanan ve bu çalışmaya dahil edilen insan, sığır, koyun ve keçi izolatlarının hepsinin *E. granulosus sensu stricto* (G1) olduğu belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen izolatlarımız ile referans izolatların Genbank numaraları Tablo II'de gösterilmiştir.

**Tablo II.** Çalışmada Kullanılan Referans Dizilerin ve Örnek İzolatın Genbankası Numaraları

Genotip	GenBank accession no
G1	U50464
G2	M84662
G3	M84663
G4	M84664
G5	M84665
G6	M84666
G7	M84667
G10	AF525457
Erc	KT345956

## TARTIŞMA

*E. granulosus*'un neden olduğu kistik ekinokokkozis, dünya genelinde yaygın ve önemli bir helmintozoonozdur. Hastalık insanlarda ciddi semptomlar oluşturmakla beraber bazen ölümcül olabilirken, ara konakların çeşitliliği düşünüldüğünde özellikle hayvanlarda çeşitli organ ve dokularda yapısal ve fonksiyonel bozukluklara sebep olmaktadır. Parazitin larval döneminin neden olduğu KE bu ara konaklarda ekonomik yönden de oldukça önemlidir<sup>11</sup>.

*E. granulosus*'un sığır, koyun, keçi, geyik, deve, manda, tavşan, kanguru, domuz, at, eşek ve rastlantısal olarak da insan gibi çok sayıda memeli ara konağı vardır. Parazitin bu konaklarda bulunan farklı suşlarının etki dereceleri kendini; parazitin hayat döngüsü, konak özgülüğü, patojenitesi, hastalığın epidemiyolojisi, antijenitesi, bulaşma yolları, kontrol ve eradikasyon çalışmalarında göstermektedir. Özellikle endemik bölgelerde etkili kontrol ve eradikasyon çalışmalarının başlayabilmesi için bu bölgelerdeki baskın suş veya suşların belirlenmesi gerekmektedir. Günümüzde suşların ayırt edilmesinde çeşitli biyolojik ve morfolojik kriterler dikkate alınmakla beraber kesin çizgilerle birbirlerinden ayrılmaları noktasında moleküler yöntemlerin önemi de hızla artmaktadır<sup>12,13</sup>.

İtalya'nın güneyinde mandalardan elde edilen 48 izolatın COX-1 gen bölgelerinin incelendiği bir çalışmada; 33 örnek G1, 15 örnek ise G3 suşu olarak bildirilmiştir<sup>14</sup>. Libya'nın Benghazi bölgesinden toplanan 12 sığır, 10 koyun, 5 deve ve 3 insan izolatının COX-1 geninin incelenmesi sonucunda tamamının G1 suşu olduğu bildirilmiştir<sup>15</sup>. Bulgaristan'da *E. granulosus*'un koyun, sığır, domuz, kurt ve çakal izolatlarının nükleer ve mitokondriyal gen dizilerinin incelendiği başka bir çalışmada izolatların hepsinin G1 suşu olduğu bildirilmiştir<sup>16</sup>. Hindistan'da 6 manda, 5 koyun ve 1 sığır izolatının ITS-1, COX-1 ve NAD1 gen bölgeleri incelenmiş; NAD1 dizilerinin incelenmesi sonucunda izolatların tamamının G1 suşu olduğu, ancak COX-1 dizilerinin incelenmesi ile 2 koyun ve 1 manda izolatının G2 suşuna ait olduğu bildirilmiştir<sup>17</sup>. Çin'in Uygur özerk bölgesinde insan izolatları üzerinde yapılan bir çalışmada; 67 hidatik kist materyalinin mitokondriyal COX-1

gen bölgesinin dizilenmesi sonucunda 45 hastanın G1, 2 hastanın da G6 suşu ile enfekte olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, G1 suşu ile enfekte bir köpekte bulunan erişkin parazitlerden bazılarının G6 suşuna ait olduğu ve sonuç olarak *E.granulosus*'un farklı suşlarının neden olduğu miks enfeksiyonların olabileceği ifade edilmiştir<sup>18</sup>.

Siirt, Ardahan, Afyon, Erzurum, Tekirdağ, Yozgat ve Kars şehirlerinden alınan, 12 sığır ve 100 koyun kist materyali örneklerinden yapılan bir çalışmada; *E.granulosus* izolatlarının COX-1 gen bölgeleri çalışılmıştır. İzolatların 5'i G3, 107'si G1 olarak bildirilmiştir. Ülkemizde ilk kez bir Anadolu yaban koyunundan (*Ovis gmelinii anatolica*) elde edilen kist materyalinin çalışılması neticesinde izolatın G1 suşu olduğu bildirilmiştir<sup>19</sup>. Manisa, İzmir, Uşak ve Denizli illerinden toplanan 10 insan ve 12 koyun izolatının farklı gen bölümlerinin incelenmesi sonucunda; bir koyun izolatının G3, iki koyun izolatı ve bir insan izolatının G7, bir koyun izolatının G1 ve G3 referans dizileri arasında bir diziye sahip olduğu, diğer izolatların ise G1 suşu olduğu ifade edilmiştir<sup>20</sup>.

Sonuç olarak; çalışmamızda çeşitli ara konaklardan elde edilen hidatik kist materyalleri PCR ve DNA dizi analizleri ile incelenerek Kayseri ve çevresindeki genotip çeşitliliği araştırılmıştır. Çalışmanın sonucuna göre; bölgemizden elde edilen izolatlar ve Tatvan ilçesinden gelen iki izolatın genotipinin evcil koyun suşu olduğu (*E.granulosus sensu stricto*) belirlenmiştir. KE'nin ülkemiz için önemli bir halk sağlığı sorunu olduğu da göz önünde bulundurulduğunda: elde ettiğimiz verilerin; parazitin kontrolü, etkin tanı ve tedavi teknikleri, eradikasyon, aşı ve ilaç geliştirme çalışmalarına önemli kaynak teşkil edeceği kanısındayız. Ülke genelinde etkin ve başarılı kontrol programlarının yapılabilmesi için benzer çalışmaların tüm bölgeleri kapsayacak şekilde artırılması yararlı olacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Kilimcioglu AA. Kistik echinococcosis, pp: 541-66. In: Özcel MA (Ed), Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları'nda. 2007, Türkiye Parazitoloji Derneği, İzmir.
2. Soulsby E. Helminths, arthropods and of domesticated animals, pp: 92-136. Bailliere Tindall. 1986, 7<sup>th</sup> ed., London.
3. Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of Echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. Clin Microbiol Rev 2004;17:107-35.
4. Xiao N, Qiu J, Nakao M, et al. *Echinococcus shiquicus* sp., A taeniid cestode from Tibetan fox and plateaupika in China. Int J for Parasitol 2005; 35: 693-731.
5. Junying M, Hu W, Gonghua L, Fang Z, Chao L, Tongzuo Z, et al. Surveillance of *Echinococcus* isolates from Qinghai. China Vet Parasitol 2015; 207: 44-8.
6. Torgerson PR, Budke CM. Echinococcosis- an international public health challenge. Res Vet Sci 2003;74:191-202.
7. Plorde JJ. Cestodes, pp: 791-802. In: Ryan KJ, Ray CG (eds), Sherris medical microbiology an introduction to infectious diseases. 2004, 4<sup>th</sup> ed. McGraw Hill Co, New York.
8. Bostan H, Yücel AF, Şahin DA. Ameliyat sırasında oluşan şokun nadir bir sebebi: Karaciğer hidatik kist rüptürüne bağlı anafaksi. Olgu sunumu. J Surg Arts 2010; 1: 1-4.
9. King CH. Cestodes (Tapeworms). pp: 3285-93. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds). Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 2005, 6<sup>th</sup> ed. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia.
10. Nakao M, Lavikainen A, Yanagida T, Ito A. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). Int J Parasitol 2013; 43:1017-29.

11. McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. Echinococcosis. The Lancet 2003; 362: 1295-304.
12. De La Rue ML, Dinkel A, Mackenstedt U, Romig T. New data on *Echinococcus* spp. in southern Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo 2006; 48:103-4.
13. Bowles J, Blair D, McManus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. Mol Biochem Parasitol 1992; 54: 165-73.
14. Capuano F, Rinaldi L, Maurelli MP, et al. Cystic echinococcosis in water buffaloes: Epidemiological survey and molecular evidence of ovine (G1) and buffalo (G3) strains. Vet Parasitol 2006; 137: 262-8.
15. Tashani OA, Zhang LH, Boufana B, Jegi A, McManus DP. Epidemiology and strain characteristics of *Echinococcus granulosus* in the Benghazi Area of Eastern Libya. Ann Trop Med Parasitol 2002; 96: 369-81.
16. Breyer I, Georgieva D, Kurdova R, Gottstein B. *Echinococcus granulosus* strain typing in Bulgaria: The G1 genotype is predominant in intermediate and definitive wild hosts. Parasitol Res 2004; 93: 127-30.
17. Bhattacharya D, Bera AK, Bera BC, Maity A, Das SK. Genotypic characterisation of Indian cattle, buffalo and sheep isolates of *Echinococcus granulosus*. Vet Parasitol 2007; 143: 371-4.
18. Bart JM, Abdulkader M, Zhang YL, et al. Genotyping of human cystic echinococcosis in Xinjiang, PR China. Parasitol 2006; 133: 571-579.
19. Vural G, Unsal Baca A, Gauci CG, Bagci O, Gicik Y, Lightowlers MW. Variability in the *Echinococcus granulosus* cytochrome c oxidase 1 mitochondrial gene sequence from livestock in Turkey and a re-appraisal of the G1-3 genotype cluster. Vet Parasitol 2008; 154: 347-50.
20. Snabel 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. Parasitol Res 2009; 105: 145-54.