



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2024; 38 (1): 30 - 39
http://www.fusabil.org

Echinococcus granulosus sensu stricto İçindeki Genetik Varyasyonun Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz b (mt-cytb) Gen Sekansları Kullanılarak İn Silico Yöntemle Analiz Edilmesi

Şeyma GÜNYAKTI KILINÇ^{1, a}
Figen ÇELİK^{2, b}
Harun Kaya KESİK^{1, c}
Sami ŞİMŞEK^{2, d}

¹ Bingöl Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Parazitoloji Ana Bilim Dalı,
Bingöl, TÜRKİYE

² Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Parazitoloji Ana Bilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0001-8454-1901

^b ORCID: 0000-0002-2188-0196

^c ORCID: 0000-0002-8480-8597

^d ORCID: 0000-0002-3567-326X

Echinococcus granulosus sensu lato (s.l.), kistik ekinokokozise (KE) neden olan, yaşam döngüleri ve konak seçimleri açısından farklılıklar gösteren ve dünya çapında öneme sahip zoonotik bir tür kompleksidir. Bu çalışmada, dünyanın farklı yerlerinden GenBank'ta kayıt altına alınan *E. granulosus sensu stricto* (s.s.) izolatlarının mitokondriyal sitokrom oksidaz b (mt-cytb) dizilimi kullanılarak haplotip çeşitliliği, genetik varyasyonu ve popülasyon yapısı araştırılmıştır. Bu amaçla cytb genine ait 26 farklı lokasyondan ve 12 farklı konak türüne ait 418 gen dizisi analizlere dahil edildi. Cytb gen dizisinde 114 farklı noktada mutasyon gözlemlendi ve 102 haplotip tanımlandı. Tajima's D, Fu's Fs ve Fu's LD değerleri anlamlı ve yüksek negatif değerler gösterdi. Analiz edilen dizilerde haplotip farklılıkları olduğu ve oluşturulan alt popülasyonlar arasında genetik varyasyonun olduğu gösterildi. Bu çalışmanın, *E. granulosus* s.s.'nin dünya çapındaki epidemiyolojisi, coğrafi dağılımı ve cytb genine dayalı popülasyon yapısı hakkında büyük ölçekli çalışmalara temel teşkil edebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Echinococcus granulosus*, cytb, haplotip, genetik çeşitlilik

In Silico Analysis of Genetic Variation in *Echinococcus granulosus sensu stricto* using Mitochondrial Cytochrome Oxidase b (mt-cytb) Gene Sequences

Echinococcus granulosus sensu lato (s.l.) is a zoonotic species complex of worldwide importance that causes cystic echinococcosis (CE), differing in their life cycles and host selection. In this study, haplotype diversity, genetic variation, and population structure were investigated using the mitochondrial cytochrome oxidase b (mt-cytb) sequence of *E. granulosus sensu stricto* (s.s.) isolates submitted to GenBank from different parts of the world. For this purpose, 418 gene sequences belonging to the cytb gene from 26 different locations and 12 different host species were included in the analysis. Mutations were detected at 114 different points in the cytb gene sequence and 102 haplotypes were identified. Tajima's D, Fu's Fs and Fu's LD values showed significant and high negative values. It has been shown that there are haplotype differences and genetic variation among the created subpopulations in the sequences analyzed in the study. This study may serve as a basis for large-scale studies on the worldwide epidemiology, geographical distribution and cytb gene-based population structure of *E. granulosus* s.s.

Key Words: *Echinococcus granulosus*, cytb, haplotype, genetic variation

Giriş

Echinococcus granulosus sensu lato (s.l.), kistik ekinokokozise (KE) neden olan, yaşam döngüleri ve konak seçimleri açısından farklılıklar gösteren ve dünya çapında öneme sahip zoonotik bir tür kompleksidir (1). *Echinococcus granulosus*'un erişkinleri köpek, kurt, çakal gibi evcil ve yabani karnivorların ince bağırsaklarına yerleşirken, larvası olan hidatik kist ise koyun, keçi, sığır, domuz, insan ve diğer birçok evcil ve yabani memelilerin başta karaciğer ve akciğer olmak üzere çeşitli organ ve dokularına yerleşmektedir (2). Bu tür kompleksindeki varyantlar mitokondriyal DNA (mt-DNA) analizine dayalı genotiplendirme çalışmaları ile *E. granulosus sensu stricto* (s.s.) (G1 ve G3), *Echinococcus equinus* (G4), *Echinococcus ortleppi* (G5), *Echinococcus canadensis* (G6/G7 ve G8/G10), *E. felidis* olarak sınıflandırılmıştır (3). *Echinococcus* spp. cinsindeki parazitler, hermafrodit olup erişkin parazitler hem çapraz hem self-fertilizasyonla çoğalırken, larval dönemde protoskolekslerin eşeysiz olarak çoğaldığı bir döngüye sahiptirler. Erişkinlerin kendi kendine döllenmesi *Echinococcus* spp. popülasyonlarındaki genetik polimorfizme neden olmuş ve türleşmenin yolunu açmıştır (4, 5). *Echinococcus* spp. içerisindeki genetik varyasyon, farklı konakçı grupları veya türler için enfektivitedeki farklılıkları yansıtabilir; bu nedenle popülasyon yapısını genetik olarak karakterize etmek büyük önem taşımaktadır (6).

Mt-DNA'nın, haploid olması, hızlı evrimleşmesi, çoklu kopya sayısı ve maternal olarak aktarılmasından dolayı popülasyon çalışmalarında faydalı genetik belirteçler sağlamaktadır. Aynı zamanda yakın akraba türler arasındaki filogenetik ilişkileri yeniden yapılandırmada ve büyük veri setleri ile taksonomideki sorunlu konuların çözümünde nükleer DNA'dan daha etkili olduğu bilinmektedir (5, 7, 8). *Echinococcus* cinsinin tartışmalı taksonomisi araştırılırken, tam mitokondriyal genomlardan elde edilen

Geliş Tarihi : 18.09.2023
Kabul Tarihi : 04.01.2024

Yazışma Adresi Correspondence

Şeyma GÜNYAKTI KILINÇ
Bingöl Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Parazitoloji Ana Bilim Dalı,
Bingöl – TÜRKİYE

sgunyakti@bingol.edu.tr

nükleotid ve amino asit dizilerinin birleştirilmiş veri setleri analiz edilmiş ve *Echinococcus* spp.'nin kökeni çıkarılmıştır (5). Güncel çalışmalarda ise *E. granulosus*'un mt-DNA'sındaki genetik değişkenliğin daha önce belirlenenin aksine daha yüksek olduğu bildirilmiştir (9, 10).

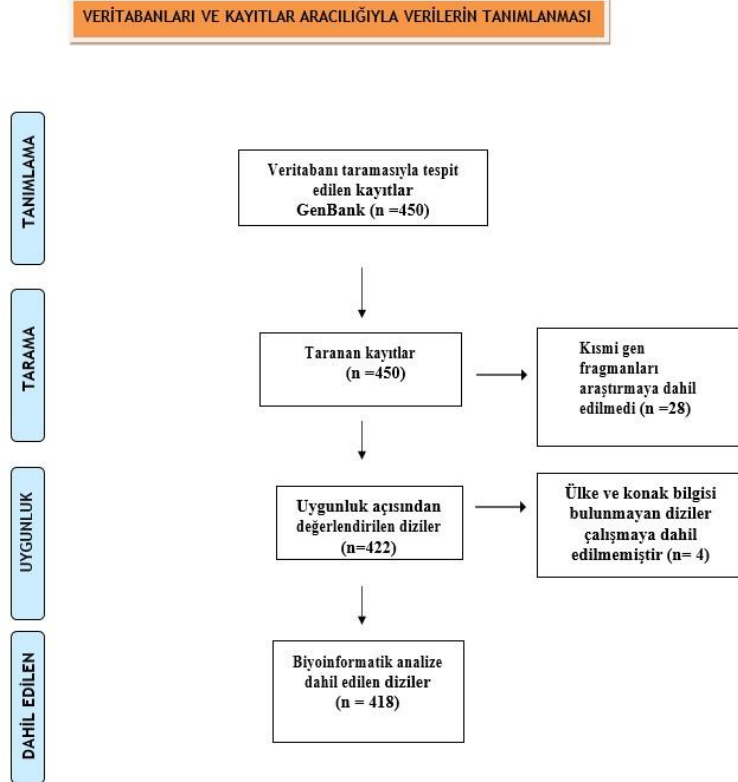
Echinococcus granulosus'un moleküler tanımlanması için birçok mt-DNA belirteci kullanılmıştır. *cox1*, *cox2*, *nad1*, *nad3*, *nad5*, *12S rRNA* ve *rns*, *rnl* (ribozomal RNA'nın daha büyük alt birimi) ve cytochrom b (*cytb*) geninin kısa gen bölgeleri gibi mt-DNA belirteçleri kullanılarak *Echinococcus* spp.'nin genetik çeşitliliği ve popülasyon yapısı değerlendirilmiştir (11-17). Daha önceden yapılan çalışmalar *cox1* geninin *E. granulosus*'un tür içi düzeydeki genetik çeşitliliğini araştırmak açısından en uygun aday olduğunu belirtmiştir (18, 19). Ancak uzun yıllar süren araştırmalardan sonra, *cox1* gen dizisinin (1609 bp) G1 veya G3 genotiplerinin ayırımında yetersiz olduğu belirtilmiştir (17). Yapılan genotiplendirme çalışmalarına mümkün olduğunca çok sayıda ayırım gücü olan konumun dahil edilmesi önerilmiş ve *nad5* gen bölgesinden sonra *cytb* gen bölgesinin 3 tanışal bilgilendirici alana sahip olmasından dolayı genotip

ayrımında umut verici belirteç olduğu ifade edilmiştir (17).

Bu çalışmada, National Center for Biotechnology Information (NCBI) veri tabanında yayınlanmış *E. granulosus* s.s. *cytb* gen sekansları kullanılarak mitokondriyal değişkenliğin ve popülasyonların genetik yapısının incelenmesi ve *cytb* geninin *E. granulosus* s.s.'nin tür içi genetik çeşitliliğinin belirlenmesindeki uygunluğunun araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Veri Toplanması: Bu çalışmada biyoinformatik analiz için 31 Haziran 2023 tarihine kadar NCBI veri tabanına kaydedilen *E. granulosus* s.s.'nin tam *cytb* gen dizileri kullanıldı. Sekans verileri aranırken arama çubuğuna "*Echinococcus granulosus sensu stricto*" veya "*Echinococcus*" veya "*cytb*" terimlerinin çeşitli kombinasyonları girildi. Seçilen gen sekans dizileri manuel olarak tarandı ve uygun diziler çalışmaya dahil edildi. Veri seçimi ve özellikleri, PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) (20) akış diyagramı doğrultusunda oluşturuldu (Şekil 1). Analizlerde kullanılan dizilerin erişim numaraları, coğrafi konumları ve konak özellikleri ise Tablo 1'de gösterildi.



Şekil 1. PRISMA akış şeması

Tablo 1. Veri analizlerinde kullanılan dizilerin haplotiplere göre erişim numaraları, konak ve ülke bilgileri

Haplotip No.	Dizi Sayısı	Ülke	Erişim numarası	Konak
Hap001	178	Türkiye	MG672205, MG672204, MG672200, MG672197, MG672196, MG672195, MG672191, MG672176, MG672175, MG672173, KU925354, KU925352, KU925351, MG672172, KU925412, KU925407, KU925406, KU925401, KU925400, KU925399, KU925398, KU925392, KU925390, KU925388, KU925381 KY766888	Koyun
			KU925410, KU925409, KU925408, MG672202, MG672189, MG672188, MG672186, MG672185, MG672183, MG672182, MG672181, MG672179, MG672178, MG672177, KU925387, KU925386, KU925385, KU925384, KU925382, KU925377, KU925375, KU925373, KU925372, KU925371, KU925370, KU925368, KU925366, KU925364, KU925363, KU925361, KU925359, KU925357, KU925356, KU925355	Sığır
		Çin	KC709565, KC709560, KC709549, KC709548, KC709547, KC709544, KC709543, KC709539, KC709537, KC709536, KC709535, KC709534, KC709531, KC709529, KC709527, KC709525, KC709524, KC709522	Koyun
			AB786664, KC709559, KC709558, KC709557, KC709556, KC709554, KC709553, KC709552, KC709551	İnsan
			KC709550	Yak
		Pakistan	OP580509, OP580508, OP580507, OP580506, OP580505, OP580504, OP580503, OP580502, OP580501	İnsan
			OP006654, OP006652, OP006651	Sığır
		İspanya	KU925421, MG672152	Domuz
			KU925419, KU925417, MG672151, MG672149, MG672148, KY766886	Koyun
			KU925415, MG672139	Yaban Domuzu
		İtalya	KU925413, MG672129	İnsan
			MG672281, MG672280, MG672279, MG672278, KU925426, KU925424	Koyun
			MG672277	Keçi
		Cezayir	MG672134, KU925428, KU925427	Sığır
			MG672292, MG672291, MG672290, MG672289, MG672288, MG672287, MG672285, MG672284, MG672283	İnsan
		İran	MG672246	Sığır
			MG672241, MG672239, MG672237, MG672236, MG672231	Koyun
			MG672244	Keçi
			MG672245	İnsan
		Tunus	MG672276, MG672275, MG672272, MG672266	İnsan
			MG672166, MG672162, MG672161, MG672156	Koyun
		Brezilya	MG672227, MG672226, MG672225, MG672224, MG672223, KX039959, KX039958, KX039956	Sığır
		Arjantin	MG672208, KX039947	Domuz
			MG672126, KY766882, KX039950, KX039949, MG672214	Sığır
		Avustralya	NC_044548, MK774655	Koyun
			MG672263, MG672262, MG672261	Dingo
		Yunanistan	MG672282, MG672130, KU925430	Koyun
		Fransa	MG672143, KY766889	Sığır
		Hindistan	KY766891, MG672260	Manda
		Moğolistan	MG672254	İnsan
Kazakistan	MG672257	İnsan		
Moldova	MG672144	Koyun		
Hap002	7	Türkiye	KU925380	Sığır
		Çin	KC709566, KC709561, KC709546, KC709538	Koyun
		Moğolistan	MG672255	İnsan
Moldova	MG672146	Koyun		
Hap003	5		KC709564, KC709562, KC709532, KC709526, KC709523	Koyun
Hap004		Çin	KC709563	Koyun
Hap005	1		KC709555	İnsan
Hap006			KC709545	Koyun

Tablo 1'in Devamı

Hap007			KC709542	
Hap008	1	Çin	KC709541	Koyun
Hap009			KC709540	
Hap010	3		KC709533, KC709530, KC709528	
Hap011	2	Tunus	MG672159 sheep tunisia g1	Koyun
		Rusya	AB622276 felis catus, russia	Kedi
Hap012	4	Pakistan	OP006667, OP006658, OP006657, OP006656	Siğir
		Pakistan	OP006666, OP006663, OP006662, OP006660 OP006659, OP006655, OP006650	Siğir
		İtalya	MG682522, MG682518, MG682517	Koyun
		Türkiye	MG682536, MG682534, KY766898	Koyun
Hap013	27	İspanya	KY766903, MG682527 MG682529	Koyun İnsan
		Yunanistan	MG682524, MG682523	Koyun
		Fransa	KY766893, MG682519	Koyun
		Hindistan	MG682543, MG682512	Manda
		İran	KY766894, KY766899, MG682539, MG682538	Deve
		Romanya	MG682516	İnsan
Hap014			OP006665	
Hap015	1	Pakistan	OP006664	Siğir
Hap016			OP006661	
Hap017			OP006653	
Hap018	4	Türkiye	MG672203, KU925405	Koyun
		Cezayir	MG672293	İnsan
		Tunus	MG672268	İnsan
Hap019		Cezayir	MG672286	İnsan
Hap020	1		MG672274	İnsan
Hap021			MG672273	
Hap022	2		MG672165 MG672271	Koyun İnsan
Hap023	1		MG672270	İnsan
Hap024	3	Tunus	MG672269 MG672168, MG672163	İnsan Koyun
Hap025	2		MG672267 MG672170	İnsan Siğir
Hap026	1		MG672265	İnsan
Hap027	3		MG672167, MG672157 MG672264	Koyun İnsan
Hap028	41	Arjantin	MG672252, MG672251, MG672250, MG672249, MG672216, MG672215, MG672213, KX039953, KX039951, KX039945, KX039939, KX039938, KX039937 MG672211, MG672210, MG672209 MG672207, MG672206, MG672253, KX039944, KX039943, KX039942, KX039941, KX039940, KX039952, KX039946	Siğir Koyun
		Brezilya	KX039960, KX039955, MG672230, MG672229 MG672228, MG672125	Siğir
		Şili	KX039964, KX039961, MG672220, MG672219, KY766890	Siğir
		Meksika	MG672259, KX039965	Domuz
		İspanya	KU925420	Koyun
Hap029	1	Arjantin	MG672258	Koyun
Hap030		İran	MG672256	Keçi
		Arnavutluk	MG672141, MG672140, KY766883, KU925433, KU925432	Koyun
Hap031	13	Türkiye	MG672201, KU925404 KU925378, KU925411 MG672248, MG672247 MG672238, MG672232	Koyun Siğir Siğir Koyun
Hap032		İran	MG672243	
Hap033	1		MG672242	Koyun
Hap034			MG672240	

Tablo 1'in Devamı

Hap035	3	İran	MG672235, KY766887	Koyun
		Türkiye	KU925358	Siğir
Hap036		İran	MG672234, MG672233	Koyun
Hap037		Brezilya	MG672222, KX039957	
Hap038	2	Şili	MG672221, KX039963	Siğir
Hap039			MG672218, KX039962	
Hap040		Arjantin	MG672217, KX039948	Koyun
Hap041		Brezilya	MG672212	Siğir
Hap042	2	Türkiye	MG672199, KU925403	Koyun
Hap043			MG672198, KU925402	
Hap044			MG672194, KU925395	
Hap045			MG672193, KU925394	
Hap046			MG672192, KU925391	
Hap047	1		MG672190	
Hap048				MG672187
Hap049	2		MG672184, KU925376	
Hap050	4	Türkiye	MG672180, KU925362	Siğir
		İspanya	MG672137, KU925414	İnsan
Hap051	2	Türkiye	MG672174, KU925353	Koyun
Hap052	1		MG672171	Siğir
Hap053				MG672169
Hap054	2	Tunus	MG672164, KY766885	Koyun
Hap055			MG672160	
Hap056	1		MG672158	
Hap057				MG672155
Hap058			MG672154	Keçi
Hap059	2	İspanya	MG672153, KU925422	Koyun
Hap060			MG672150, KU925418	
Hap061			MG672147, KU925416	
Hap062		Moldova	MG672145	Siğir
Hap063	1	Fas	MG672142	İnsan
Hap064		Romanya	MG672138	
Hap065	2		MG672136, KU925425	Koyun
Hap066	1	İtalya	MG672135	İnsan
Hap067			MG672133	Siğir
Hap068	3	Finlandiya	MG672132, KY766884, KU925429	İnsan
Hap069	2	Romanya	MG672131, KU925431	Siğir
Hap070	1	Cezayir	MG672128	İnsan
Hap071	2	Türkiye	MG672127, KU925389	Koyun
Hap072			MG672124, KU925396	
Hap073	1	Cezayir	MG682544	İnsan
Hap074	2	Hindistan	MG682542, KY766902	Manda
Hap075	1	İran	MG682541	Deve
Hap076			MG682540, KY766895	
Hap077	2		MG682537	Koyun
		Arnavutluk	MG682514	Siğir
Hap078			MG682535, KY766901	Koyun
Hap079			MG682533, KY766904	
Hap080	1	Türkiye	MG682532	Siğir
Hap081			MG682531	
Hap082			MG682530	

Tablo 1'in Devamı

Hap083	3		MG682528, KY766900, KY766896	Koyun
Hap084	2	İspanya	MG682526, KY766897	
Hap085	1		MG682525	
Hap085	1	İtalya	MG682521	
Hap085	2	Fransa	MG682520, KY766892	
Hap085		İran	MG682515	
Hap085		Bulgaristan	MG682513	İnsan
Hap090		Finlandiya	MG682511	
Hap091		İtalya	KU925423	Siğır
Hap092	1		KU925397	Koyun
Hap093			KU925393	
Hap094		Türkiye	KU925383	
Hap095			KU925379	Siğır
Hap096			KU925374	
Hap097			KU925369	
Hap098			KU925367	
Hap099		Türkiye	KU925365	Siğır
Hap100	1		KU925360	
Hap101		İngiltere	AF297617	Koyun
Hap102		Çin	KJ559023	İnsan

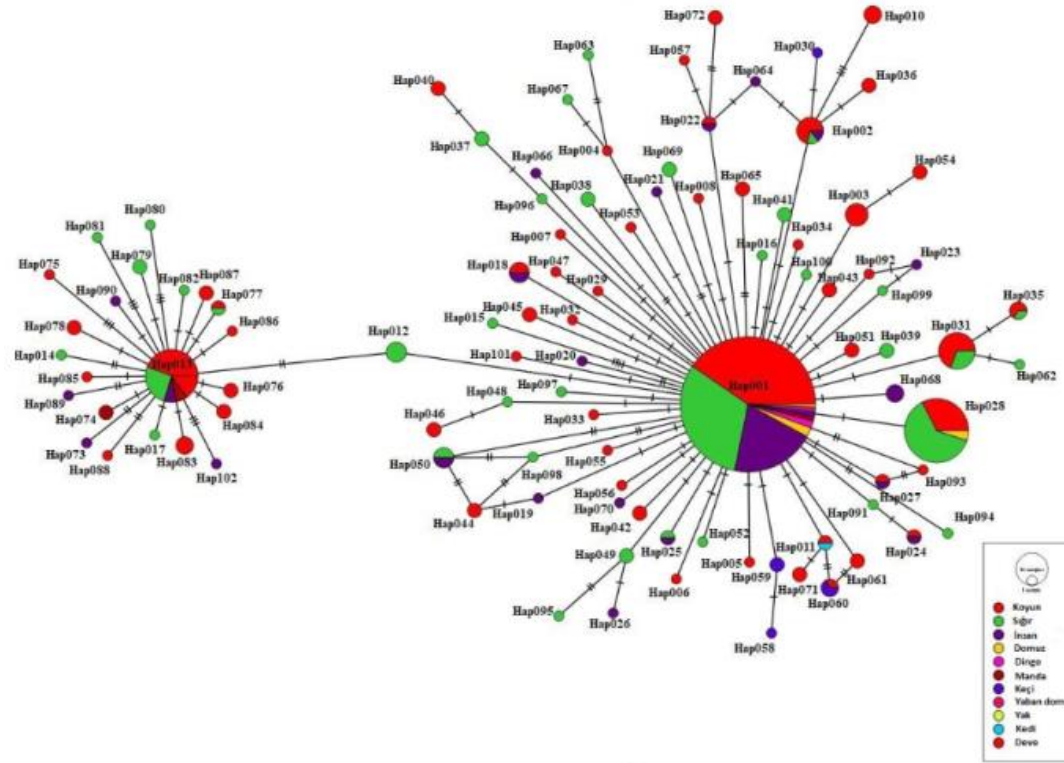
Veri Analizleri: Veri analizleri için MEGA X (21) programında ClustalW modülü kullanılarak hizalama yapıldı. Tüm dizilerin hizalanması için bir referans dizi (Erişim no: NC_044548) kullanıldı. Dizilerin her iki ucu hizalandıktan sonra dizilerin uzunlukları eşitlendi ve 1065 bp'lık diziler elde edildi. Verilerin analizi için MEGA X programı kullanılarak Maksimum Likelihood (ML) analizi uygulandı. Nükleotid dizilerinin ML analizinde kullanılmak üzere en uygun baz değişim modelleri, Akaike Bilgi Kriteri (AIC) ve Bayesian Bilgi Kriteri (BIC) analizi ile belirlendi. Diziler Nexus (22) formatına dönüştürüldü ve haplotip ağını oluşturmak için PopART (Population Analysis with Reticulate Trees) (23) yazılımı kullanıldı. Minimum Spanning Networks kullanılarak haplotipler oluşturuldu ve haplotipler arasındaki ilişkiler analiz edildi. Nükleotid içeriği, haplotip sayıları, haplotip ve nükleotid değişim değerleri ve moleküler haplotipler arasındaki mutasyon miktarına ilişkin istatistikler, DnaSP 6 programı kullanılarak belirlendi. Çeşitlilik, nötralite, fikzasyon indeksleri ve gen akışı analizi ise DnaSP 6 programı kullanılarak hesaplandı (24).

Bulgular

Nükleotid Varyasyonu: Bu çalışmada 11 ara konaktan (n = 415) ve bir son konaktan (n = 3) elde edilmiş *E. granulosus* s.s. izolatına ait 418 *cytb* gen dizisi kullanılmıştır. 418 dizinin 366'sı G1, 52'si G3 örneklerinden oluşmaktaydı. Analiz edilen *cytb* gen dizisi (1068 bp) içinde insersiyon/delesyon türü mutasyon tespit edilmedi. Pi: 0.001 değeri ile düşük nükleotid çeşitliliği tespit edildi. Analiz edilen 1068 bp uzunluğundaki dizi içerisinde 59'u parsimony informative alan olmak üzere toplam 114 polimorfik alan bulunmaktaydı. G1 ve G3'ün ayırt edilmesi için kullanılabilecek pozisyon sayısı üç (246., 721., 1026. nükleotidler) olarak belirlendi. Bu konuların tamamında

G1 örnekleri aynı nükleotid ile temsil edilirken G3 örnekleri de kendi arasında aynı nükleotid ile temsil ediliyordu. 246. nükleotid tüm G1 örneklerinde T bazı ile tüm G3 örneklerinde ise C bazı ile temsil edilirken, 721. nükleotid tüm G1 örneklerinde T bazı ile tüm G3 örneklerinde ise C bazı ile temsil ediliyordu. 1026. nükleotidde ise bütün G1 örneklerinde A bazı bulunurken bütün G3 örneklerinde G bazı mevcuttu. Tanımlayıcı olan bu üç nokta mutasyonunun tamamı transisyonel mutasyondur ve aminoasit diziliminde değişikliğe neden olmuyordu. G1 genotipine ait dizilerden bir tanesinde ise 1026. nükleotidde G3 karakteristik G bazı bulunmasından dolayı G1 ve G3 haplotiplerinin ortasında kalarak Hap012 haplotipini oluşturdu.

Haplotip Analizi: Haplotip analizi neticesinde *cytb* gen dizisine dayalı, 114 nokta mutasyonunun gözlemlendiği 102 farklı haplotip elde edildi. 22 haplotip (Hap013, 014, 017, 073-090, 102) G3 genotipine karşılık gelirken, 80 haplotip G1 genotipine aitti. En yüksek temsile sahip iki ana haplotip Hap001 ve Hap013 olarak belirlendi. Bu haplotiplerde sırasıyla %42.58 (G1) ve %6.45 (G3) frekans değerleri hesaplandı. G1 genotipi için, diğer haplotipler, incelenen 1068 nükleotid arasında 1-5 nokta mutasyonuyla ana haplotip Hap001'den ayrıldı. G3 genotipi için ise diğer haplotipler, incelenen 1068 nükleotid arasında 1-3 nokta mutasyonuyla ana haplotip Hap013'den ayrıldı. Haplotip ağı, her biri birbirine bağlı iki yıldız benzeri konfigürasyonun merkezini oluşturan Hap001 ve Hap013 haplotiplerinin etrafında karmaşık bir yapı gösterdi. Analizlerde kullanılan diziler elde edildiği konak özelliklerine göre haplotip ağı oluşturularak değerlendirildi (Şekil 2).



Şekil 2. *Echinococcus granulosus* s.s. izolatlarının *cytb* geninin haplotip ağı görüntüsü. Daire boyutları haplotip frekanslarıyla orantılıdır. Konaklara göre haplotiplerin dağılımı farklı renklerle gösterilmiştir. Çizgiler mutasyon sayısını temsil etmektedir.

Tablo 2. *Echinococcus granulosus* s.s. *cytb* geninin nükleotid verileri kullanılarak elde edilen çeşitlilik, nötralite ve fikzasyon indeksleri

mtDNA	n	S	H	hd±SD	Tajima's D	p value	Fu's Fs	p value	FLD	p value	Fst ¹	Fst ²	N _m ¹	N _m ²
<i>Cytb</i>	418	114	102	0.804±0.019	-2.61472	P<0.001	-33.741	P<0.001	-6.87752	P<0.02	0.68	0.82	0.89	0.39

n: izolat sayısı; S: polimorfik alan sayısı; H: haplotip sayısı; hd: haplotip çeşitliliği; SD: standard sapma; Fst₁: coğrafi popülasyonların fikzasyon indeksi; Fst₂: konak popülasyonlarının fikzasyon indeksi; N_m¹: coğrafi popülasyonların haploid göç sayısı; N_m²: konak popülasyonlarının haploid göç sayısı

Çeşitlilik, Nötralite ve Fikzasyon İndeksleri

Analizi: Çeşitlilik ve nötrlük indeksleri *cytb* nükleotid verileri kullanılarak hesaplandı. *E. granulosus* s.s. izolatlarının haplotip çeşitliliği değeri 0.804 ± 0.019 olarak belirlendi ve yüksek haplotip çeşitliliği gösterdi. Varyant nükleotid varlığını ve popülasyon genişlemesini gösteren Tajima's D değeri önemli ölçüde negatifti ($P < 0.001$). Bu durum, son popülasyon genişlemesini veya genetik otostop varlığını gösteren negatif Fu's Fs değeriyle de desteklendi. Nitekim, yakın geçmişte ortaya çıkan faydalı bir mutasyonun frekansı pozitif seçilim sonucunda artarken, bağlantılı olduğu genetik varyasyonlar da onunla birlikte aktarılır. Genetik otostop olarak tanımlanan bu olgunun sonucunda pozitif seçilime uğrayan mutasyonun yakınlarındaki DNA dizilerinde de çeşitlilik azalır. Analizlere ait indeks değerleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Farklı coğrafi bölgelere göre E. granulosus s.s. popülasyonlarının karşılaştırılması: 26 farklı grup *E. granulosus* s.s. izolatu için popülasyon farklılaşma derecesi (Fst) ve haploid göç sayısı (N_m) hesaplandı (Tablo 2). En yüksek genetik farklılaşma Fransa-Meksika ile Hindistan-Meksika popülasyonları arasında (0.68), en düşük genetik farklılaşma ise Pakistan-Yunanistan popülasyonları arasında (-0.11) hesaplandı. Ortalama Fst değeri ise 0.219 olarak belirlendi. Ortalama Fst değerinin nispeten yüksek olması alt popülasyonların genetik olarak farklı olabileceğini gösterdi.

Farklı konak türlerine göre E. granulosus s.s. popülasyonlarının karşılaştırılması: 11 farklı konak özelliğine göre oluşturulan grup *E. granulosus* s.s. izolatu için popülasyon Fst ve N_m hesaplandı (Tablo 2). En yüksek genetik farklılaşma deve-yaban domuzu ile dingo-deve popülasyonları arasında (0.82), en düşük genetik farklılaşma ise koyun ve insan popülasyonları arasında (-0.001) hesaplandı. Ortalama Fst değeri ise 0.39 olarak belirlendi. Ortalama Fst değerinin nispeten yüksek olması alt popülasyonların genetik olarak farklı olabileceğini gösterdi.

Tartışma

Mitokondriyal DNA, korunmuş yapısı, yüksek mutasyon oranı, rekombinasyon olmaması ve yüksek oranda evrimsel geçişi nedeniyle tür içi varyasyonların ve diğer popülasyon genetiği çalışmalarının araştırılmasında önemli bir rol oynamaktadır (7). Bu çalışmada, NCBI veri tabanına 26 farklı ülkeden kaydedilen 12 konağa ait *E. granulosus* s.s. (G1 ve G3) izolatlarının mitokondriyal *cytb* geninin tam dizilimi analiz edildi ve *E. granulosus* s.s. genetik çeşitliliği ve popülasyon yapısı incelendi.

Çeşitli mt-DNA bazlı *Echinococcus* cins, tür ve genotip tanımlama yöntemleri geliştirilmiş olmasına rağmen G1 ve G3 genotiplerinin farklılaşması tartışmalı kalmıştır (17). *Nad5* gen fragmanı (680 bp), tutarlı bir şekilde tanınan üç pozisyon ve tamamen tutarlı olmayan üç pozisyon ile G1 ve G3'ü ayırt etme potansiyeline sahip bölgeler içinde ilk sırada yer almaktadır. Ancak Kinkar ve ark. (17) analize mümkün

olduğunca çok sayıda potansiyel olarak farklılaştırıcı konumun dahil edilmesi gerektiğini bildirmiştir. *Echinococcus granulosus* s.s.'nin mitokondriyal değişkenliğini ve popülasyon genetik yapısını araştıran bir çalışmada Avrupa'nın farklı ülkelerinden elde edilen 312 izolat *cox1* gen bölgesinin kısmi gen fragmanı (446 bp) kullanılarak analiz edilmiş ve 351 bp uzunluğundaki bölgede 18 nokta mutasyonu belirlenmiştir (10). *Cytb* gen bölgesinin tam dizisini kullanarak yapılan bir çalışmada ise 18 izolat analiz edilmiş ve 11 nokta mutasyonu belirlenmiştir (25). Bu çalışmada ise 1068 bp uzunluğundaki *cytb* gen dizisinde 114 nokta mutasyonunda 59 informatif alan bulunmaktaydı. Bunlardan üçü tanınan anlamda tutarlıydı. Bu nedenle *cytb* ile *nad5* gen fragmanları birlikte kullanıldığında G1 ile G3'ün ayırımı yüksek doğruluk elde edilebileceği düşünülmektedir. *Cytb* gen bölgesindeki tanınan alanların tutarlı olması genotiplendirme çalışmalarında yaygın olarak kullanılan *cox1* ve *nad1* genine göre daha uygun olduğunu göstermektedir. *Cytb* geninin diğer gen bölgelerine göre negatif yönü ise tanınan pozisyonların büyük bir gen bölgesine yayılmış olmasıdır. Özellikle düşük kalitedeki DNA örneklerinde uzun bir bölgenin çoğaltılması zor olduğu için tanınan alanların kısa alanlarda bulunması gerektiği bildirilmiştir (17).

İncelenen gen bölgesinin uzunluğu potansiyel olarak genetik çeşitlilik araştırmalarının sonuçlarını etkilemektedir (26, 27). Çin'de yapılan bir çalışmada 45 *E. granulosus* izolatu için 1609 bp uzunluğundaki *cytb* geni çoğaltılmış ve tamamı G1 genotipine ait on haplotip tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, *cytb* gen analizine göre örnekler arasında genetik çeşitliliğin düşük ($H_d = 0.626$) olduğunu göstermiştir (28). *Cox1+nad3* (701 bp) gen bölgeleri kullanılarak yapılan bir çalışmada ise 66 izolata ait gen dizisi analiz edilmiş ve 21 nokta mutasyonuyla 23 haplotip gözlenmiştir (13). *Nad1* ve *cox1* gen bölgeleri ile yapılan bir çalışmada 60 izolat analiz edilmiştir. *Nad1* bölgesi için 12, *cox1* bölgesi için 23 haplotip belirlenmiş ve her iki gen bölgesi için de düşük nükleotid (π), yüksek haplotip çeşitliliği (H_d) ve negatif/önemsiz Tajima's D değeri gözlemlendiği bildirilmiştir (29). Başka bir çalışmada ise *cytb* gen analizine göre 18 izolat içerisinde 7 haplotip tespit edilmiş; haplotip çeşitliliği yüksek ($H_d = 0.837$) nükleotid çeşitliliği düşük ($\pi = 0.00341$), Tajima's D ve Fu's Fs değerleri negatif ancak önemsiz olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada Hap-2 ve Hap-6 ana haplotiplerinin sırasıyla G3 ve G1 genotiplerinden oluştuğu ve baskın genotipin G3 olduğu bildirilmiştir (26). Bu çalışmada ise in silico olarak analiz edilen 418 izolat içerisinde 102 haplotip belirlenmiş ve yüksek haplotip, düşük nükleotid çeşitliliği belirlenmiştir ($H_d = 0.807$, $\pi = 0.001$). Yine bu çalışmada Hap001 ve Hap013 ana haplotipleri sırasıyla G1 ve G3 genotiplerinden oluşurken, baskın genotip G1 genotipi olarak belirlenmiştir. Alvi ve ark. (25)'nin belirttiğinin aksine bu çalışmada Tajima's D ve Fu's Fs değerleri önemli derecede negatifti. Fu's Fs popülasyon demografik genişlemesine karşı hassastır ve bu da genellikle büyük negatif Fu's Fs değerlerine yol açmaktadır (30). Bu verilerle uyumlu olarak bizim çalışmamızda da önemli ölçüde negatif Tajima's D ve Fu's Fs değerleri popülasyon genişlemesinin bir göstergesi olarak

değerlendirilmektedir. Düşük nükleotid ve yüksek haplotip çeşitliliğinin kombinasyonu, küçük bir popülasyon boyutundan hızlı bir popülasyonun yayıldığını göstermektedir (25, 31). Aynı zamanda düşük nükleotid çeşitliliği, popülasyonlarda olası darboğaz olaylarının yaşandığını göstermektedir.

Yıldız benzeri konfigürasyonlar popülasyonun demografik genişlemesini ve nadir mutasyonların fazlalığını göstermektedir (32, 33). Çalışmamızda *E. granulosus s.s.*'nin yıldız benzeri medyan ağı tarihsel bir popülasyon genişlemesine işaret etmektedir. Bu durum Fu'S Fs testi ile de desteklenerek *E. granulosus*'un belirli popülasyon genişleme olaylarını yaşadığını göstermektedir.

Fst, genetik yapıya bağlı olarak popülasyon farklılaşmasının bir ölçüsü olup 0.15'ten büyük bir Fst değeri, popülasyonların ayırt edilmesinde anlamlı olarak kabul edilmektedir (34). *Echinococcus granulosus s.s.* türleri arasındaki gen akışının derecesini tahmin etmek için yapılan bir çalışmada *cox1* dizi verileri coğrafi özelliklerine göre gruplandırılarak Fst değeri hesaplanmış ve 0.01825 ile 0,18746 arasında değişen Fst değerleri bulunmuş ve alt popülasyonların genetik olarak farklılaşmadığı belirtilmiştir (10). Başka bir çalışmada farklı coğrafi bölgelerden elde edilen 120 *Echinococcus spp.* izolatının popülasyon farklılaşması araştırılmış ve popülasyonlar arasındaki Fst değerlerinin 0.037 ile 0.229 arasında değiştiği ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu bildirilmiştir (27). Bu çalışmada coğrafi konuma göre belirlenen popülasyonlardan elde edilen Fst (0.21) değerlerine göre alt popülasyonlarda önemli bir farklılık bulunmuştur. Wright (35), birden küçük bir Nm değerinin alt popülasyonlar arasında sınırlı gen

değişimine işaret ettiğini bildirmiştir. Bu çalışmada da 0.89 olan Nm değerinin düşük olması, düşük bir genetik değişimin veya düşük gen akışının (36) olabileceğini düşündürmektedir. Veri tabanından elde edilen dizilerin konak özelliklerine göre oluşturulan alt popülasyonlarda ise Fst ve Nm değerleri 0.39 olarak belirlenmiştir. Bu durum konaklar arası popülasyon farklılaşmasının daha yüksek olduğunu göstermiştir. Genetik uzaklık en yüksek (0.82) yaban hayvanları ve evcil hayvanlar arasında belirlenmiştir. Bu durumun farklı erişkin parazitler arasında otogami ve geitogami üreme şekillerinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. En düşük genetik mesafenin ise koyun ve insan popülasyonları arasında görülmesi de *E. granulosus s.s.*'nin yaşam çemberinde evcil yaşam döngüsünün hala ön planda olduğunu göstermektedir.

Echinococcus granulosus s.l.'ya ilişkin güncel epidemiyolojik çalışmalarda birden fazla lokus kullanılmaya başlanmıştır. Daha fazla gen kullanılması, *E. granulosus s.l.*'nin genotipleri arası ve genotip içi taksonomik durumu ve filogenisini anlamaya yardımcı olacaktır. Bu çalışma ile *cytb* gen bölgesi G1 ve G3 genotiplerinin ayırımında kullanılacak alternatif gen bölgesi olarak değerlendirilmiş ve popülasyonlar arasında yüksek derecede genetik çeşitlilik belirlenmiştir. Bu veriler *E. granulosus s.l.*'nin genetik varyasyonuna ilişkin yararlı temel bilgiler oluşturmaktadır. *E. granulosus s.s.*'nin yaygınlığı ve popülasyon yapısı ile ilgili yapılan çalışmalar dünya çapında *nad5* gen dizilerine dayanmaktadır. Bu çalışma ile *nad5* genine ek olarak *cytb* geninin de kullanılmasıyla genotip ayrımlarının daha doğru bir şekilde yapılabileceği belirlenmiştir.

Kaynaklar

1. Craig PS, McManus DP, Lightowers MW, et al. Prevention and control of cystic echinococcosis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 385-394.
2. Torgerson P, Carmona C, Bonifacio R. Estimating the economic effects of cystic echinococcosis: Uruguay, a developing country with upper-middle income. *Ann Trop Med Parasitol* 2000; 94: 703-713.
3. Vuitton DA, McManus DP, Rogan MT, et al. International consensus on terminology to be used in the field of echinococcoses. *Parasite* 2020; 27: 1-41
4. Haag KL, Araujo AMd, Gottstein B, et al. Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (Cestoda; Taeniidae): Selfing or outcrossing? *Parasitology* 1999; 118: 63-71.
5. Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS, Ito A. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* 2006; 134: 713-722.
6. Thompson RA, McManus DP. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol* 2002; 18: 452-457.
7. Mueller RL, Macey JR, Jaekel M, Wake DB, Boore JL. Morphological homoplasy, life history evolution, and historical biogeography of plethodontid salamanders inferred from complete mitochondrial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004; 101: 13820-13825.
8. Brown WM, George Jr M, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci* 1979; 76: 1967-1971.
9. Ma S, Maillard S, Zhao H, et al. Assessment of *Echinococcus granulosus* polymorphism in Qinghai province, People's Republic of China. *Parasitol Res* 2008; 102: 1201-1206.
10. Casulli A, Interisano M, Sreter T, et al. Genetic variability of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in Europe inferred by mitochondrial DNA sequences. *Infect Genetic Evol* 2012; 12: 377-383.
11. Bowles J, McManus D. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int J Parasitol* 1993; 23: 969-972.
12. Casulli A, Manfredi MT, La Rosa G, et al. *Echinococcus ortleppi* and *E. granulosus* G1, G2 and G3 genotypes in Italian bovines. *Vet Parasitol* 2008; 155: 168-172.
13. Umhang G, Chihai O, Boué F. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in a hyperendemic European focus, the Republic of Moldova. *Parasitol Res* 2014; 113: 4371-4376.

14. Hu D, Song X, Wang N, et al. Molecular identification of *Echinococcus granulosus* on the Tibetan Plateau using mitochondrial DNA markers. *Genet Mol Res* 2015; 14: 13915-13923.
15. Boubaker G, Marinova I, Gori F, et al. A dual PCR-based sequencing approach for the identification and discrimination of *Echinococcus* and *Taenia* taxa. *Mol Cell Prob* 2016; 30: 211-217.
16. Samari H, Laurimäe T, Reghaissia N, et al. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes in dromedary camels from extreme Sahara of Algeria based on analysis of *nad2* and *nad5* genetic markers. *Acta Trop* 2022; 234: 106616.
17. Kinkar L, Laurimäe T, Acosta-Jamett G, et al. Distinguishing *Echinococcus granulosus sensu stricto* genotypes G1 and G3 with confidence: A practical guide. *Infect Genetic Evol* 2018; 64: 178-184.
18. Haag K, Ayala F, Kamenetzky L, Gutierrez A, Rosenzvit M. Livestock trade history, geography, and parasite strains: the mitochondrial genetic structure of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *J Parasitol* 2004; 90: 234-239.
19. Nakao M, Li T, Han X, et al. Genetic polymorphisms of *Echinococcus tapeworms* in China as determined by mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Int J Parasitol* 2010; 40: 379-385.
20. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: Explanation and elaboration. *Ann Int Med* 2009; 151: 65-94.
21. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 2018; 35: 1547.
22. Maddison DR, Swofford DL, Maddison WP. NEXUS: An extensible file format for systematic information. *Syst Biol* 1997; 46: 590-621.
23. Leigh JW, Bryant D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 2015; 6: 1110-1116.
24. Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol Biol Evol* 2017; 34: 3299-3302.
25. Alvi MA, Ali RMA, Li L, et al. Phylogeny and population structure of *Echinococcus granulosus (sensu stricto)* based on full-length *cytb-nad2-atp6* mitochondrial genes – First report from Sialkot District of Pakistan. *Mol Biochem Parasitol* 2023; 253: 111542.
26. Romig T, Ebi D, Wassermann M. Taxonomy and molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus sensu lato*. *Vet Parasitol* 2015; 213: 76-84.
27. Yanagida T, Mohammadzadeh T, Kamhawi S, et al. Genetic polymorphisms of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in the Middle East. *Parasitol Int* 2012; 61: 599-603.
28. Zhong X, Wang N, Hu D, et al. Sequence analysis of *cytb* gene in *Echinococcus granulosus* from Western China. *Korean J Parasitol* 2014; 52: 205.
29. Alvi MA, Ohiolei JA, Saqib M, et al. *Echinococcus granulosus (sensu stricto)*(G1, G3) and *E. ortleppi* (G5) in Pakistan: Phylogeny, genetic diversity and population structural analysis based on mitochondrial DNA. *Parasite Vector* 2020; 13: 1-10.
30. Su J, Ji W, Wei Y, et al. Genetic structure and demographic history of the endangered and endemic schizothoracine fish *Gymnodiptychus pachycheilus* in Qinghai-Tibetan Plateau. *Zool Sci* 2014; 31: 515-522.
31. Sharma M, Fomda BA, Mazta S, et al. Genetic diversity and population genetic structure analysis of *Echinococcus granulosus sensu stricto* complex based on mitochondrial DNA signature. *PLoS One* 2013; 8: e82904.
32. Slatkin M, Hudson RR. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 1991; 129: 555-562.
33. Harpending H, Rogers A. Genetic perspectives on human origins and differentiation. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000; 1: 361-385.
34. Frankham R, Briscoe DA, Ballou JD. Introduction to conservation genetics: Cambridge university press 2002.
35. Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 1965; 395-420.
36. Eltaher S, Sallam A, Belamkar V, et al. Genetic diversity and population structure of F3: 6 Nebraska winter wheat genotypes using genotyping-by-sequencing. *Front Genet* 2018; 9: 76.