

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOPROANTİJEN ELISA YÖNTEMİ İLE SIĞIRLARDA
FASCIOSİS**

Ebe Ayşegül BOSTANCI
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Bekir OĞUZ

VAN-2017

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOPROANTİJEN ELISA YÖNTEMİ İLE SIĞIRLARDA
FASCIOSİS**

Ebe Ayşegül BOSTANCI
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Bekir OĞUZ

VAN-2017

Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2015-SBE-YL024 no'lu proje ile desteklenmiştir.

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOPROANTİJEN ELISA YÖNTEMİ İLE SIĞIRLARDA
FASCIOLOSIS**

Ebe Ayşegül BOSTANCI
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ



Jüri Başkanı
Prof. Dr. M. Serdar DEĞER



Üye
Yrd. Doç. Dr. Bekir OĞUZ



Üye
Yrd. Doç. Dr. Burçak ASLAN
ÇELİK



TEŞEKKÜR

Tez konumun seçilmesinden çalıŐmalarımın yürütülmesine kadar her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda sonsuz desteğiyle gelişmeme katkıda bulunan değerli danışman hocam Yrd.Doç.Dr. Bekir OĞUZ'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Parazitoloji Anabilim Dalı'nda çalışmaya başladığım günden bu yana desteğini gördüğüm değerli hocalarım Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. M. Serdar DEĞER, Prof.Dr. Kamile BİEK, Doç.Dr. Nalan ÖZDAL, Yrd.Doç.Dr. Ayşe KARAKUŐ'a ve çalışma süresince malzeme yönünden 2015-SBE-YL024 kodlu proje ile destek sağlayan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Tez çalıŐmalarımın her aşamasında birçok fedakârlıklar gösterip beni destekleyerek her an yanımda olan aileme teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
TABLolar LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ	IX
1. GİRİŞ.....	2
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Sınıflandırma ve Morfoloji.....	4
2.1.1. <i>Fasciola hepatica</i> Linnaeus, 1758	4
2.1.2. <i>Fasciola gigantica</i> Cobbold, 1885	5
2.2. Fasciola Türlerinin Biyoloji ve Epidemiyolojisi.....	5
2.3. Fasciola Türlerinin Yayılışı.....	9
2.4. Fasciola Türlerinin Patogenezi ve Klinik Bulgular.....	10
2.4.1. Patogenez.....	10
2.4.2. Klinik bulgular.....	11
2.5. Fasciolosis’de Tanı.....	11
2.5.1. Klinik ve otopsi bulguları.....	12
2.5.2. Dışkı muayene yöntemleri.....	12
2.5.3. Biyokimyasal analizler.....	13
2.5.4. Serolojik testler.....	13
2.6. Fasciolosis’de Tedavi ve Kontrol.....	13
2.6.1. Tedavi.....	13
2.6.2. Kontrol.....	14
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	16
3.1. Çalışma Sahası ve Örneklerin Toplanması.....	16
3.2. Dışkı Örneklerinin İncelenmesi.....	17
3.2.1. Parazitolojik muayene.....	17
3.2.2. ELISA metodu (Enzyme linked immunosorbent assay).....	18
3.2.3. ELISA test sonuçlarının değerlendirilmesi.....	20

3.3. İstatistiksel Analiz.....	21
4. BULGULAR.....	22
4.1. Anket Sonuçları.....	22
4.2. Enfeksiyonun Prevalansı.....	23
4.3. İstatistiksel Analiz Sonuçları.....	24
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	27
ÖZET.....	31
SUMMARY.....	32
KAYNAKLAR.....	33
ÖZGEÇMİŞ.....	38
EK1 ETİK KURUL BELGESİ.....	39
EK2 İNTİHAL RAPORU.....	40

SİMGELER VE KISALTMALAR

ELISA	:Enzyme-linked immunosorbent assay
WB	:Western Blot
E/S	:Ekskresyon-Sekresyon
CO	:Cut-off
IFAT	:İndirect floresan antikor test
IHA	:İndirekt hemaglütinasyon testi
EPG	:Egg per gram



,

TABLULAR LİSTESİ

- Tablo 1.** İncelenen sığırların yerleşim yerine, yaş, cinsiyet ve ırkına göre.....22
- Tablo 2.** Sığırlarda fasciolosis'in Kopro ELISA ve dışkı bakı yöntemlerine göre dağılımı.....24
- Tablo 3.** Sığırlarda fasciolosis prevalansının yaş, cinsiyet ve ırkla ilişkisi.....26



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	<i>Fasciola hepatica</i> 'nın morfolojisi (Anonim, 2016a).....	4
Şekil 2.	<i>Fasciola hepatica</i> yumurtası (Anonim, 2016b).....	5
Şekil 3.	<i>Fasciola</i> spp.'nin biyolojisi (Anonim, 2016c).....	8
Şekil 4.	Araştırma materyalinin toplandığı yerleşim yerlerinden bir görüntü.....	16
Şekil 5.	Örneklerin mikropleytlere konulması; 1-47: dışkı örneklerinden hazırlanan ekstraktlar, PK: pozitif kontrol.....	19
Şekil 6.	ELISA mikropleytle pozitif (a) ve negatif (b) örnekler (PK: pozitif kontrol, NK: negatif kontrol).....	23
Şekil 7.	Enfekte sığır dışkısında saptanan <i>Fasciola</i> sp. Yumurtası.....	25

1. GİRİŞ

Günümüzde hızla artan nüfus, beraberinde hayvansal gıdalara olan talebi de artırmıştır. Hayvansal gıda üretiminde sığır yetiştiriciliği önemli bir yere sahip olup; sığır, dünya süt üretiminin tamamına yakınına (%86.3-89.5), et üretiminin yaklaşık %25'ini tek başına sağlamaktadır (Akman ve ark., 2007). Sığır yetiştiriciliğinde verim düşüklüğüne yol açan birçok paraziter enfeksiyonlar vardır ve bunlar içinde yer alan fasciolosisin önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir (Köroğlu ve Şimşek, 2003).

Karaciğer kelebekleri olarak bilinen *Fasciola* etkenleri, başta koyun, keçi ve sığır olmak üzere birçok evcil memelide karaciğer-safra kanallarına yerleşen zoonotik karakterli trematodlardır (Soulsby, 1986). Bu parazitin ara konakçılığını *Lymnaeidae* ailesinde yer alan çeşitli salyongozlar yapmaktadır. *Fasciola hepatica* karaciğer trematodları arasında en yaygın tür olup oluşturduğu patojenite ile özellikle endemik alanlarda yüksek mortalite ve morbiditeye, canlı ağırlığında gerileme, karaciğer kayıplarına, sekonder enfeksiyonlara duyarlığa ve önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Malone ve ark., 1998).

Endemik bölgelerde fasciolosisin teşhisi klinik belirtiler ve mevsimin varlığı göz önüne alınarak yapılabilir, ancak bu verilerin dışkı muayenesi ile birlikte çeşitli hematolojik ve serolojik testlerle desteklenmesi kesin teşhis için daha yararlı olabilir (Abunna ve ark., 2010). Bu trematodun yumurtalarını safra kanallarında olgunlaşma dönemi geçirmeden dışkıda görmek olası değildir. Bu nedenle dışkıda yumurtalar enfeksiyonun 10-12. haftasından sonra görmek mümkün olmaktadır. Ayrıca sığırlar tarafında alınan parazitler, güçlü bir konak bağışıklığı ile karşı karşıya kaldıklarında her zaman erişkin döneme ulaşamamaktadırlar. Dışkıda parazit yoğunluğunun düşük olduğu enfeksiyonlarda yumurtaların ancak düzenli olarak tekrarlanan dışkı muayenelerinde görülebildiği, parazitin yumurta çıkarımında değişiklik gösterdiği kaydedilmektedir. Rutin dışkı muayene yöntemleri ile yapılan dışkı kontrollerinin karaciğer trematod enfeksiyonlarını tespit etmek açısından enfeksiyonun gerçek durumu hakkında yeterli bilgi vermediği kaydedilmektedir (Salimi-Bejestani ve ark., 2005; Mezo ve ark., 2007). Bunun sonucu olarak fasciolosisin erken dönem teşhisine yönelik alternatif immuno-serolojik yöntemler geliştirilmiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarda ELISA'nın, parazitin erken dönemlerde belirlenmesi, daha pratik olması ve prevalans çalışmalarında

kolaylıkla uygulanabilir olduğu görülmüş ve mikroskopik yöntemlere iyi bir alternatif olduğu vurgulanmıştır (Reichel, 2002; Salimi-Bejestani ve ark., 2005). Özellikle paraziter antijenleri dışkıda saptayan kopro antijen ELISA oldukça yüksek spesifite göstermekte ve parazitlerin safra kanallarına ulaşmaya başladığı 6. haftadan itibaren pozitif sonuç alınabilmektedir (Valero ve ark., 2009).

Dünyada ruminantlarda geniş bir yayılış gösteren fasciolosisin Türkiye’de sığırlardaki yayılışı üzerine çalışmaların daha çok dışkı bakısı ve mezbaha incelemesi sonuçlarına dayandığı görülmekte olup immuno-serolojik çalışmaların oldukça sınırlı sayıda olduğu dikkati çekmektedir (Şimşek ve ark., 2006; Şimşek ve ark., 2007; Yavuz ve ark., 2007; Yıldırım ve ark., 2007; Şen ve ark. 2011). Bu çalışmada, koproantijen ELISA ve sedimentasyon yöntemleri ile Van merkezde yetiştirilen sığırlarda fasciolosis prevalansının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sınıflandırma ve Morfoloji

Fasciolosis'e yol açan türler, Platyhelminthes Şubesi, Trematoda Sınıfında, Echinostomida takımı, Echinostomata alt takımında, Fasciolidae Ailesinde yer alan *Fasciola* soyuna bağlı helmintlerdir. Şu ana kadar *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *Fasciola jacksoni*, *Fasciola halli*, *Fasciola nyanzae*, *Fasciola indica*, *Fasciola tragelaphi*, ve *Fasciola californica* türleri klasifiye edilmiştir. Fasciolidae Ailesinde başlıca *Fasciola*, *Fascioloides* ve *Fasciolopsis* cinsleri bulunmaktadır (Soulsby, 1986).

Yukarıda bahsedilen bazı türler daha çok klasik kaynaklarda geçmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda başlıca tür olarak *F. hepatica* ve *F. gigantica*'dan bahsedilmektedir (Thanh ve ark., 2000).

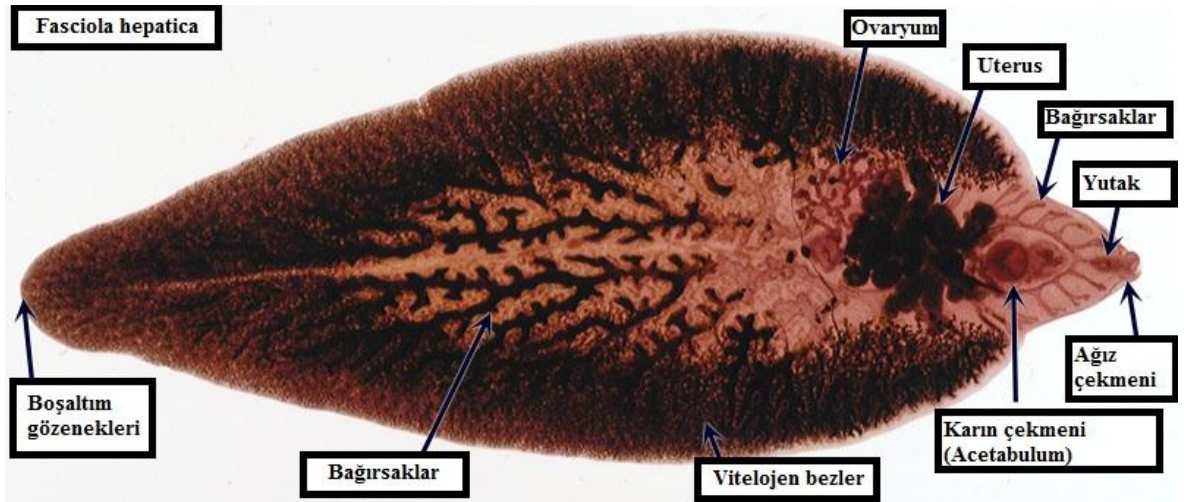
Fasciola (Linnaeus, 1758) cinsinde bulunan türler başta ruminantlar olmak üzere çok sayıda memeli hayvanda bulunmakla beraber insanlarda da görülebilmektedir. Son konaklarda tercih ettikleri yerler karaciğer-safra yollarıdır. Türkiye'de ve Dünya'da en çok görülen türler *F. hepatica* ve *F. gigantica*'dır. Diğer türler ise dünyanın değişik bazı bölgelerinden bildirilmiştir. Bu parazitlerin erginlerine halk arasında kelebek ve yapmış oldukları hastalığı da kelebek hastalığı adı verilmektedir (Toparlak ve ark., 2002).

Fasciola türlerinin filogenetik ve popülasyon çalışmalarında genellikle mitokondrial ve çekirdek DNA'sında bulunan genler kullanılmaktadır (Zarowiecki ve ark., 2007). Güney Kore'de yapılan bir çalışmada bölgeden alınan *F. hepatica* ve *F. gigantica* örnekleri mitokondrial DNA sekansları açısından incelenmiş, Avustralya, Endonezya ve Japonya'daki örneklerle karşılaştırılmış ve bu türler arasında interspesifik kros hibridizasyonun olabileceği bildirilmiştir (Agatsuma ve ark., 2000). Çeşitli araştırmacılar bu sonucun sebebini ara form olarak tespit edilen *Fasciola* türünün aynı atadan gelmiş olabileceğine ya da sınıra yakın ülkelerdeki kontrolsüz enfektif hayvan geçişlerine bağlamaktadırlar (Itagaki ve ark., 2005; Le ve ark., 2008; Peng ve ark., 2009).

2.1.1. *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758

Olgunlaşmış erişkinleri (Şekil 1) zeytin yaprağına benzerken genç erişkinleri mızrak ucuna (lanset) benzemektedir. Olgunlarının uzunlukları 20-35 mm, genişlikleri 8-13 mm kadardır. Gençlerinin ise birkaç milimetre uzunluğundadır. Ön taraflarında belirgin konik bir çıkıntı vardır. Bunun her iki yanında tipik omuz çıkıntıları bulunur. Bu türün arka uçları *F. gigantica*'ya göre daha sivridir. Olgunlaşmış erişkinlerinin rengi petrol yeşili, genç erişkinlerin ise beyazdır. Ağız çekmeni ön tarafta küçük ama kuvvetli koni benzeri olan çıkıntının ucunda bulunur (Toparlak ve ark., 2002). Karın çekmeni (acetabulum) daha geniştir, oldukça önde ve omuz çıkıntılarının hizasında orta hatta yer almaktadır. Bağırsaklar oldukça fazla dallanmıştır (Hanna, 1994).

Hem büyük hem de dallanma sayısı fazla olan testisler, ovaryumun arka tarafında sıra sıra dizilmiş bir şekilde bulunurlar. Testislere göre daha küçük dallara ayrılmış ovaryum, karın çekmeninin biraz arkasında sağ tarafta yer alır. Sırrus kesesi ve ovaryum arasında kalan uterus kasıdır. Testislerden sonra vücudun yan taraflarının çoğunu vitellus folikülleri doldurmaktadır. Tegument üzerinde uçları arkaya dönük dikenler vardır (Roberts ark., 2000).



Şekil 1. *Fasciola hepatica*'nın morfolojisi (Anonim, 2016a)

Yumurtaları 130-150 X 63-90 µm olup ince kabuklu, kapaklı, altın sarısı rengindedir (Şekil 2), fazla belirgin olmayan bir embriyo içerir, kapağın karşı kutbunda kabuk içe doğru az belirgin bir kalınlaşma gösterir. *Fasciola hepatica* yumurtaları pratikte *Paramphistomidae* spp. yumurtalarıyla karıştırılabilmektedir. *Paramphistomidae* spp. yumurtalarının gri renkli, daha büyük olması ve kapağın dar ve embriyon hücrelerinin daha belirgin olması ile *Fasciola hepatica* yumurtalarından ayrılır (Güralp, 1981).



Şekil 2. *Fasciola hepatica* yumurtası (Anonim, 2016b)

2.1.2. *Fasciola gigantica* Cobbold, 1885

Genel morfolojileri *F. hepatica*'ya benzerse de erişkinlerinin vücutları daha uzun (25-75 mm) ve daha ince (3-12 mm) yapıdadır. Her iki yanı birbirine paralel olarak devam edip arka uçta yuvarlak bir şekilde birleşerek sonlanır. Omuz çıkıntıları belirgin değildir. Tegümentte küçük dikenler vardır. Bağırsakları aşırı dallanma göstermektedir. Halk arasında yılan keleşği olarak isimlendirilir. Yumurtaları *F. hepatica*'ya benzer ancak daha büyüktür (156-197 X 90-104 µm) (Roberts ark., 2000).

2.2. *Fasciola* Türlerinin Biyoloji ve Epidemiyolojisi

Yumurta safra kanalları yoluyla bağırsağa, oradan da dışkı ile dışarı atılır. Yumurtaların gelişebilmesi için uygun ısı, nemli veya sulu bir ortama gereksinim vardır. Yumurta içinde mirasidyumun gelişmesi 22° C'de 14-17 günde olur. Mirasidyum

geliştikten sonra sulu bir ortamda ışığın uyarıcı etkisiyle proteolitik enzim salgılayarak yumurtanın kapağını açar. (Güralp, 1981; Soulsby, 1986; Tınar ve Korkmaz, 2003).

Serbest kalan mirasidyum suda yüzerek uygun ara konak sümüklüyü arar. Mirasidyum salyangoza histolitik enzim salgılayarak girer. Sonra burada sırasıyla sporokist, redi ve serker dönemleri gelişir. Serkerlerin sümüklüden çıkması için sulu ortama gerek vardır eğer ortamdaki su çekilirse salyangoz kendini çamura gömer. Burada aylarca enfekte olarak yaşamını sürdürür. Arakonaklar enfeksiyondan 1-2 ay sonra serker çıkarmaya başlarlar. Serkerler ara konağı terk ederek suda yüzmeye başlarlar. Bunlar sudaki bitki veya diğer cisimlere yapışarak kurukları kopar kistlenir ve böylece sonkonak için enfektif dönem olan metaserkerler meydana gelir (Güralp, 1981; Soulsby, 1986; Tınar, 2006).

Mirasidyumun yumurtayı terk edişinden metaserkerlerin oluşmasına kadar geçen süre en uygun (optimum) koşullarda en az 4-7 haftadır. Yumurta içinde mirasidyumun gelişmesi için çevre sıcaklığının 10–30°C arasında olması gerekir. Ortamın ısısı 10°C ve altına düşerse gelişme durur. Yumurtanın gelişmesi için en uygun sıcaklık 25-28°C arasındır. (Güralp, 1981; Soulsby, 1986).

Son konaklar tarafından ağız yoluyla alınan metaserkerlerin kistten kurtulmalarında çiğneme ve midenin çalkalama hareketleri ile birlikte enzimatik faaliyetler etkilidir. Genç kelebekler ya bağırsak duvarını delerek periton ya da kan yoluyla karaciğere ulaşırlar. Parankim hücrelerini yiyerek tünel kazan parazitlerin parankimadaki göç süresi yaklaşık 7-8 haftadır. Bu sırada parazitler safra kesesine gider burda eşeyssel olgunluğa ulaşarak yumurta çıkarmaya başlarlar. Bunların safra kanallarına girmesinden yumurtlamaya başlamalarına kadar geçen süre yaklaşık 4 haftadır. Bu durumda metaserkerlerin alınmasından parazitlerin yumurta çıkarmaya başlamasına kadar geçen süre (prepatent süre) yaklaşık 10-12 haftadır. *Fasciola hepatica*'nın tüm biyolojisini (Şekil 3) tamamlayabilmesi için optimum koşullarda en az 17–18 haftaya gereksinimi vardır (Güralp, 1981; Soulsby, 1986; Tınar, 2006).

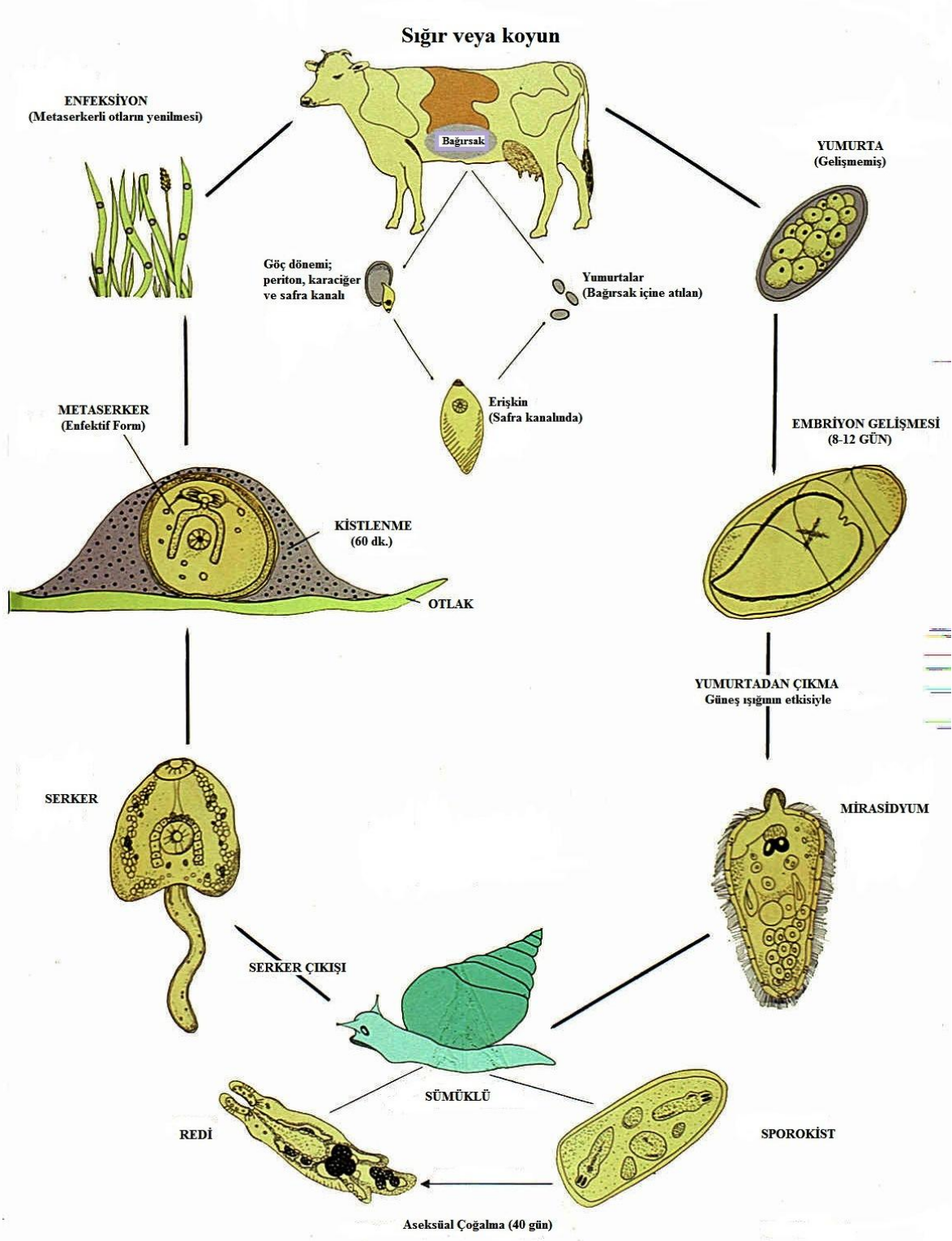
Fasciola hepatica safra yollarında yıllarca yaşayabilir, bu süre konak türüne göre değişir. Örneğin; koyunlarda 11 yıla kadar yaşar. Fakat sığırlarda yaşam süresi bir yıldan kısadır. Sığırlarda uzun süre yaşayamamasının nedeni dokusal reaksiyonun

kuvvetli olması sonucu safra kanallarının kalınlaşması ve kireçlenmesi nedeniyle beslenmenin olmamasıdır. (Güralp, 1981; Soulsby, 1986; Tınar, 2006).

Fasciolosis bir mera hastalığıdır. Metaserkerlerin soğuk ortamda canlı kalma süreleri daha uzundur. Ilıman iklime sahip ülkelerde kar altında kışı canlı geçirirler. Hayvanlar, hastalığa merada metaserkerli otları yiyerek yakalanırlar. Etkenler kışı son konaklarda erişkin olarak, merada yumurta içinde, sümüklü içinde veya otlara yapışmış metaserker olarak geçirir. Fasciolosis epizootiyolojisinde arakonak sümüklülerin aktif ve metaserkerlerin merada yoğun olduğu ilkbahar ve sonbahar enfeksiyonları önemlidir.

Ara konakların gelişmesine uygun alanların yaygınlığı: Bunlar tatlı sularda ve bazen çamurda yaşarlar. Bu sümüklülerin yaşama yerleri bataklık araziler, göl veya nehirlerin taşmaları sonucu kenarlarında oluşan çamurlu bataklık alanlar, hayvanların ve insanların ayak, kamyon ve traktörlerin tekerlek izleriyle oluşan içleri suyla dolu çukurcuklardır. Yaz sonu kuraklığın başlamasıyla birlikte ottan zengin sulak bölgelere göç ederler. Hayvanlarda otlamak için buralara gelirler.

Yağışlar ve toprağın nemi: Yağışlar, ara konakların gelişmesine uygun yerlerin artmasına ve bu alanların korunmasına olanak sağlar. Yağmurların kesilmesi sonucu bu tip alanlar kurumaya başlar. Bu gibi durumlarda ise salyangoz çamura gömülerek yaz uykusu dönemine girerler. Arakonakların yaşaması için en uygun topraklar killi topraklardır. Tuzlu topraklar bu sümüklülerin yaşamasına elverişli değildir. Serkerlerin sümüklüden çıkması için sulu ortama gerek vardır (Güralp, 1981; Soulsby, 1986; Tınar ve ark., 2003).



Şekil 3. *Fasciola* spp.'nin biyolojisi (Anonim, 2016c)

Çevre sıcaklığı: Sıcaklık 25-30 °C olursa yumurta içinde mirasidyumun, sümüklülerin ve sümüklü içindeki larva dönemlerinin gelişmesi en hızlı şekilde olur. Çevre sıcaklığı 10 °C ve altına düşerse bütün bunların gelişmesi tamamen durur. Kışın ise çevre ısısının -4 °C'ın altına düşmesi parazitlerin yumurtalarını, metaserkerlerini ve arakonaklarını öldürür (Güralp, 1981; Soulsby, 1986; Cruz-Mendoza ve ark., 2004).

4-Ruminant popülasyonunun yoğunluğu ve çeşidi: Ara konakların bulunduğu sulak arazilere fazla sayıda hayvan sokulması konak parazit ilişkisini sıklaştırır.

5-Erişkin parazitlere karşı ilaç baskısı: Son konaktaki parazitin koyun ve sığırlarda henüz yumurtlamaya başlamadan önce yapılacak ilaç uygulamaları yörede enfeksiyon yoğunluğunu azaltır (Güralp, 1981; Soulsby, 1986; Tınar, 2006).

2.3. Fasciola Türlerinin Yayılışı

Dünyanın farklı bölgelerinde sığırlarda fasciolosis'in prevalansına yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır (Gupta ve Singh, 2002; Dhand ve ark., 2004; Yadav ve ark., 2007, 2008). Örneğin; Kuzey Hindistan'da %10.9 (Garg ve ark., 2009), Pakistan'da %25.5 (Khan ve ark., 2009), Fransa'da %75 (Dorchies ve ark., 1988), Yunanistan'da %4.9 (Liakos, 1985), İtalya'da %11.1 (Cringoli ve ark., 2002), Brezilya'da %75 (Buseti ve ark., 1983), İsviçre'de %54 (Hauser, 1977), Irak'ta %3.3 (Mahdi ve Al-Baldawi, 1987), Kamerun'da %45.6 (Nfi ve Alonge, 1987), Libya'da %65 (Amer ve Ahmed, 1980) ve Azerbaycan'da %14.5 oranlarında yaygınlığı olduğu bildirilmiştir (Melikov ve Sadyhov, 1981). Son olarak 2014 yılında Nijerya'da %27.7 (Magaji ve ark., 2014) ve aynı yıl İran'da yapılan çalışmada %3.68 (Khoramiana ve ark., 2014) oranında bulunmuştur.

Türkiye'de sığırlarda fasciolosis ile ilgili çalışmalar az sayıda olup, yapılan çalışmalar genellikle konvansiyonel yöntemler ile yapılmıştır. Dışkı muayenesi ve mezbaha çalışmalarına göre sığırlarda fasciolosis'in Samsun ve Ordu'da %0,5-17 (Celep, 1984), Kuzey Doğu Anadolu Bölgesi'nde %40,85 (Kurtpınar, 1957), Elazığ'da %1,56 (Kaplan ve Başpınar, 2009) ve Van'da %54 (Toparlak ve ark. 1989), Malatya'da % 5.45 (Kara ve ark., 2009) oranında rastlandığı kaydedilmiştir.

Türkiye’de sığırlarda fasciolosis’in yayılışı ile ilgili ELISA çalışmaları oldukça azdır. ELISA yöntemi kullanılarak sığırlarda fasciolosis Kayseri’de %65.2 (Yıldırım ve ark., 2007), aynı ilin farklı ilçelerinde %69.2 (Yavuz ve ark., 2007), Elazığ yöresinde %55 (Şimşek ve ark., 2003) ve Derinkuyu (Kayseri) ilçesinde %3.03 oranında bulunmuştur (Şen ve ark., 2011).

2.4. Fasciola Türlerinin Patogenezi ve Klinik Bulgular

2.4.1. Patogenez

Fasciolosis’de tahribat genç kelebekler tarafından karaciğer parankimasında, erişkinler tarafından ise safra kanallarında meydana gelir. Enfeksiyonun patojenezi konağın türüne, parazitin karaciğerdeki gelişme dönemlerine ve alınan metaserker sayısı ile yakından ilişkilidir.

Koyunlarda patogenez: Çok sayıda genç parazitlerin parankimada tüneller açarak ve kan damarlarına hasar vererek göç geçirmesi, safra kanallarında bulunan olgun kelebeklerin, safra yollarını tıkaması ya da irrite etmesi mekanik etki oluşturmaktadır. Parazitin ekstret ve sekretleri toksik etki oluşturmaktadır. Ergin parazitlerin kan ile beslenmesi nedeniyle hayvanda bir makrositik anemi oluşabilir. Bazı durumlarda aşırı kanamadan dolayı hayvan birdenbire ölebilir. Hayvan yaşarsa bu alanlar fibrosis ile iyileşir. Enfeksiyonun buraya kadar olan kısmına akut fasciolosis denir. Parazitin safra kanallarında olgulaşma geçirmesinden sonraki dönemi kronik fasciolosistir. Kronik fasciolosis akut ve subakut dönemlerini atlatan hayvanlarda veya az sayıda uzun süre metaserkerin alınması sonucu akut enfeksiyon tablosu gerçekleşmeden şekillenir. Parazitlerin safra kanallarına yerleşmesi, safra kanallarının epitelyum katında hiperplazi veduvarında kalınlaşma görülmektedir. Safra kanallarının yapısının bozulması, plasma proteinlerinin ve albümin geçirgenliğinin artmasına ve bağırsaklar yoluyla dışarı atılmasına neden olur. Buna bağlı olarak da kanda albumin düzeyi düşer. Bu durum vücutta özellikle çene altı ödemlerin oluşmasına ve kilo kaybına neden olur (Behm ve Sangster, 1999).

Sığırlarda patojenez: Sığırlarda *Fasciola* enfeksiyonlarına karşı özel bir direnç dikkati çeker. Bu durumda; karaciğerde var olan parazitlerin yaşama şansları azalır,

genç erişkinlerin karaciğerde geçirdikleri göç yavaşlar. Sonuç olarak karaciğerde yerleşen parazit sayısı azalır. Bu nedenden dolayı hastalık bir yaşından büyük sığırlarda akut değil kronik seyreder. Bu hayvanlarda konakçı reaksiyonu fazla olduğundan parazitler safra kanalları içinde ölür. Safra kanallarında fibrozisi takiben koyunlardan farklı olarak kalsiyum ve fosfor içeren hidroksil apatit kristalleri oluşmakta ve safra kesesinin genişlediği bildirilmektedir (Topaklak ve Tüzer, 2002; Schinieder, 2006).

2.4.2. Klinik Belirtiler

Akut fasciolosis: Kısa sürede çok fazla sayıda metaserkerin alınmasıyla oluşmaktadır. Bataklık alanlarda otlayan hayvanlar bir iki gün içinde klinik belirti göstermeden ölür. Nekropside karaciğer yüzeyinde fibrinli membranlar, karaciğerin büyümüş, karın boşluğunda fazla miktarda kanlı bir sıvı toplandığı gözlenmektedir. Enfekte hayvanlarda klinik bulgular olarak iştahsızlık, depresyon, palpasyon sırasında karın bölgesinde ağrı görülmektedir. Nekropside karın boşluğunda kanlı ve fibrinli bir sıvı vardır. Karaciğer büyümüş ve hemorajiktir. Genç erişkinlerin göç yollarından dolayı oluşan tüneller gözlenmektedir (Güralp, 1981; Behm ve Sangster, 1999).

Kronik fasciolosis: Hayvanlarda rastlanan en çok form olup, az sayıda metaserkerin uzun sürede alınmasıyla oluşmaktadır. Klinik olarak hayvanlarda anemi, iştahsızlık, çene altı ödemi ve karın bölgesinin şişkinliği dikkati çeker. Hayvanlarda protein, karbonhidrat ve mineral madde metabolizmalarını bozarak süt veriminde düşüklük, döl veriminde azalma ve yapağı dökülmesi görüldüğü bildirilmektedir. Nekropside kronik kolanjit ve farklı tipte hepatik fibrozis tablosu görülmektedir. Safra kanallarının epitelyum katında hiperplaziye, yangısal reaksiyona bağlı olarak duvarında kalınlaşma görülmektedir. Safra kanalları ve safra kesesi içinde olgunlaşmış erişkin kelebekler bulunur. Sığırlarda koyunlardan farklı olarak safra kanallarında kireçlenme vardır (Güralp, 1981; Burgu ve Öge, 2003).

2.5. Fasciolosis'de Tanı

Hastalığın tanısında klinik semptomlar, nekropsi bulguları, dışkı muayenesi, biyokimyasal analizler ve serolojik yöntemlerden faydalanılmaktadır (Urquhart ve ark., 1987; Kassai, 1999).

2.5.1. Klinik ve otopsi bulguları

Hayvanlarda hastalığın teşhisi klinik bulguların yanında laboratuvar sonuçlarıyla desteklenmesi gerekmektedir. Akut enfeksiyon sonucu ölen hayvanların nekropsisinde karın boşluğunda kanlı sıvı birikimi ve fibrinli peritonit görülmektedir. Karaciğer büyümüş ve gevrek yapıda olup kesit yüzeylerinde göç izleri bulunmakta, parankiminde genç kelebeklere rastlanmaktadır. Bu tip olayların görülmediği hafif seyreden akut olaylarda ise hayvanlar istahsız, durgun olup solunum güçlüğü, soluk mukoz membran, karında şişkinlik, sürüden geri kalma ve yürümede zorluk gözlenmektedir. Palpasyonda sternum gerisinde hassasiyet görülmekte, halsiz olan hayvanlar yere yığılmakta ve enfeksiyonun şiddetli seyrettiği durumlarda 2–3 hafta içerisinde ölümler meydana gelmektedir. Ölen hayvanlar çoğunlukla göğüs üzerine yatmış ve burun toprağa temas etmiş halde karakteristik şekilde bulunmakta bazen, ağız veya burundan kan gelebilmektedir (Güralp, 1981; Behm ve Sangster, 1999).

Kronik fasciolosis, akut fasciolosis'i atlatan ya da uzun sürede daha az metaserker alan ve genellikle bir yaşından büyük hayvanlarda görülmektedir. Klinik olarak koyunlarda anemi, iştahsızlık, kilo kaybı, çene altında bölgesinde yangısız ödem görülmektedir. Koyunların yünleri kolay kırılır hal almakta ve dökülmektedir. Sığırlarda enfeksiyon çoğu zaman asemptomatik seyretmekle birlikte kilo kaybı, anemi ve submandibular ödem görülebilmektedir. Nekropside safra kanalları kalınlaşmış ve kireçleşmiş görünümünde olup, karaciğerde fibröz doku artışı görülmektedir (Güralp 1981; Behm ve Sangster 1999).

2.5.2. Dışkı muayene yöntemleri

Dışkı muayenesi fasciolosis'in tanısında en çok kullanılan yöntem olup ancak dışkıda yumurtaların varlığı dışkı muayene yöntemleriyle en erken 10 ile 11. haftasından sonra görülebilmektedir. Genç parazitlerin karaciğer parankimasında göç geçirdiği erken dönemde enfeksiyonlar teşhis edilememektedir. Az sayıda parazitin oluşturduğu hafif enfeksiyonlardaki tekrarlanan dışkı bakılarında yumurtaların görülebildiği bildirilmektedir. *Fasciola* sp.'nin günden güne ve gün içinde yumurta atılımında ve sayısında değişiklikler gösterdiği için tek başına dışkı bakısı ile gram

dışkıdaki yumurta sayısının (epg) enfeksiyonun gerçek durumu hakkında yeterli bilgi vermediği bildirilmektedir (Tınar, 1984).

Fasciola sp. yumurtaları ağır oldukları için özül ağırlığı düşük olan sıvılarda, yüzmeleri mümkün olmamakta bu nedenle dışkıların sedimantasyon (Benedek, modifiye McMaster) yöntemi ile incelenmeleri önerilmektedir. Bununla birlikte çinko sülfat (ZnSO₄) gibi yoğunluğu fazla olan yöntemlerde yapılabilmektedir. Fasciolosis tanısında yumurtaların görülmesi tanıda spesifik olmakta ancak, *F. hepatica* ve *F. gigantica*'nın yumurtalarını ayırmak mümkün olamamaktadır (Şenlik, 2011).

2.5.3. Biyokimyasal analizler

Parankim ve safra kanalı hücrelerinde bulunan bazı enzimlerin fasciolosis'te büyük oranda artış göstermesinden yararlanarak laboratuvarında ticari kitlerle kandaki konsantrasyonları belirlenebilmektedir. Elde edilen değerler tek başına kesin tanıya götürmese de normal değerlerle karşılaştırılarak hastalığın varlığı, sebebi ve şiddeti konusunda bilgi alınabilmektedir (Dorchies, 2007).

2.5.4. Serolojik testler

Dışkı muayene yöntemi, hematolojik ve biyokimyasal testlerin tanıdaki dezavantajlarını ortadan kaldırabilmek amacıyla antikor ya da antijen arayan çeşitli immuno-serolojik yöntemler geliştirilmiştir. Bu amaçla indirekt hemagglütinasyon, indirekt floresan antikor ve ELISA gibi antijen ve antikor arayan birçok test kullanılabilir. Bu testler arasında ELISA testi erken dönemlerde tanıya imkân sağlaması, pratik olması ve sürü taramalarında kolaylıkla uygulanabilmesi nedeniyle daha çok tercih etmektedirler (Dorchies, 2007).

2.6. Fasciolosis'de Tedavi ve Kontrol

2.6.1. Tedavi

Fasciola türlerine karşı halojenli fenoller, salisilanilidler, bromsolanlar, probenzimidazoller, sulfonamidler ve fenoksialkenler grubundan değişik ilaçlar tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Genç dönemlere karşı Fasciolosis'e karşı sağaltım amacıyla kullanılan ilaçlar baskılayıcı olmayan (nonsuppressif) olarak kullanılır. Bunun amacı

linik belirtiler gösteren hayvanları tedavi etmek böylece verim kayıplarının önüne geçmektir. Değişik ülkelerde tedavi amacıyla kullanılan triklabendazol, rafoksanid ve klosantel'e karşı direnç geliştiği bildirilmektedir. Ancak Türkiye'de ise henüz bir direnç olgusu bildirilmemiştir (Çırak, 2003).

Triclabendazole: Thiobenzimidazole türevi olan bu ilaç, 15 mg/kg dozda 1 günden itibaren gen *F. hepatica*'lara % 98-100; 2.5 mg/kg dozda 14 haftalıktan büyüklere % 98-100 etkili olmaktadır. Genel olarak akut ve kronik fasciolosiste keçilere 5, koyunlara 10, sığırlara ve atlara 12 mg/kg dozlarda önerilir.

Rafoxanide: Sığır ve koyunlara ağız yoluyla 7.5 mg/kg, derialtı yolla 3 mg/kg dozda verildiğinde 7-14 haftalıktan itibaren *F. hepatica* ve *F. gigantica*'ya % 91-99; 10-15 mg/kg dozlarda ise 4-6 haftalıklara % 50-90 etkili olmaktadır.

Netobimin: Albendazolün probenzimidazolü olan bu ilaç 20 mg/kg dozdan itibaren erişkin parazitlere etkilemektedir.

Albendazole ve oxfendazole: Koyunlara 7.5, sığırlara 15 mg/kg dozlarda kullanıldığında olgunlara yüksek düzeyde etkili olmaktadır.

Diamphenethide: Koyunlarda 100 mg/kg dozda kullanıldığında bir günden itibaren dokuz haftalığa kadar olan genç *F. hepatica*'lara % 91-100 oranında etki göstermektedir (Mehlhorn, 2001).

2.6.2. Kontrol

Fasciolosis'in kontrolünde başvurulan başlıca yöntemler konaktaki parazitlerin ilaç kullanmak suretiyle yok edilmesi, ara konaklarla mücadele ve son konakların enfekte alanlara girmesinin önlenmesi olarak bildirilmektedir.

1-Ara konaklarla mücadele: Salyangozların gizlendiği otları kesmek ve drenaj gibi yöntemlerle bu alanlar kurutulur. Bu en kesin ve kalıcı bir metottur. Arakonakları öldürmek için molluscisidler kullanılır. Bu yöntem ise geçici bir fayda sağlar. Bu amaçla kullanılan ilaçlar Niclosamide, Baylucide, bakırpentaklorfenat, bakır sülfat ve Frescon'dur. Ancak bu tip ilaçlar, çevreye ve diğer canlılara zarar verebilmektedirler. Bu sebeple böyle ilaçların kullanımında son derece dikkatli olmak gerektiği

unutulmamalıdır. Biyolojik mücadele çok pratik olmamakla birlikte özellikle ortamdaki salyangozları yiyen kaz ve ördekler kullanılabilir.

2. Son konakta erişkin parazite yönelik ilaç kullanımı: Bu şekilde ilaçlama meranın yumurta ile kontaminasyonunu engeller, konağı akut ve kronik fasciolosis'in zararlı etkilerinden korur. Ayrıca son konakların enfekte alanlara girmesinin engellenmesiyle enfeksiyon riski önlenebilir (Toparlak ve Tüzer, 2002; Schinieder, 2006).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Sığırlardan toplanan dışkı örneklerinde *Fasciola* türleri sedimentasyon-çinko sülfat flotasyon yöntemi ile belirlenerek dışkıda koproantijen tayini yapılmıştır.

3.1. Çalışma Sahası ve Örneklerin Toplanması

Bu araştırma, Nisan-Haziran 2016 tarihleri arasında sığırlardan dışkı örnekleri toplanarak yapılmıştır. Bu amaçla Van merkezde yetiştirilen ve rastgele usulle seçilen, tamamı meraya çıkmış, toplam 140 sığırdan alınan dışkılar çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Hayvanların yerleşim yerleri, yaş, cinsiyet ve ırk özellikleri hayvanların sahiplerinden öğrenilerek kayıt edilmiştir. Bu amaçla her hayvanın rektumundan yaklaşık 50-100 gr dışkı, dışkı poşetlerine konulup numaralandırılarak ve incelenmek üzere Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na getirilmiştir. Alınan örnekler laboratuara getirilerek incelenene dek 4 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 4. Araştırma materyalinin toplandığı yerleşim yerlerinden bir görüntü

3.2. Dışkı Örneklerinin İncelenmesi

3.2.1. Parazitolojik muayene

Sığırlardan alınan dışkı örneklerinde *Fasciola* spp. yumurtalarının aranması amacıyla sedimentasyon-çinko sülfat flotasyon metodu kullanılmıştır (Charlier ve ark., 2008). On gram dışkı örneği tartıldıktan sonra 200 ml su ile bir kaptaki karıştırılmıştır. Bu karışım bir süzgeç vasıtasıyla üç kez süzülerek bir behere aktarılmıştır. Daha sonra karışım 30 dakika süre ile beher içerisinde çökmeye bırakılmıştır. Süre sonunda karışımın dipteki tortu kısmı karıştırılmadan üst kısmı dökülmüştür. Dipteki tortu kısmı santrifüj tüpüne aktararak üst kısmına kadar çeşme suyu ve yumurtaların partiküllerden kolay ayrışmasını sağlamak için birkaç damla Tween 20 ilave edilmiş ve 1400 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlemden sonra süpernatant dökülmüş ve tortunun üzerine doymuş çinko sülfat (ZnSO₄) solüsyonu ilave edilerek 800 rpm de 3 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden çıkarılan tüplerin üzerine bombe oluşturacak şekilde tekrar çinko sülfat solüsyonu eklenerek üzerlerine lamel kapatılmış ve 5 dk beklenmiştir. Süre sonunda lameller alınarak lam üzerine yerleştirilmiş ve x100 büyütmede mikroskop altında yumurtalar yönünden incelenmiştir.

Fasciola spp. yumurtaları yönünden pozitif saptanan dışkı örneklerinde gram dışkıdaki yumurta sayısı (EPG) modifiye McMaster sedimentasyon yöntemi ile belirlenerek ve aşağıdaki formüle göre hesaplama yapılmıştır (Conceição ve ark., 2002).

$$\text{EPG} = \frac{\text{Toplam yumurta sayısı}}{\text{Kamera sayısı}} \times \frac{50\text{ml}/10\text{gr}}{0.15\text{ml}}$$

Modifiye McMaster Sedimentasyon Yöntemi

- 10 gr dışkı örneği 60 ml %5 Tween 20 solüsyonu ile bir havanda homojenize edildi.
- Bir süzgeç vasıtasıyla 1 lt beherlere aktarılan karışımın üzerine çeşme suyu ilave edilerek 10 dk çökmeye bırakıldı.

- Süre sonunda süpernatant dökülerek üzerine tekrar çeşme suyu ilave edildi ve bu işlem 4 kez tekrar edildi.
- Son işlemde sonra süpernatant atılarak çökelti 50 ml test tüplerine alındı ve üzeri çeşme suyu ile tamamlandı.
- İyiye karıştırılan tüplerden McMaster sayım kamerasının gözlerine örnekler alınarak *Fasciola* yumurtaları yönünden mikroskop altında incelendi.

3.2.2. ELISA metodu (Enzim Linked Immunosorbent Assay)

Önce sedimentasyon-çinko sülfat flotasyon yöntemi ile incelenmiş olan örnekler daha sonra BIO-X *Fasciola hepatica* Antigenic ELISA Kiti (BIO K 201, Jemelle-Belçika) ile üretilen firmanın önerdiği biçimde *F. hepatica* koproantijenleri yönünden incelenmiştir. Hazırlanan mikroplytler ELISA okuyucusunda (Bio-Tek Instruments, MicroQuant mikroplyt reade) 450 nm dalga boyunda okutulmuştur.

Fasciola hepatica yumurtaları için spesifik antikorlar tarafından sensitive edilmiş 96 kuyucuklu mikroplytleri kullanılan bir testtir. Bu antikorlar dışkı örneklerinde mevcut olan patojenlerin spesifik yakalanmasına müsaade etmektedir. A, C, E ve G sıraları bu antikorlarla kaplanmıştır ve B, D, F ve H sıraları spesifik olmayan antikorları (kontrol kuyuları) içermektedir. Bu kontrol sıraları spesifik immunolojik reaksiyon ile non-spesifik bağlanmaları ayırt etmeyi sağlamaktadır. Böylece, yanlış pozitiflerin büyük bir çoğunluğu elimine edilir.

Her bir örnek için 2 gr diskı 2 ml dilüsyon buffer ile bir test tüpünde karıştırılarak 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant toplanarak kullanılabilecek şekilde -20 °C'de muhafaza edilmiştir. ELISA testi yapılacağı zaman örneklerden ve pozitif kontrolden 100 µl mikroplytlerin gözlerine ikişerli olarak Şekil 5'deki gibi eklenmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S5	S9	S13	S17	S21	S25	S29	S33	S37	S41	S45
B	S1	S5	S9	S13	S17	S21	S25	S29	S33	S37	S41	S45
C	S2	S6	S10	S14	S18	S22	S26	S30	S34	S38	S42	S46
D	S2	S6	S10	S14	S18	S22	S26	S30	S34	S38	S42	S46
E	S3	S7	S11	S15	S19	S23	S27	S31	S35	S39	S43	S47
F	S3	S7	S11	S15	S19	S23	S27	S31	S35	S39	S43	S47
G	S4	S8	S12	S16	S20	S24	S28	S32	S36	S40	S44	PK
H	S4	S8	S12	S16	S20	S24	S28	S32	S36	S40	S44	PK

Şekil 5. Örneklerin mikropleytlere konulması; 1-47: dışkı örneklerinden hazırlanan ekstraktlar, PK: pozitif kontrol

Kitin uygulanmasında aşağıdaki aşamalar izlenmiştir.

1- Tüm malzemeleri (solüsyonlar + pleyt) kullanmadan en az yarım saat önce oda ısısına (+21 C⁰, +- 3 C⁰) çıkartılmıştır.

2- Yıkama solüsyonunu 20 kat distile su ile seyreltildi. Dilüsyon buffer solüsyonu ise 5 kat distile su ile seyreltildi.

3- Dışkı örnekleri 2 gr dışkı 2 ml dilüsyon buffer ile sulandırıldı ve dilue edilmiş örnekler her bir göze 100 mikrolitre aşağıda tarif edildiği şekilde konuldu;

- ❖ 1.örnek A₁ ve B₁ gözlerine; yani 1 numaralı örnekten önce 100 mikrolitre bir pipet yardımıyla alınıp önce A₁ (S1) gözüne, sonra aynı örnekten tekrar 100 mikrolitre çekilerek B₁ (S1) gözüne konuldu.

- ❖ Sonra pipet ucu değiştirilip 2.örnekten alındı. Yukarıdaki gibi 2. Örnekte C_1 ve D_1 gözlerine konuldu. Bu işlem tüm örnekler bitene kadar sırayla yapıldı.
- ❖ 0.5 ml distile su ile seyreltilen pozitif kontrol örneği hafifçe çalkalandıktan sonra 100 mikrolitre sıradaki gözlere konuldu.

4- Numuneler pleytlere konulduktan sonra pleytin üstü alüminyum folyo ile kapatılarak oda ısısında pleyt çalkalayıcı (shaker) ile 1 saat inkübasyona bırakıldı.

5- İnkübasyondan sonra pleyt daha önce (2 numaralı aşamada açıklandığı gibi) hazırlanmış olan yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.

6- Uygun oranda sulandırılmış biotinle isaretili anti- F. hepatica konjugatından her göze 100 mikrolitre olacak şekilde tüm gözlere eklendi ve yine plakanın kapağı kapatılarak oda ısısında pleyt çalkalayıcı (shaker) ile 1 saat inkübe edildi.

7- Pleyt tekrar yıkandı.

8- Uygun oranda sulandırılmış avidine- peroxidase konjugatından her göze 100 mikrolitre olacak şekilde tüm gözlere eklendi ve yine plakanın kapağı kapatılarak oda ısısında pleyt çalkalayıcı (shaker) ile 1 saat inkübe edildi.

9- Pleyt tekrar yıkandı

10- Pleyte, substrat eklendikten sonra oda ısısında 10 dakika karanlık bir ortamda inkübe edildi.

11- Her göze 50 mikrolitre kullanıma hazır stop solüsyonu eklendi.

10- Renk değişimi 450 nm filtre kullanarak ELISA okuyucusunda okutuldu.

3.2.3. ELISA test sonuçların değerlendirilmesi

Her bir örnek için net OD değerini, pozitif kuyucuktaki (A_1 mesela) OD değerinden onun eşi olan negatif kuyucuktaki (örneğin B_1) OD değerinin çıkarılmasıyla hesaplanmaktadır. (A_1 'de ki OD- B_1 'de ki OD = örneğin net OD okuma değeri). Bu test

pozitif kontrol antijeni ile elde edilen OD 'nin veri sayfasında (1 numaralı değer=0,800) verilen değerden büyük olması halinde geçerli kabul edilir. Daha sonra her bir örnek için elde edilen NET OD değerleri aynı plakada yürütölen NET pozitif kontrol antijen OD değerine bölünür ve 100 ile çarpılarak yüzde pozitivite hesaplanır.

$$[\% \text{ pozitifite} = \text{NET OD (örnek)} / \text{NET OD (pozitif kontrol)} * 100]$$

Daha sonra %8 'in üzerindeki pozitif olan örnekler (+), dięerleri (-) olarak belirlenir.

3.3. İstatistiksel Analiz:

Verilerin istatistiksel analizleri, gruplar arasındaki farkın anlamlılık derecesine göre SPSS paket programı kullanılarak, $p < 0.05$ anlamlı kabul edilip veriler değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1 Anket Sonuçları

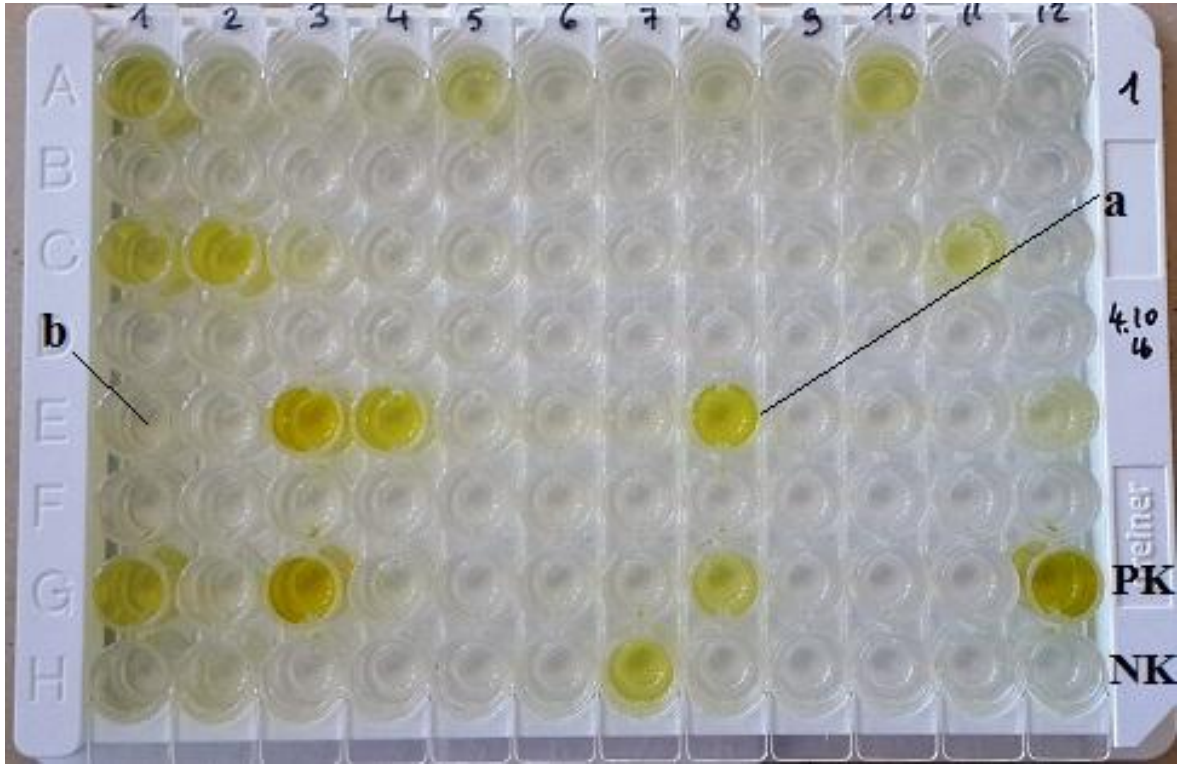
Fasciolosis yönünden incelemesi yapılan sığırların yaş, cinsiyet, ırk ve yerleşim yerine göre dağılım oranları Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. İncelenen sığırların yerleşim yerine, yaş, cinsiyet ve ırkına göre dağılımı

Yerleşim Yeri	İncelenen sığır sayısı								
	İrk			Yaş (yıl)			Cinsiyet		Toplam
	Simental	Montofon	Melez	1-2	3-5	≥6	Dişi	Erkek	
Topaktaş	-	17	9	6	17	3	26	-	26
İskele	5	6	12	11	8	4	23	-	23
Gülsünler	5	10	8	3	18	2	18	5	23
Emek	32	-	-	9	16	7	24	8	32
Bostaniçi	11	12	13	14	18	4	32	4	36
Toplam	53	45	42	43	77	20	123	17	140

4.2. Enfeksiyonun Prevalansı

Çalışmada incelemesi yapılan toplam 140 sığırdan 8 (%5,7) 'si sedimentasyon-çinko sülfat flotasyon metodu ile *Fasciola* spp. yumurtaları yönünden pozitif bulunmuştur (Şekil 6). Enfekte hayvanlarda gram dışındaki ortalama yumurta sayısı (EPG) 60,4 (16,6-100) bulunmuştur. Tablo 2'de görüldüğü gibi 140 sığırın 43'ünde (%30,7) *F. hepatica* kopro-antijenleri belirlenmiştir (Şekil 6). Fasciolosis'in araştırma bölgelerindeki sığırlarda, kopro-antijen ELISA ve dışkı bakısı yöntemlerine göre dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir.



Şekil 6. ELISA mikroyetki tablosunda pozitif (a) ve negatif (b) örnekler (PK: pozitif kontrol, NK: negatif kontrol)

Tablo 2. Sığırlarda fasciolosis'in Kopro ELISA ve dışkı bakı yöntemlerine göre dağılımı

Çalışma sahası	Bakılan sığır sayısı	Kopro ELISA (+) Dışkı Metodu (+)		Kopro ELISA (+) Dışkı Metodu (-)		Kopro ELISA (-) Dışkı Metodu (+)		Toplam	
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Topaktaş	26	1	3.8	7	26.9	-	-	8	30.8
İskele	23	2	8.7	5	21.7	-	-	7	30.4
Gülsünler	23	1	4.3	4	17.4	-	-	5	21.7
Emek	32	1	3.1	14	43.7	-	-	15	46.9
Bostaniçi	36	3	8.3	5	13.9	-	-	8	21.6
Toplam	140	8	5.7	35	25	-	-	43	30.7



Şekil 7. Enfekte sığır dışkısında saptanan *Fasciola* sp. yumurtası

4.3.İstatiksel Analiz Sonuçları

İncelemesi yapılan sığırlarda fasciolosisin prevalansının yaş, cinsiyet ve ırka göre dağılımı Tablo 3’de verilmiştir. Fasciolosis’in yaş gruplarına göre dağılımı incelendiğinde en yüksek prevalans % 41.9 ile 1-2 yaş sığırlarda belirlenmiş bunu % 31.2 ve % 5 ile 3-5 ve 6 yaş ve üzeri sığırlar izlemiştir. Yaş grupları ile enfeksiyona yakalanma oranları arasında önemli farklılıklar belirlenmiş ve bu fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Enfeksiyonun erkek sığırlarda % 35.3, dişilerde ise % 30.1 oranlarla daha yaygın olduğu görülmüş ancak bu farklılık istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Fasciolosis prevalansının ırka göre dağılımında en yüksek prevalans % 40 ile Montofon ırkında belirlenmiş bunu % 31 ile Melez ve % 22.6 ile Simental ırkları izlemiştir. Sığır ırkları arasında enfeksiyonun yayılışı açısından istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 3. Sığırlarda fasciolosis prevalansının yaş, cinsiyet ve ırkla ilişkisi

Faktör	İncelenen sığır sayısı	Enfektif sığır		χ^2	P
Yaş grupları		Sayısı	%'si		
1-2	43	18	41.9 ^a	8.732	0.013
3-5	77	24	31.2 ^b		
≥6	20	1	5 ^c		
Cinsiyet					
Erkek	17	6	35.3	0.191	0.662
Dişi	123	37	30.1		
İrk					
Montofon	45	18	40	3.447	0.178
Simental	53	12	22.6		
Melez	42	13	31		
Toplam	140	43	30.7		

^{a,b}: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılık önemlidir.

χ^2 : Chi-Square

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tüm Dünya’da olduğu gibi ülkemizde de sığır yetiştiriciliğinde paraziter hastalıkların önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir. Sığırlarda görülen paraziter hastalıklar arasında helmintler önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Ülkemiz çoğu helmint türlerinin gelişebilmesi açısından uygun iklim ve coğrafi özellikleri barındırmaktadır. Özellikle de ara konakçılığını *Lymnaea spp.* gibi salyangozların yaptığı *Fasciola* türleri geniş bir yayılışa sahiptir. Fasciolosis; *Fasciola hepatica* ve *Fasciola gigantica* trematodlarının çeşitli hayvan türleri ile insanların karaciğerlerinde oluşturduğu ve zoonotik karakterli bir hastalıktır. Fasciolosis’li hayvanlarda et, süt, yapağı ve döl verimi gibi çeşitli verim özelliklerinde önemli düşüşler görülmektedir (Şenlik, 2013). Değişik ülkelerde karaciğerde yapmış oldukları patojenite nedeniyle yıllık 2-3 milyar dolar ekonomik kaybın olduğu bildirilmektedir (Dorchies, 2007) .

Değişik ülkelerde bölgenin toprak yapısı, yağış miktarı, mevsim gibi birçok faktöre bağlı olarak hastalığın prevalansı da değişmektedir (Şenlik, 2013). Bu hastalığın sığırlarda yayılışı Kuzey Hindistan’da % 10.9 (Garg ve ark., 2009), Pakistan’da % 25.5 (Khan ve ark., 2009), Fransa’da % 75 (Dorchies ve ark., 1988), Yunanistan’da % 4.9 (Liakos, 1985), İtalya’da % 11.1 (Cringoli ve ark., 2002), Brezilya’da % 75 (Buretti ve ark., 1983), İsviçre’de % 54 (Hauser, 1977), Irak’ta % 3.3 (Mahdi ve Al-Baldawi, 1987), Kamerun’da % 45.6 (Nfi ve Alonge, 1987), Libya’da % 65 (Amer ve Ahmed, 1980), Azerbaycan’da % 14.5 (Melikov ve Sadyhov, 1981), Nijerya’da % 27.7 (Magaji ve ark., 2014) ve İran’da % 3.68 oranlarında olduğu belirlenmiştir (Khoramiana ve ark., 2014). Bu konuyla ilgili Türkiye’de yapılan çalışmaların çoğunluğu konvansiyonel metotlarla gerçekleştirilmiş (Toparlak ve ark., 1989; Kara ve ark., 2009) olmakla birlikte yaygınlığın belirlenmesi amacıyla yapılmış serolojik çalışmalar da bulunmaktadır (Yavuz ve ark., 2007; Yıldırım ve ark., 2007; Şen ve ark., 2011). Türkiye’nin değişik yörelerinde fasciolosis’in farklı teşhis tekniklerine (dışkı, nekropsisi veya seroloji) göre sığırlardaki yaygınlığı % 0.5 ile % 69.2 arasında değiştiği bildirilmektedir (Celep ve akr., 1984; Yavuz ve ark., 2007; Yıldırım ve ark., 2007). Genel olarak bu çalışmalarda *F. hepatica*, *F. gigantica*’ya oranla daha yaygın olduğu görülmektedir (Yıldırım ve ark., 2007). Van ilinde sığırlarda fasciolosis’in yayılışını serolojik yöntemlerle belirlemek amacıyla yapılmış herhangi bir çalışmaya

rastlanmamıştır. Bu çalışma, Van'da fasciolosis'in teşhisinde dışkıda (koproantijen) ELISA tekniğinin kullanıldığı ilk araştırmadır. Bu çalışma ile sığırlarda fasciolosis yaygınlığının kopro antijen ELISA ile % 30.7, sedimentasyon-çinko sülfat flotasyon tekniği ile yapılan dışkı yönteminde ise % 5.7 olduğu ortaya konmuştur. Bu sonuçlar Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden bildirilen bazı bulgular (Kurtpınar, 1957; Celep ve ark., 1990) ile paralellik göstermekle birlikte, küçük farklılıkların olduğu, bunun sebebini de araştırmaların farklı illerde yapılmış olmasından kaynaklandığı kanaatine varılmıştır.

Fasciolosisin prevalansını etkileyen risk faktörlerinin başında hayvanların yaşı gelmektedir. Enfeksiyon riskinin yaş faktörü ile ilgili olarak değişkenlik gösterdiği kaydedilmekle birlikte (Maqbool ve ark., 2002; Holland ve ark., 2005; Yavuz ve ark., 2007; Rezaul ve ark., 2015; Mufti ve ark., 2015), genellikle yaşın artması ile orantılı olarak enfeksiyon oranının artış gösterdiği, özellikle 2 yaş üzerinde daha yaygın olduğuna dikkat çekilmektedir. Sığırlarda fasciolosisin prevalansı en yüksek 3 yaş üzeri yaşlı hayvanlarda rastlanmaktadır (Sanchez-Andrade ve ark., 2002; Yıldırım ve ark., 2007; Mufti ve ark., 2015; Rezaul ve ark., 2015). Bu çalışmada sığırların yaş gruplarına göre en yüksek prevalans 1-2 yaş grubunda % 41.9 saptanmış bunu % 31.2 ile 3-5 ve % 5 ile ≥ 6 yaş grupları izlemiştir. Yaş grupları arasında fasciolosis'in yaygınlığı istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu çalışmada yukarıdaki literatürlerin (Sanchez-Andrade ve ark., 2002; Yıldırım ve ark., 2007; Mufti ve ark., 2015; Rezaul ve ark., 2015) aksine genç hayvanlarda prevalans daha yüksek bulunmuş olup bu sonucun Dünya'da yapılmış bazı çalışmaların (Radostits ve ark., 1994; Petros ve ark., 2013; Addis ve ark., 2015) sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür. Fasciolosis'in yayılışının genç sığırlarda daha yüksek düzeyde olması, yaşlı sığırlarda kazanılmış bağışıklığın etkisi ya da safra kanallarının kalsifikasyonu sonucu parazitin olgunlaşmasının engellenmesi ile ilgili olabileceği açıklanmaktadır (Addis ve ark., 2015).

Sığırlarda *Fasciola* spp. enfeksiyonunda, cinsiyetin etkisinin olmadığı kaydedilmekte (Maqbool ve ark., 2002; Opara 2005; Şen ve ark., 2011; Petros ve ark., 2013; Addis ve ark., 2015) veya genel olarak bu parazite dişi sığırlarda erkeklerde daha çok rastlandığı bildirilmektedir (Yıldırım ve ark., 2007; Aliyu ve ark., 2014; Rezaul ve ark., 2015). Bu farklılığın dişilerin besiden ziyade daha çok süt amaçlı kullanılmalarından dolayı meraya daha fazla çıkmaları ve gebelik ve laktasyon boyunca

enfeksiyonlara yakanlanma riskinin artmasından kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Phiri ve ark., 2005; Aliyu ve ark., 2014). Buna karşı Mufti ve ark. (2015), erkek sığırlardaki yayılışı (% 76) dişi sığırlardan (% 45) daha yüksek bulmuşlardır. Bu çalışmada ELISA ile test edilen 17 erkek sığırın altısında (% 35.3) ve 123 dişi sığırın otuz yedisinde (% 30.1) dışkı pozitiflik belirlenmiştir. Yukarıdaki bazı çalışmaların sonuçları (Maqbool ve ark., 2002; Opara 2005; Şen ve ark., 2011; Petros ve ark., 2013; Addis ve ark., 2015) ile uyumlu olarak dişi ve erkek sığırlarda enfeksiyonun yayılışı istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$).

Şen ve ark. (2011), *Fasciola* spp. antijenlerini holstein ırkı sığırlarda % 3.48, simental ırkında % 2.81 ve montofon ırkında % 2.43 olarak belirlemişler ve ırka bağlı enfeksiyon oranlarında istatistiksel anlamda bir farklılık olmadığını kaydetmişlerdir. Yavuz ve ark. (2007), *Fasciola* spp. antikorlarını holstein ırkı sığırlarda % 68.6, simental ırkında % 76.9, montofon ırkında % 58.8 ve melzelerde ise % 70.9 olarak bulmuşlar ve ırka bağlı enfeksiyon oranlarında istatistiksel anlamda bir farklılık olmadığını kaydetmişlerdir. Benzer şekilde bu çalışmada montofon ırkı sığırlarda % 40, melez ırkında % 31 ve simental ırkında % 22.6 oranında *Fasciola* spp. antijenleri tespit edilmiş ve ırklar arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$).

Mezo ve ark. (2004), ELISA (monoklonal antikor-MM3) testini sığır ve koyunların dışkılarında *F. hepatica* antijenlerini belirlemek için kullanmışlardır. Test sonuçlarına bakıldığında *F. hepatica* yumurtası tespit edilmeyen sığır dışkılarında bile %38.8 pozitiflik belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar bu yöntemle ile fasciolosis hastalığını erken dönemlerinden itibaren saptanabileceğini ve aynı zamanda testin duyarlılığının çok yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Charlier ve ark. (2008), sığırlarda fasciolosisi belirlemek amacıyla kullandıkları koproantijen ELISA testinin duyarlılığını %94 olduğunu belirtmişlerdir. Şen ve ark. (2011), Nevşehir'in Derinkuyu ilçesinde 198 sığırını fasciolosis yönünden koproantijen ELISA ile incelemiş ve % 3.03 oranında pozitiflik belirlemişlerdir. Palmer ve ark. (2014), Batı Avustralya'da *F. hepatica* ile enfekte olan koyun, sığır ve atlarda copro ELISA yönteminin sensitivitesi ve spesifitesini araştırmışlar ve testin özgünlüğü % 100 bulunurken, duyarlılığını ise koyunlarda % 100, sığırlarda % 87 ve atlarda % 28 olarak bildirmişlerdir. Araştırmacılar copro ELISA yönteminin sığır ve koyunlarda fasciolosis varlığını belirlemek için

oldukça duyarlı olduğunu bildirmekte ancak atlar için duyarlılığın %30'un altında olması nedeniyle sedimentasyon yönteminin kullanılmasını tavsiye etmektedirler. Bu çalışmada, sığırlarda fasciolosis'in belirlenmesi amacıyla poliklonal antikolarla kaplı mikropleytlerde *F. hepatica*'nın dışkıdaki excret/secret antijenlerini tespit etmek için alternatif bir test olarak tanımlanan ELISA testi kullanılmıştır. Dışkı muayenesi ile % 5.7 oranında saptanan enfeksiyon kopro antijen ELISA ile % 30.7 oranında bulunmuştur. Bu sonuç, ELISA testinin dışkı bakısına göre daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

Fasciolosis'in teşhisinde dışkıda yumurtalar ancak parazitlerin olgunlaştığı dönemde, enfeksiyonun 10 ile 12. haftasından sonra görülebilmektedir. Bu dönemden önce yapılan rutin mikroskopik yöntemlerin (benedek sedimentasyon vs.) enfeksiyonun gerçek durumu hakkında yeterli bilgi vermediği bildirilmektedir (Şen ve ark., 2011). Bu bakımdan hastalığın erken teşhisinde serolojik testler kullanılmaya başlanmıştır. Bu testler içerisinde antikör aramaya dayalı olan ELISA tüm dünyada en çok kullanılan test olmuştur. ELISA'nın benzer immunojenik özellikler taşıyan parazitler ile çapraz reaksiyon verebilme durumunun ve geçmiş enfeksiyonlarda oluşan antikörlerle yeni enfeksiyonlarda oluşan antikörler arasında benzerlik göstermesinin kesin teşhiste zorluk oluşturduğu bilinmektedir. Bu nedenle dışkı ya da serumda antikör aramak yerine *Fasciola spp.* antijenlerinin araştırılması konağın parazit potansiyelini ve yapılan tedavinin başarısını önceden tahmin etmede kullanılabileceği bildirilmektedir (Hillyer, 1999).

Sonuç olarak bu çalışma ile Van merkezde yetiştirilen sığırlarda fasciolosisin varlığı ve prevalansı koproantijen ELISA tekniği ile ilk kez ortaya konmuştur. Duyarlılığı ve özgünlüğü yüksek olan koproantijen ELISA testinin kullanılması dışkı bakısı yöntemleri ile gözardı edilebilecek prepatent enfeksiyonlarda önem taşımaktadır. Bu testin özellikle fasciolosis açısından sürü muayenelerinde ve saha çalışmalarında dışkı muayenesinin yanında ek olarak kullanılmasının son derece önemli olduğu kanısına varılmıştır. Ayrıca bu çalışmada elde edilen enfeksiyon oranının, en son yapılan çalışma (Değer ve ark., 1992) tarafından belirlenen orandan biraz daha yüksek çıkması bu parazitin bu ilde sığırlarda yaygınlığını hala koruduğunu göstermektedir.

ÖZET

Bostancı A (2017), Koproantijen ELISA Yöntemi ile Sığırlarda Fasciolosis. Y.Y.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. Bu çalışma, Nisan-Haziran 2016 tarihleri arasında Van merkezde sığırlarda fasciolosisin yayılışını tespit etmek amacıyla toplam 140 sığır üzerinde yürütülmüştür. Dışkı örnekleri sedimentasyon-çinko sülfat flotasyon yöntemi ile parazitin yumurtaları yönünden incelenmiştir. Pozitif örneklerde gram dışkıdaki yumurta sayısı (EPG) modifiye McMaster sedimentasyon yöntemi ile belirlenmiştir. Dışkı örneklerinde *F. hepatica* antijenlerinin varlığı koproantijen-ELISA testi ile araştırılmıştır. Fasciolosisin dışkı bakışı ve ELISA testlerine göre prevalansı % 5.7 ve % 30.7 olarak saptanmıştır. Fasciolosis yayılışı en yüksek % 41.9 ile 1-2 yaş sığırlarda belirlenmiş bunu % 31.2 ve % 5 ile 3-5 ve 6 yaş ve üzeri sığırlar izlemiştir. Yaş grupları arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Dişi sığırlarda prevalans % 30.1, erkeklerde ise % 35.3 olarak belirlenmiş ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). İncelemesi yapılan sığır ırkları arasında en yüksek prevalans % 40 ile Montofon ırkında belirlenmiş bunu % 31 ile Melez ve % 22.6 ile Simental ırkları izlemiştir. Sığır ırkları arasında enfeksiyonun yayılışı açısından istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). Bu çalışma Van'da sığırlarda fasciolosis'in koproantijen ELISA tekniği ile araştırıldığı ilk çalışmadır.

Anahtar sözcükler: Fasciolosis, ELISA, Sığır, Prevalans, Van

SUMMARY

Bostancı A (2017), The Investigation of Fasciolosis in Cattle by Copro-ELISA. University of Yuzuncu Yil, Health Science Institute, Department of Parasitology, MSci Thesis. This study was carried out between April and June 2016 to determine the prevalence of fasciolosis in cattle in Van province. Fecal samples from 140 cattle were technically collected and examined by sedimentation-zinc sulphate flotation technique. Modified McMaster sedimentation technique was applied to the egg positive samples to determine the EPG values. *F. hepatica* coproantigens in samples were investigated by ELISA. The coprological and antigen ELISA prevalence of fasciolosis were determined as 5.07 % and 30.7 %, respectively. The highest prevalence of fasciolosis infection was observed in 1-2 age groups (41.9 %), and this prevalence was followed by 3-5 (31.2 %) and ≤ 6 age group (5 %). The differences between age groups were found significant ($p < 0.05$). The prevalence in female and male cattle was found as 30.1 % and 35.3 % This difference was not found statistically significant ($p > 0.05$). The highest prevalence was observed in Brown Swiss with the ratio of 40 % and this was followed by 31 % in Crossbreed and 22.6 % in Rubia Gallega. The differences among breeds were not statistically significant ($p > 0.05$). This study was the first investigation of bovine fasciolosis by coproantigen ELISA technique in Van province.

Key Words: Fasciolosis, ELISA, Cattle, Prevalence, Van,

KAYNAKLAR

- Abunna F, Asfaw L, Megersa B, Regassa A (2010). Bovine fasciolosis: coprological, abattoir survey and its economic impact due to liver condemnation at Soddo municipal abattoir, Southern Ethiopia. *Trop Anim Health Prod*, 42, 289-92.
- Addis G, Adina K, Jemberu A (2015). Prevalence and economic importance of bovine fasciolosis in Dembi Dolo municipal abattoir, south-western Ethiopia. *IJASVM*, 1, 33-36.
- Agatsuma T, Arakawa Y, Iwagami M, Honzako Y, Cahyaningsih U, Kang S, Hong S (2000). Molecular evidence of natural hybridization between *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Parasitol Int*, 49, 231-238.
- Akman, N, Aksoy F, Şahin O, Kaya ÇY, Erdoğan G (2007). Cumhuriyetimizin 100. Yılında Türkiye'nin Hayvansal Üretimi. Türkiye Damızlık Sığır Yetiştiriciliği Birliği Yayınları No: 4, Ankara.
- Aliyu AA, Ajogi IA, Ajanusiand OJ, Reuben RC (2014). Epidemiological studies of *Fasciola gigantica* in cattle in Zaria, Nigeria using coprology and serology. *Sch J Agric Vet Sci*, 1, 13-19.
- Anonim (2016a). <http://www.savalli.us/BIO385/Diversity/05.Platyhelminthes.html>. Erişim tarihi: Ekim 2016.
- Anonim (2016b). <https://tr.pinterest.com/pin/29203097559552990/> Erişim tarihi: Ekim 2016.
- Anonim (2016c). <http://www.southampton.ac.uk/~ceb/Insideafluke/Liverfluke.htm>. Erişim tarihi: Ekim 2016.
- Behm CA, Sangster NC (1999). Pathology, pathophysiology and clinical aspects, In Dalton J.P. (Ed) Fasciolosis. CAB International, Wallingford, UK, 185-224.
- Ben Amer KF, Ahmed Z (1980). Studies on the prevalence of liver flukes with special reference to *D.dendriticum* (Rudolphi, 1891) Looss, 1899 in sheep and cattle from Tripoli region. Libya. *Riu Parasitol*, 41, 19, 15-18.
- Burgu A, Öge S (2003). Klinik. In: Tınar R, Korkmaz M. Fasciolosis, Türkiye Parazitoloji Derneği, Yayın No:18, İzmir.
- Busetti ET, Paske A, Ruis MCE, Thomaz V, Golinelli A (1983). Helminth parasites of *Bubalis bubalis* in Parana State, Brazil. *Arq Brasüerio Med Vet Zootecnia*, 35, 3, 399-404.
- Celep A (1984). Samsun ve Ordu illeri ile ilçelerinde sığırlarda gaita muayene sonuçlarına göre tespit edilebilen helmintolojik bulgular ve perifer kan frotisi muayene sonuçları. *Etlik Vet Mik Derg*, 6, 106-112.
- Celep A, Açıcı M, Çetindag M, Coşkun SZ, Gürsoy S (1990). Samsun yöresi sığırlarında helmintolojik araştırmalar. *Etlik Vet Mik Derg*, 6, 117-130.

- Charlier J, De Meulemeester L, Claerebout E, Williams D, Vercruysse J (2008). Qualitative and quantitative evaluation of coprological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. *Vet Parasitol*, 153, 44-51.
- Conceição MAP, Duraõ RM, Costa IH, Correia da Costa JM (2002). Evaluation of a simple sedimentation method (modified McMaster) for diagnosis of bovine fasciolosis. *Vet Parasitol*, 105, 337-343.
- Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V, Capelli G, Malone JB (2002). A cross-sectional coprological survey of liver flukes in cattle and sheep from an area of the southern Italian Apennines. *Vet Parasitol*, 108, 2, 137-143.
- Cruz-Mendoza I, Figueroa J, Correa D, Ramos-Martinez E, Lecumberri-Lopez J, Quiroz-Lopez H (2004). Dynamics of *Fasciola hepatica* infection in two species of snails in a rural locality of Mexico. *Vet Parasitol*, 121, 87-93.
- Çırak VY (2003). Fasciolosis Tedavisi. In: Fasciolosis, Eds: Tınar R, Korkmaz M. Türkiye Parazitoloji Derneği yayımları, İzmir, 18, 143-62.
- Değer S, Akgül Y, Ağaoğlu ZT, Taşçı S (1992). Van ve yöresinde *Fasciola gigantica*'dan ileri gelen fasciolosis enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ve ekolojisi üzerinde araştırmalar. *Van Vet J*, 3, 133-140.
- Dhand N, Singh K, Aradhna J, Sandhu KS (2004). Fasciolosis in sheep and goats: An outbreak and treatment. *Vet Parasitol*, 18, 77-78.
- Dorchies P (2007). Comparison of methods for the veterinary diagnosis of liver flukes (*Fasciola hepatica*) in cattle. *Bulletin USAMV-CN*, 64, 1-2, 14-19.
- Dorchies P, Ducos L, Pangui LJ, Alzieu JP (1988). Prevalence of *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium lanceolatum* and *Linguatula denticulata* in cattle livers condemned at Pamiers abattoir (Ariege, France). *Rev Med Vet*, 139, 3, 307-309.
- Garg R, Yadav CL, Kumar RR, et al (2009). The epidemiology of fasciolosis in ruminants in different geo-climatic regions of North India. *Trop Anim Health Prod*, 41, 1695.
- Gupta, SC, Singh BP (2002). Fasciolosis in cattle and buffaloes in India, *Journal of Veterinary Parasitology*, 16, 139-146.
- Güralp N (1981). Helmintoloji, Ankara ÜnivVet Fak Yayın: 368, ikinci baskı, 1-36, Ankara.
- Hanna REB (1994). 6. Ultrastructure of helminths, Editors, Chowdhury N, Tada I, Helminthology. Narosa Publishing House, 160-210.
- Hauser R (1977). Epidemiology of fascioliasis in cattle in an endemic mountain region of Switzerland. *Vet Med Fakultät*, 33.
- Hillyer GV (1999). Immunodiagnosis of human and animal fasciolosis, Ed. JP Dalton, Fasciolosis. CABI publishing, Cambridge University Press, 435-443, UK.
- Holland WG, Luong TT, Nguyen LA, Do TT, Vercruysse J (2000). The epidemiology of nematode and fluke infections in cattle in the Red River Delta in Vietnam. *Vet Parasitol*, 93, 141-7.

- Itagaki T, Sakaguchi K, Terasaki K, Sasaki O, Yoshihara S, Van Dung T (2009). Occurrence of spermic diploid and aspermic triploid forms of *Fasciola* in Vietnam and their molecular characterization based on nuclear and mitochondrial DNA. *Parasitol*, 58, 81-85.
- Kaplan M, Başpınar S (2009). Elazığ'da son 5 yılda kesilen kasaplık hayvanlarda fasciolosis sıklığı ve ekonomik önemi. *Fırat Tıp Derg*, 14, 25-27.
- Kara M, Gıcık Y, Sari B, Bulut H, Arslan M (2009). A slaughter house study on prevalence of some helminths of cattle and sheep in Malatya province, Turkey. *J Anim Vet Adv*, 8, 2200-2205.
- Kassai T (1999). *Veterinary Helminthology*, Oxford: Butterworth Heinemann Publishing Ltd., 4-10.
- Khan MK, Sajid MS, Khan MN, Iqbal Z, Iqbal MU (2009). Bovine fasciolosis: prevalence, effects of treatment on productivity and cost benefit analysis in five districts of Punjab, Pakistan. *Res Vet Sci*, 87, 70-75.
- Khoramiana H, Arbabia M, Osqoib MM, Delavaria M, Hooshyara H, Asgaric M (2014). Prevalence of ruminants fascioliasis and their economic effects in Kashan, center of Iran. *Asian Pac J Trop Biomed*, 4, 11, 918-922.
- Köroğlu E, Şimşek S (2003). Fasciolosis., Ed. Recep Tınar ve Metin Korkmaz, Ekonomik Kayıplar. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:18, META Basım, 249-263, Bornova, İzmir.
- Kurtpınar HJ (1957). Erzurum, Kars ve Ağrı vilayetleri sığır, koyun ve keçilerin yaz aylarına mahsûs parazitleri ve bunların doğurdukları hastalıklar. *Türk Vet Hek Dem Derg*, 27, 3320-3325.
- Le TH, De NV, Agatsuma T, Nguyen, TGT, Nguyen QD, McManus DP, Blair D (2008). Human fascioliasis and the presence of hybrid/introgressed forms of *Fasciola* in Vietnam. *Int J Parasitol*, 38, 725-730.
- Liakos V (1985). Epidemiological investigations of parasitoses of small ruminants, Ellenike Kteniatrike. *J Hellenic Vet Med Soc*, 28, 2, 82-84.
- Magaji AA, Ibrahim K, Salihu MD, Saulawa MA, Mohammed AA, Musawa AI (2014). Prevalence of Fascioliasis in Cattle Slaughtered in Sokoto Metropolitan Abattoir, Sokoto, Nigeria. *Advances in Epidemiology*, 5.
- Mahdi NK, Al-Baldawi AK (1987). Hepatic fascioliasis in the abattoirs in Basrah. *Ann Trop Med Parasitol*, 81, 4, 377-379.
- Malone JB, Gommers R, Hansen J, Yilma JM, Slingenberg J, Snijders F, et al (1998). A Geographic Information System on the potential distribution and abundance of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in East Africa based on food and agriculture organization databases. *Vet Parasitol*, 78, 87-101.
- Maqbool A, Hayat CS, Akhtar T, Hashmi HA (2002). Epidemiology of fasciolosis in buffaloes under different managemental conditions. *Vet Arhiv*, 72, 221-8.
- Mehlhorn H, eds. (2001). *Ancyclopedic Reference of Parasitology, Biology, Structure, Function I-II*. Second Edition, Berlin: Springer.

- Mezo M, Gonzalez-Warleta M, Ubeira FM (2007). The use of MM3 monoclonal antibodies for the early immunodiagnosis of ovine fascioliasis. *J Parasitol*, 93, 65-72.
- Mufti S, Afshan K, Khan IA, Irum S, Qureshi IZ, Rizvi SSR, Mukhtar M, Mushtaq M, Iqbaland Z, Qayyum M (2015). Serological and coprological studies of bovine fasciolosis in the Pothwar region. *Pak Vet J*, 35, 2, 178-182.
- Nfi AN, Alongé DO (1987). An economic survey of abattoir data in Fako division of the South West province, Cameroon. *Bull Anim Health Product Africa*, 35: 239-242.
- Opara KN (2005). Population dynamics of *Fasciola gigantica* in cattle slaughtered in Uyo. *Trop Anim Health Prod*, 37, 363-8.
- Peng M, Ichinomiya M, Ohtori M, Ichikawa M, Shibahara T, Itagaki T (2009). Molecular characterization of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, and aspermic *Fasciola* sp. in China based on nuclear and mitochondrial DNA. *Parasitol Res*, 105, 809- 815.
- Petros A, Addisu K, Amanuel W J (2013). Prevalence and economic significance of bovine fasciolosis in Nekemte Municipal abattoir. *Vet Med Anim Health*, 5, 8, 202-205.
- Radostits D, Blood B, Gray C (1994). *Vet medicine text book of the diseases of cattle, sheep, goat, pig and horse*. 8th edit ELBS and Baillere Tindall.
- Roberts LS and Janovy J (2000). *Foundations of Parasitology*. 6th edition. McGraw-Hill, Dubuque, Iowa, 670.
- Reichel MP (2002). Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of liverfluke (*Fasciola hepatica*) infection in sheep and cattle. *Vet Parasitol*, 107, 65-72.
- Rezaul K, Mohammad SM, Giasuddin (2015). Epidemiological Study of ovine Fasciolosis: Prevalence and Risk Factor Assessment at Shahjadpur Upazila of Bangladesh. *Immunology and Infectious Diseases*, 3, 3, 25-29.
- Salami-bedestani M.R et all (2005). Prevalence of *Fasciola hepatica* in dairy herds in England and wales measured with an ELISA applied to bulk-tank milk. *Vet Rec*, 156, 729-731.
- Salimi-Bejestani MR, McGarry JW, Felstead S, Ortiz P, Akca A, Williams DJ (2005). Development of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluation against a commercially available test. *Res Vet Sci*, 78, 177-81.
- Schinieder T (2006). *Veterinar medizinische Parasitologie*, 6. Auflage, Stuttgart, 167-234, Germany.
- Soulsby E.J.L (1986). *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*. Bailliere Tindall, 7-52, London.
- Şen M, Yıldırım A, Bişkin Z, Düzlü Ö, İnci A (2011). Derinkuyu Yöresindeki Sığırlarda Fasciolosisin Kopro-ELISA ve Dışkı Muayene Yöntemleriyle Araştırılması, *Türkiye Parazitoloj Derg*, 35, 81-5.
- Şenlik B (2013). Fasciolosis. In “Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları”, Ed., MA Özcel, Cilt 1, Türkiye Parazitoloji Derneği, Yayın No 24, 165-178, İzmir.

- Şenlik B (2011). Teşhis yöntemleri. In: Veteriner Helminoloji. Tınar R, Ed. Dora Basım-Yayın Dağıtım, 427-482, Bursa.
- Şimşek S, Köroğlu E, Risvanlı A (2003). İneklerde döl tutma problemi ile *Fasciola hepatica* arasındaki ilişki. *Fırat Ü Sag Bil Derg*, 17, 3, 227-230.
- Şimşek S, Köroğlu E, Ütük AE, Altay K (2006). Use of Indirect Excretory/ Secretory Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ES-ELISA) for the Diagnosis of Natural *Fasciola hepatica* Infection in Eosinophilic and Non-Eosinophilic Cattle from Eastern Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 30, 410-5.
- Şimşek S, Risvanlı A, Utuk AE, Yuksel M, Saat N, Köroğlu E (2007). Evaluation of relationship between repeat breeding and *Fasciola hepatica* and hydatidcyst infections in cows in Elazig district of eastern Turkey. *Res Vet Sci*, 83, 102-4.
- Thanh HL, Blair D, McManus DP (2000). Mitochondrial genomes of human helminths and their use as markers in population genetics and phylogeny. *Acta Tropica*, 77, 3, 243-256.
- Tınar R (1984). Yumurta boyutlarına göre *Fasciola gigantica* ile *Fasciola hepatica*'nın ayırımı üzerine araştırmalar. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 31, 207-229.
- Tınar R, Korkmaz M (2003). Fasciolosis, Türkiye Parazitoloji Derneği, Yayın no:18, Meta Basım, Bornova, İzmir.
- Tınar R (2006). Trematoda. In: Helminoloji, Ed; Tınar R, Nobel Basımevi.
- Toparlak M, Taşçı S, Gül Y (1989). Van ili belediye mezbahasında kesilen sığırlarda karaciğer trematod enfeksiyonları. *AÜ Vet Fak Derg*, 36, 419-423.
- Toparlak M, Tüzer E (2002). Veteriner Helminoloji, İstanbul Üniv Vet Fak, 1-21, İstanbul.
- Urquhart G, Armour MJ, Duncun JL, Jennings FW (1987). *Veterinary Parasitology*, 1st Edition. ELBS.
- Valero MA, Ubeira FM, Khoubbane M, Artigas P, Muiño L, Mezo M, et al (2009). MM3-ELISA evaluation of coproantigen release and serum antibody production in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Vet Parasitol*, 159, 77-81.
- Yadav CL, Garg R, Kumar RR, Banerjee PS, Godara R (2007). Seasonal dynamics of *Fasciola gigantica* infection in cattle and buffaloes in Uttaranchal. *Indian J Anim Sci*, 77, 15-18.
- Yavuz A, İnci A, Yıldırım A, İça A, Düzlü Ö (2007). Sığırlarda *Fasciola hepatica*'nın Yayılışı. *Sag Bil Derg*, 16, 96-102.
- Yıldırım A, İca A, Duzlu O, İnci A (2007). Prevalence and Risk Factors Associated with *Fasciola hepatica* in Cattle from Kayseri Province, Turkey. *Revue Med Vet*, 158, 613-617.
- Zarowiecki MZ, Huysse T, Littlewood DTJ (2007). Making the most of mitochondrial genomes-markers for phylogeny, molecular ecology and barcodes in *Schistosoma* (Platyhelminthes: Digenea). *Int J Parasitol*, 37, 1401-1418.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşegül BOSTANCI, 1989 yılında Adana Seyhan ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Seyhan'da tamamladı. 2006 yılında Çukurova Üniversitesi Adana Sağlık Yüksekokulu Ebelik Bölümünü kazandı ve 2010 yılında aynı bölümden mezun oldu. 2012 yılında Van İpekyolu Toplum Sağlığı Merkezine ebe olarak atandı. 2014 yılında Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programına başladı. Şuanda Nevşehir Hacıbektas İlçe Entegre Hastanesi Toplum Sağlığı Merkezinde çalışmaktadır.





T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı:27552122-288
Konu :

23/07/2014

Sayın: Yrd. Doç. Dr. Bekir OĞUZ
(Veteriner Fakültesi)

Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulunun 17.07.2014 tarih ve 09 sayılı kararı gereğince; Yürütücülüğünü yapmış olduğunuz “Koproantijen ELİSA Yöntemi ile Sığırlarda Fasciolosis” adlı proje ile ilgili Orman ve Su İşleri Bakanlığı’ nın 15 Şubat 2014 tarih ve 28914 sayı ile yayınladığı yönetmeliğın 2. Maddesi 2. Fıkrasının b bendinde yer alan “Bu Yönetmelik; Deneysel olmayan klinik veteriner hekimliği uygulamalarını kapsamaz.” hükmü gereğince YUHADYЕК’ ten Çalışma ve Araştırma Kesin Sonuç Onay Belgeleri alınmasına gerek olmadığına karar verilmiştir.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. İsmail TÜREL
YUHADYЕК Başkanı

Eki: Proje Dosyası (1adet)
CD (1 Adet)

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 20.12.2016

Tez Başlığı / Konusu:

Kapaoantijen ELISA Yöntemi ile Sığırcılarda Fasciolosis
(Veteriner Parazitoloji)

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 28 sayfalık kısmına ilişkin, 20.12.2016 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnata intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 0,16'dır.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Tarih ve İmza

20.12.2016 [İmza]

Adı Soyadı: Ayşe Gül BOSTANCI

Öğrenci No: 139301022

Anabilim Dalı: Veteriner Parazitoloji

Programı: Veteriner Parazitoloji

Statüsü: Y.Lisans Doktora

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR

Yrd.Doç.Dr. Bekir OĞUZ
Parazitoloji Anabilim Dalı

(Unvan, Ad/Soyad, İmza)

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR

(Unvan, Ad Soyad, İmza)