

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**



**DEĞİŞİK KONAKLARDAN ELDE EDİLEN
FASCIOLA HEPATICA İZOLATLARINDA**

**B-TUBULİN GENİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sıddıka Sadet ÇANAKOĞLU

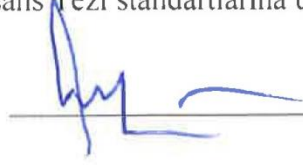
2016

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



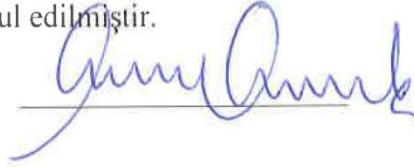
Prof. Dr. Ergün KÖROĞLU

Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK

Danışman

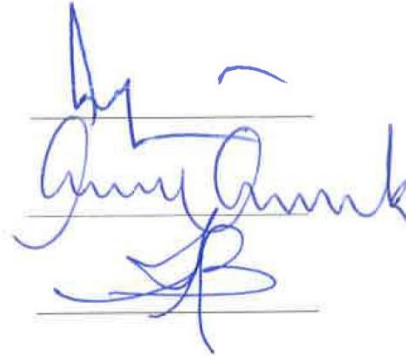


Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ergün KÖROĞLU

Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK

Doç. Dr. İbrahim BALKAYA



*Erken yaşıta aramızdan ayrılan kayınpederim Ahmet Salih ÇANAKOĞLU'na
ithafen...*

TEŞEKKÜR

Öncelikle emeklerinden dolayı yüksek lisans eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK'e, bana yüksek lisans yapma imkanı tanıdıkları için başta Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ergün KÖROĞLU olmak üzere Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nın saygıdeğer Öğretim Üyelerine, yüksek lisans eğitimim süresince desteğini esirgemeyen eşim Yrd. Doç. Dr. Nurettin ÇANAKOĞLU'na, tezimin gerek laboratuvar aşaması olsun, gerek yazım aşaması olsun katkılarından dolayı Arş. Grv. Dr. Sezayi ÖZÜBEK'e, Doktora Öğrencisi Harun Kaya KESİK'e, Yrd. Doç. Dr. Engin BERBER'e, Arş. Grv. Dr. Hasan GENÇOĞLU'na, Arş. Grv. Dr. Gökhan Kürşad İNCİLİ'ye, Arş. Grv. Mehmet Ali KISAÇAM'a, Doktora Öğrencisi Canan AKDENİZ İNCİLİ'ye, numunelerin toplanmasında emeği geçen Veteriner Hekim Öznur KAHRAMAN'a, Veteriner Hekim Muhammet KENCER'e ve son olarak beni yetiştiren bugünlere getiren canım aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Sıddıka Sadet ÇANAKOĞLU

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
1.ÖZET.....	viii
2.ABSTRACT	x
3. GİRİŞ	1
3.1. Taksonomi ve morfolojik özellikler.....	1
3.2. Etkenlerin gelişmeleri	2
3.3. Arakonaklar.....	9
3.4. Patojenite.....	9
3.4.1. Koyunlarda Patojenite.....	10
3.4.2. Sığırlarda Patojenite.....	12
3.5. Klinik bulgular	13
3.6. Teşhis	15
3. 7. Tedavi.....	18
3. 7. 1. Ekonomik Önemi	19
3.7.2. Kontrol Çalışmaları.....	21
4. MATERYAL VE METOD	29
4.1. Örnek Toplama.....	29
4.2. Genomik DNA İzolasyonu.....	30
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	30
4.3.1. PZR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi	31
4.3.2. SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism)	31
5. BULGULAR.....	33
6. TARTIŞMA	39
7. KAYNAKLAR	44
8. ÖZGEÇMİŞ	56

KISALTMALAR LİSTESİ

Triklabendazol : TCBZ

Polimeraz Zincir Reaksiyonu : PZR

Restriksiyon Uzunluk Fragmen Polimorfizmi: RFLP

Tek Zincir Konformasyonel Polimorfizmi : SSCP

Deoksiribonükleik Asit : DNA

Ribonükleik Asit : RNA

Glutamil Transferaz : GGT

Sığır Serum Albümini : BSA

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. <i>Fasciola hepatica</i> β -tubulin geninin PZR bulguları	31
Şekil 2. PZR ürünlerinin MboII enzimi ile kesilmesi neticesinde elde edilen bantların görünümü	31
Şekil 3. PZR ürünlerinin, <i>HphI</i> enzimi ile kesilmesi neticesinde elde edilen bantların görünümü	32
Şekil 4. PZR ürünlerinin, HindII enzimi ile kesilmesi neticesinde elde edilen bantların görünümü	32
Şekil 5. Örneklerin SSCP analizi neticesinde oluşan bant profilleri	33
Şekil 6. Sekans analizi yapılan örneklerin GenBank'taki referans sekanslarla kıyaslanması.....	34
Şekil 7. Alignment yapılan örneklerin genetik ağaç görünümü	35
Şekil 8. Örneklerin protein sekanslarının kıyaslanması.....	35
Şekil 9. Protein sekanslarının genetik ağaç görünümü	36

1. ÖZET

Fasciolosis, çiftlik hayvanlarında et, süt, yapağı, dölverimi ve güç kaybı gibi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Günümüzde fasciolosisin kontrolünde antelmintik kullanımı en geçerli uygulama yöntemidir. Bunlar içerisinde en sık kullanılanlardan biri de triklabendazol (TCBZ)'dur. Bu ilacın bilinçsiz kullanılması nedeniyle dirençli populasyonlar gelişmektedir. Bu çalışma ile farklı coğrafik alanlardan ve değişik konaklardan (sığır, koyun) elde edilen *Fasciola hepatica* izolatlarında TCBZ direncine işaret edebilecek β -tubulin gen polimorfizminin olup olmadığı, varsa ne derecede yaygın olduğu ve konak spesifikliğin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, Erzurum ve Kayseri illerindeki mezbahalardan kesimi takiben her ilden 20 sığır ve 20 koyundan olmak üzere toplam 80 erişkin *F.hepatica* toplanmış ve %70 ethanol içerisinde laboratuvara ulaştırılıp genomik DNA (gDNA) izolasyonu yapılmıştır. Örnekler, *F. hepatica* β -tubulin genini çoğaltan spesifik primerler β -tub295f ve β -tub1230r ile çoğaltılıp *MboII*, *HphI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile RFLP yapılmış, takiben PZR-SSCP analizi uygulanmıştır. Bu çalışma ile işlenen örneklerin hepsinde β -tubulin geni PZR ile başarılı bir şekilde çoğaltılmış ve 935 bp büyüklüğündeki bant elde edilmiştir. Bu PZR ürünlerinin *MboII* enzimiyle kesim neticesinde bütün örneklerde yaklaşık 350 ve 390 bp'lik iki bant gözlenirken, *HphI* enzimiyle kesimde bütün örneklerde yaklaşık 210, 340 ve 540 bp büyüklüğünde üç bant elde edilmiştir. Son enzim olan *HindIII* enzimi de bütün örnekleri kesmiş ve yaklaşık 380 ve 450 bp'lik üç bant belirlenmiştir. Takiben bütün örneklerin SSCP analizi yapılmış ve hepsinde benzer bant profilleri belirlenmiştir. Örnekler içinden rastgele seçilen 6 örneğin DNA dizi analizi

yaptırılmıştır. En çok nükleotid değişimi koyun kökenli örneklerde gözlenirken sığırlardan elde edilen numunelerde nispeten daha az nükleotid değişimi belirlenmiştir. Protein kıyaslamalarında dizinin baş ve son kısımlarında farklı oranlarda mutasyonlar olmasına rağmen özellikle TCBZ direnciyle ilişkilendirilebilecek 200. nükleotid ve civarında herhangi bir mutasyon belirlenmemiştir.

Bu çalışma ile Türkiye'nin iki farklı hayvancılık bölgesinden sığır ve koyunlardan elde edilen *F.hepatica* izolatlarındaki β -tubulin gen polimorfizmi ilk kez araştırılmıştır. İlaç direncine işaret edebilecek mutasyonlar belirlenememesine rağmen deneysel çalışmalarla moleküler çalışmaların birlikte uygulanması ile daha net verilere ulaşılabileceği düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Fasciola hepatica*, β -tubulin, TCBZ, RFLP, SSCP, sığır, koyun

2. ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERISATION OF β -TUBULIN GENE OF *FASCIOLA HEPATICA* ISOLATES OBTAINED FROM DIFFERENT HOSTS

Fasciolosis causes many economical problems in livestock such as loss of meat, milk and wool production. In recent era use of anti-helminthic drugs is common way for controlling *Fasciolosis*. Triclabendasole (TCBZ) is one of the most frequently used between those drugs. Careless and intensive use of that drug cause developing resistance against drug. In this study molecular characterisation of β -tubulin gene from *Fasciola hepatica* isolates of different hosts and geographic areas have been investigated for possible polymorphism indicating triclabendasole resistance. For this purpose adult *Fasciola hepatica* isolates from Erzurum and Kayseri have been collected from 20 sheep and 20 herds and they transported to laboratory in 70% ethanol. Then genomic DNA isolation have been done from each parasites separately and with using specific primers PCR have been designed for β -tubulin gene. The primers β -tub295f and β -tub1230r have been used for PCR amplification and SSCP and RFLP analyses have been done for further investigation. β -tubulin gene of all samples successfully amplified and specific band of 935 bp have been observed. Two bands of 350 and 390 bp have been observed with a result of cutting PCR products with *MboII* enzyme. Three bands of 210, 340 and 540 bp have been obtained as a result of use of *HphI* enzyme. *HindIII* used as last enzyme cut all samples and specific bands as 380 and 450 bp have been obtained. Similar band profiles have been observed of SSCP analyses of samples. Six samples have randomly selected and DNA

sequence analysis have been performed. Samples have been obtained from sheep showed more nucleotide polymorphism than the samples from cows. Some nucleotide changes have been observed of first and the last part of protein sequences but the mutation 200th nucleotide which could be associated with triclebendasole resistant couldnt be identified.

With this study β -tubulin gene polymorphism of *F.hepatica* isolates from sheep and cattles of two distinct geographical ares of Turkey have been researched for first time. Despite of lack of datas which could be indicating drug resistance, using experimental studies with molecular studies can be a way of getting more accurate and clear data.

Keywords: *Fasciola hepatica*, TCBZ, β -tubulin, RFLP, SSCP, cattle, sheep.

3. GİRİŞ

3.1. Taksonomi ve morfolojik özellikler

Omurgasız canlıların taksonomisi omurgalılar kadar açık ve belirgin değildir. Her yıl binlerce yeni tür tanımlanmaktadır. Parazitolojiyle uğraşan kişiler son yıllarda gelişen biyokimyasal ve moleküler tekniklerle klasik morfolojik teknikleri karşılaştırmak zorunda kalmaktadır. Ribozomal RNA gen sekanslarına, izoenzimlere, mitokondrial DNA sekanslarına ve polimeraz zincir reaksiyonu çalışmalarına göre incelemeler yapılmakta; sonuçların genelde morfolojik olarak yapılan sınıflamaya uygun olduğu görülmektedir. Bu sahada daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Taksonomik kriterler parazitlerde gruptan gruba farklılıklar arz etmektedir. Bazılarında iskelet yapısı önemli iken bazılarında platyhelminthes’lerde olduğu gibi büyük oranda üreme organlarının, sayısına, büyüklüğüne ve vücuttaki yerleşimine bakılmaktadır (1).

Fasciola türlerinin hayvanlar alemindeki yeri: (2)

Üstalem: Eukaryota

Alem: Animalia

Alt alem: Metazoa

Şube: Platyhelminthes

Sınıf: Trematoda Rudolphi, 1808

Altsınıf: Digenea Van Beneden, 1858

Takım: Echinostomata

Üstaile: Fascioloidea

Aile: Fasciolidea Railliet, 1895

Cins: *Fasciola* Linnaeus, 1758

1.Tür: *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758.

2.Tür: *Fasciola gigantica* Cobbold, 1885.

3.Tür: *Fasciola jacksoni* Stazzi, 1900.

4.Tür: *Fasciola halli* Sinitsin, 1933.

5.Tür: *Fasciola nyanzae*

6.Tür: *Fasciola indica* Varma, 1953

7.Tür: *Fasciola tragelaphi*

8.Tür: *Fasciola californica* Sinitsin, 1933

3.2. Etkenlerin gelişmeleri

Parazitin gelişmesi, safra ile bağırsak içeriğine sürüklenen yumurtaların dışkı ile dış ortama çıkmasıyla başlar. Son konak tarafından atılan yumurta sayısını; konağın türü ve yaşı, parazitin yaşı, parazitin sayısı, mevsim ve dışkılama zamanı gibi faktörler etkiler. En uygun son konak olan koyunlarda *Fasciola*'lar sığır ve tavşanlardakinden daha fazla yumurta çıkarırlar. Koyunlardaki bir *F. hepatica* günde 4.000-50.000 kadar yumurtladığı halde, bu sayı sığırlarda 3500 civarında olup konak yaşlandıkça yumurta sayısı da

azalmaktadır. Koyunlarda 11 yıl kadar yaşayabilen *F. hepatica*'ların yumurtlamaları parazit yaşlandıkça azalır, *Fasciola* 'lar dört yaşından itibaren çok az sayıda yumurta çıkarırlar. Konağın taşıdığı erişkin parazit sayısı ile dışkıda görülen yumurta miktarı arasında matematiksel bir ilişki bulunmakla birlikte bu konakta farklı yaş ve sayıdaki parazitlerin bulunduğu olaylarda mutlak değildir. *Fasciola*'lar ilkbaharda en yüksek sayıda yumurtlarlar, bu sayı sonbaharda biraz daha azalarak kışın en düşük seviyeye iner (3).

Yumurtanın gelişebilmesi için dışkıdan temizlenmiş olması gerekir ki, bu da ancak yağmur ve su birikintisinin çalkantısı ile dışkının çözülmesi sonucu gerçekleşir. Yumurtalar oksijenden yoksun, nemin yeterli olmadığı dışkı kitlelerinde gelişemez, ancak uzunca bir süre canlı kalırlar. Gelişmede rol oynayan başlıca çevresel etkenler, nem, oksijen, pH ve sıcaklıktır. *Fasciola* yumurtalarının gelişmesi ancak su içinde veya çok yoğun nemli ortamlarda mümkün olur. Etrafında çok ince bir tabaka halinde suyun bulunması bile yumurtanın gelişmesi için yeterlidir. Serbest suyun bulunmadığı ortamda toprağın veya dışkının nemli olması yumurtanın canlı kalması için yeterlidir. Dışkının kuruması ile yumurtalar canlılıklarını hızla yitirirler. Mirasidyumun yumurtadan çıkması, hareket edebilmesi ve canlılığını devam ettirebilmesi için mutlaka kalın bir su tabakası gerekmeyip, toprağın su ile örtülü olması yeterlidir. *Fasciola* yumurtaları ortamdaki oksijen değişimine dayanıklı olmakla birlikte, oksijen düzeyi düşük olan ortamlarda ve oksijen alışverişinin yeterli olmadığı sert dışkı kütlelerinde gelişmezler. Oksijen ihtiyacı ortamın sıcaklığına yakından bağlıdır, gelişme için en uygun sıcaklık olan 25°C'de oksijen yoğunluğu doygunluğa yakın olmalıdır. Yumurtanın gelişebilmesi için pH'nın 4.2-9 arasında olması gerektiği

ve 5.5-6 civarındaki pH'ın gelişme için en uygun olduğu ara konak *Lymnea truncatula*'nın da pH'sı 6-8.6 olan ortamlarda yaşadığı bildirilmiştir. *Fasciola* yumurtalarının gelişmesi 5-30°C'lerde mümkündür. 5°C'nin altında gelişme durur, 30°C'nin üzerinde yavaşlar, 37°C'nin üzerinde yumurtalar canlılıklarını yitirir. Embriyoner gelişme için en uygun sıcaklık dereceleri 23-26°C civarında olup, bu sıcaklıklarda gelişme 2-3 haftada tamamlanır, 16°C'de ise 3 aya kadar uzar (4).

Yumurtadaki gelişme tamamlandıktan sonra mirasidyum yumurtayı terk eder, ancak bunun için ortamın ısı, ışık, oksijen yoğunluğu koşullarının uygun olması gerekir. Mirasidyum 10 °C'nin altındaki 40 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yumurtayı terk etmez, bu nedenle kış ve çok sıcak yaz aylarında çıkış gerçekleşmez. İlkbaharda sıcaklığın artmasıyla birlikte mirasidyum çıkışı da başlar, ısı değişiklikleri yumurtadan çıkışı stimüle eder. Mirasidyumların hareketleri sıcaklığın artmasıyla artar, azalmasıyla yavaşlar. Mirasidyum karanlık ortamda yumurtayı terk etmez. Işık, yumurta kapağını yapıştıran kolloidal maddeyi eriten proteolitik enzimin mirasidyum tarafından salgılanmasını sağlayarak ve aktiviteyi artırarak yumurtadan çıkışı teşvik eder (3). Mirasidyumlar aerobik olup, düşük oksijen konsantrasyonlarına duyarlıdırlar. Ayrıca dışarıdan beslenemeyen mirasidyumların tek enerji kaynağı dokularındaki glikojendir (5). Mirasidyumun sümüklüyü enfekte edebilmesi için kısa sürede arakonağı bulması gerekir. Sümüklünün enfeksiyonunda üç faktör rol oynar, bunlar: mirasidyumun sümüklüye ilgisi, sümüklünün türü, sümüklü ile mirasidyumun yaşam ortamlarının aynı olmasıdır (6). *Fasciola* cinsi trematodların arakonak sümüklülerdeki gelişme formları sporokist, redi ve serker dönemleridir.

Sporokist: Sümüklünün yumuşak dokusunu delip epidermis altına ulaşan mirasidyum kirpikli kılıfını kaybederek hücre kümesine dönüşür. Daha sonra küçük bir vakuol oluşturup modifikasyona uğrayarak genç sporokiste dönüşür. Germinal hücreler çoğalarak gruplaşır ve redilerin orjinini oluştururlar. Bu gelişmeler mirasidyumun giriş noktasına yakın dokularında ve özellikle böbrekte oluşur (3).

Redi: Sporokistlerde germinal hücreler çoğalarak morula formlarını oluşturacak şekilde gruplaşır, daha sonra bunların her biri rediye dönüşür. Bir mirasidyumdan bir sporokist geliştiği halde, partenogenetik çoğalma ile bir sporokistten 15-20, hatta 40 redi gelişir. Rediler serker oluşturma eğiliminde olmakla birlikte bazı koşullarda yeni bir dönem olan kız redileri oluşturabilirler (3).

Serker: Redilerin, sporokistler germinal hücrelerinden oluşması gibi, serkerler de redilerin germinal hücrelerinden orjin alırlar. Her redide 16-20 germinal hücre bulunduğu dikkate alındığında bunlardan çok sayıda serker oluşacağı unutulmamalıdır. Serkerlerin sümüklüden çıkabilmeleri için sulu ortam ve 10-26 °C arasında çevre sıcaklığı gerekmektedir. Kış şartlarında ve kurak ortamlarda serker çıkışı olmaz, ancak havanın ısınması ve yağışların başlaması ile çıkış hızlanır (7). Serkerler sümüklüyü terk ettikten sonra dikey ve yatay hareketlerle yüzmeye başlar, uygun bir cisim veya bitki bulduklarında karın çekmeni ile tutunur, kuyruk kopar ve kistojen bezlerin faaliyete geçmesiyle birlikte kistlenme başlar. Kistlenme çoğunlukla su yüzeyine yakın bitkilerde nadiren de su yüzünde gerçekleşir. Kistlenmenin tamamlanması ve enfektif olabilmesi için 2-3 günlük bir süreye gereksinim vardır (8). Kuraklığa dayanıksız

olan metaserkerler, doğada bir yıldan fazla canlı kalabilirlerse de enfektiviteleri bu kadar uzun değildir, bu süre sıcaklık ve nem durumuna göre değişir (4). Hayvanlar, genellikle enfektif metaserkerleri taşıyan bitkisel yemleri yiyerek veya nadiren suda serbest kalmış metaserkerleri su ile birlikte alarak enfekte olurlar.

Son konaktaki gelişme üç başlık altında incelenebilir: Kistten çıkış, safra kanallarına geçiş ve seksüel olgunluğa ulaşma. Metaserkerler bağırsaklara gelmeden önce açılmazlar. Kistten çıkış iki safhada olur, birinci safha mekaniktir. Ağızda çiğneme, midede çalkantı ile birlikte tükürük ve mide salgısının etkisiyle kistin dış tabakası düşer. Enzimatik olan ikinci safhada pepsin ve tripsinin etkisiyle kistin iç tabakası zayıflar, ancak kistten çıkış bizzat metaserkerin salgıladığı parçalayıcı enzimin ventral yastık bölgesini eritmesiyle gerçekleşir ve genç kelebek duodenumda serbest kalır. Bu fizyolojik olayların uyarılmasında 38°C civarında ısı, oksidoredüksiyon potansiyeli, karbondioksit varlığı ve safra önemli rol oynar. Metaserkerlerden çıkış enfeksiyondan sonraki 30-60 dakikada tamamlanır (4). Kistten kurtulan genç kelebekler bağırsağın epitel hücrelerini, bağ dokusunu ve kas tabakasını delerek periton boşluğuna geçerler. Bu geçiş koyunlarda 3-4 gün olarak bildirilmiştir. Periton boşluğuna ulaşan parazitler bazı uyarıcıların etkisiyle karaciğere doğru ilerler ve bu göçleri esnasında geçtikleri dokuları eritip emerler. Karın boşluğunda göç ederken lenf bezlerini ve vena cava posterioru delebilir, genel dolaşıma karışarak vücuda dağılıp sapık yerleşim gösterebilirler (3). 5-7 gün içinde karaciğere ulaşır, glisson kapsülünü kısa sürede delerek parankime geçen genç *Fasciola*'lar karaciğer hücreleri ile beslenir ve bu sırada kan da emerler. Karaciğer dokusunda uzunca bir süre göç geçiren ve bu süreçte büyüyen parazitlerin safra kanallarına ulaşmaları ratlarda 4, tavşanlarda 6,

koyunlarda 7-8 hafta, safra kanallarındaki seksüel olgunluğa ulaşma süresi 4 hafta, parazitin prepatent süresi tavşanlarda 7-8, koyunlarda 10-12 hafta olarak bildirilmiştir. Parazitlerin karaciğer dokusunda ilerlemelerini, salgıladıkları kollajenaz enzimi sağlar (9). *Fasciola* türlerinin seksüel olgunluğa ulaşması sadece safra kanalları ve safra kesesinde mümkündür (10). Bu bilgiler ışığında *F. hepatica*'nın yumurtadan-yumurtlamaya kadar devam eden gelişme süreci; yumurtada mirasidyumun gelişmesi 2-3 hafta, sümüklüdeki larva gelişmesi 4-6 hafta, son konaktaki gelişme süresi 10-12 hafta olarak dikkate alındığında 16 veya 21 hafta sürmektedir (11).

Türkiye'de *Fasciola* türlerinin gelişme kronolojisini şu şekilde açıklayabiliriz:

Meraların enfeksiyonu:

a) İlkbaharda havanın ısınmasıyla ve yağışla birlikte aktive olan ve kışı enfekte geçiren arakonak sümüklüler bol miktarda serker çıkarır. Bunlar otlara yapışarak ilkbahar ortalarında metaserker haline dönüşür. Böylece otlağa çıkan hayvanların enfeksiyon riski artar. Ayrıca, az da olsa kışı merada geçiren enfektif metaserkeleri de unutmamak gerekir.

b) İlkbaharda meraya çıkan enfekte hayvanların dışkılarıyla çıkardıkları yumurtalardan 4-6 haftada mirasidyum çıkar ve bunlar yine ilkbaharda yumurtadan çıkan genç sümüklüleri enfekte ederler. Mirasidyumun gelişme süresi hava sıcaklığının artması ile kısalır, bu süre yazın 2-4 haftaya iner. Serkerlerin sümüklüden çıkışı ve kistlenmeleri yaz ortasını bulur.

Sümüklülerin enfeksiyonu:

a) İlkbaharda meraya çıkan enfekte hayvanların dışkılarıyla çıkardıkları yumurtalarda gelişip, yumurtayı terk eden mirasidyumlar en kısa sürede sümüklüyü enfekte eder. Sümüklüdeki larval gelişme süreci güney bölgelerde 7-8, kuzey bölgelerde 8-10 haftada tamamlanır ve serkerler sümüklüyü terk ederler. Bu tip gelişmede hayvanlar yaz aylarında enfekte olurlar.

b) İlkbaharda enfekte olan hayvanlarda *Fasciola*'ların olgunlaşması ancak yaz sonuna doğru gerçekleşir. Bu hayvanların çıkardıkları yumurtalardan gelişen mirasidyumlar sümüklülere yaz sonu veya sonbaharda enfekte eder. Bu tip gelişmede sümüklülerin serker çıkarmaları sonbahar sonunda mümkün olur veya havanın erken soğuması durumunda sümüklünün kış uykusuna geçmesi ile birlikte sümüklüdeki gelişme müteakip yılın ilkbaharına kadar durur.

Sonkonakların enfeksiyonu:

Yukarıda anlatılan gelişme tipleri dikkate alındığında hayvanlar meraya çıkarıldıktan hemen sonra az da olsa kışı otlarda geçiren metaserkerleri veya kış uykusundan çıkıp aktif hale geçen sümüklülerde duran larval gelişmenin tamamlanmasıyla çıkan serkerlerden oluşan metaserkerleri erken dönemde ya da ilkbaharda enfekte olan sümüklülerden gelişen metaserkerleri ilkbahar sonlarından kış başlangıcına kadar geçen sürede otlarla birlikte alarak enfekte olabilirler. *F.hepatica*'ların son konaklarda 11 yıl yaşayabildikleri ve aynı hayvanda değişik yaşlarda parazit bulunabileceği dikkate alındığında son konak hayvanların yaşamlarının her gününde çıkardıkları yumurtalarla çevreyi kirletebilecekleri unutulmamalıdır. *F.gigantica*, *F.hepatica*'ya göre daha sıcak bölgelerin paraziti olup, embriyoner, larval gelişmesi ve olgunlaşma süresi *F.hepatica*'dan biraz daha uzundur (8).

3.3. Arakonaklar

Fasciola türleri indirekt gelişen trematodlardır. Gelişmelerinde bir arakonak kullanırlar. Arakonaklar Lymnaeidae familyasına bağlı özellikle *Lymnea* cinsindeki sümüklü böceklerdir. Ancak *Fossaria*, *Radix*, *Stagnicola*, *Galba* cinslerinde yer alan bazı türlerin de arakonaklık yaptığı bildirilmektedir (8).

3.4. Patojenite

Fasciolosisde patojenite, karaciğerdeki parazitik gelişim safhalarına ve son konağa göre değişiklik gösterir. Aslında patojenite iki aşamalıdır. Birincisi, parazitlerin karaciğer parankimasındaki göçleri sırasında görülen, karaciğerin tahribi ve hemorajisi ile karakterize parankimal göç safhası; ikincisi, göç dönemini geçirerek safra kanallarına ulaşan erişkin parazitlerin kütiküler dikenleri ile mukozayı tahrip etmesi ve hematofajik aktiviteleri sonucu ortaya çıkan safra safhasıdır. Koyun, sığır, tavşan ve fare gibi konaklarda safra safhası daha sık görülürken, sığır ve insan gibi konaklarda göç döneminden sonra az sayıda kelebek nadiren safraya ilişkin hastalığa neden olur (8).

Fasciola türleri konaklara çeşitli şekillerde zarar verirler. Bunların başlıcaları şunlardır:

a) Mekanik etki: Genç kelebeklerin karaciğerde açtığı tünellerle karaciğer parankimini ve kan damarlarını tahribi ve erişkin kelebeklerin safra yollarını tıkaması ve safra kesesi epitel katını irrite etmesi şeklinde görülür.

b) Toksik etki: Kelebeklerin ekskresyon ve sekresyon ürünleri sonucu oluşur.

c) Kan kaybı: Kelebeklerin kan emmesi ve karaciğerde oluşturdukları travmalar sonucu oluşur.

d) Enfeksiyonlara neden olma etkileri: Genç kelebeklerin göçleri sırasında parankimada zararsız olarak bulunan sporlanmış anaerob bakterilerin aktif hale geçmeleri sonucu ikincil bir enfeksiyonun oluşumu şeklinde görülür (2)

3.4.1. Koyunlarda Patojenite

Koyunlarda *F.hepatica* enfeksiyonunun şiddeti, alınan metaserkerin miktarına bağlıdır. Nitekim 30'dan az metaserker alınması durumunda hafif, 30-200 metaserker alınması durumunda orta, 200 ile 2000 ve daha fazla metaserker alınması durumunda da şiddetli enfeksiyon meydana gelmektedir (8). Koyunlarda yaş direnci ile ilgili kanıtlar yoksa da, genç hayvanlarda enfeksiyonun daha patojen seyrettiği bildirilmektedir (2). Koyunlarda fasciolosis akut, subakut ve kronik olarak seyredebilir.

3.4.1.1. Akut Form

Çok sayıda metaserkerin alınmasından sonraki 2-6. haftalarda oluşmaktadır. Başlıca akut travmatik hemorajik hepatitis dikkati çeker. Nekropside, karaciğerin büyüdüğü, ayrıca hemaraji ve göç eden kelebeklerce açılmış tüneller görülür. Henüz genç forma erişmiş parazitlere 72 saatte vücut boşluğunda rastlanır. Kelebekler yaklaşık 90 saatte karaciğere ulaşırlar. Karaciğerde (özellikle sol lobunda) genç parazitlerin göçü sonucu oluşmuş hemorajik bölgeler ve yüzeyinde fibröz bir eksudat vardır. Kapsül yırtılarak kan sıvısı vücut boşluğunda toplanır (12). Özellikle son baharda ve kışa girilirken görülen akut fascioliste ani ölümler görülür. Enfeksiyona yakalanmış hayvanların antemortem muayenesinde ishal, kilo kaybı, asites, mukozalarda

solgunluk, ateş, bazen karaciğerde hissedilir bir büyüme ile abdominal bir ağrı görülür (8).

3.4.1.2. Subakut Form

Metaserkerlerin daha uzun bir zamanda ve akut formdakiinde daha az sayıda alınmasıyla şekillenir. Bu dönem 5-10. haftalar arası görülür. Bir kısım kelebek safra kanalına ulaştığında kolanjit oluşur. Bir kısmı da hala göç geçireceklerinden daha az şiddette, ancak akut formdakiine benzer lezyonlara neden olur. Karaciğerin büyümesi, yüzeyde büyük nekrotik ve hemorojik odakların görülmesi, genelde rüptür olmaksızın subkapsüler hemorojinin görülmesi, peritonitis, karaciğer fibrozisi, ilerlemiş hemorojik anemi, karaciğer yetmezliği ve ölüm bu dönemde görülebilecek patolojik bozukluklar arasında sayılabilir (2). Subakut form genelde sonbahar ve kış mevsimlerinde görülür. Ölüm, akut formda olduğu gibi hızlı bir şekilde görülmese de klinik belirtilerin görülmesini takip eden 1-2 hafta içinde görülebilir (8).

3.4.1.3. Kronik Form

Hastalığın en yaygın görülen formudur. Kış sonu veya ilkbahar başlangıcında sıkça görülmekle beraber tüm mevsimlerde de görülebilir. Metaserkerlerin alınmasından 4-5 ay sonra şekillenir. İştah kaybı, yavaş ilerleyen anemi, aşırı zayıflama, eozinofili, hipoalbuminemi, kronik kolanjit nedeniyle çene altında ödem, hepatik fibrozis, plazmada gamma glutamil transferaz (GGT) enziminin artması ve safra kesesinin büyüklüğü en karakteristik

bozukluklardandır. Bu dönemde, safra kesesinin yaygın bir hiperplazi ve normalden 20 kat daha fazla safranın olduğu görülür (12). Safra yollarındaki bir parazit günde 0,5 ml kan kaybına sebep olabilir. Hastaların alyuvar sayılarında bir düşme dikkati çeker. İyi beslenemeyen koyunlarda patojenik göstergeler daha kötü olabilir. Bu gibi hayvanlarda safra mukozası boyunca plazma protein sızıntısı da görülebilir. Ayrıca kandaki protein değerlerinde değişiklikler gözlenir. Enfeksiyon döneminde, başlangıçta hızlı, daha sonra yavaşlayan serum albümin seviyesinin azalması, enfeksiyonun 5. ayına kadar da yükselen gamma globülin artışı görülür. Bunun yanında 3-5. aylar arasında kalsiyum seviyesinde düşme, hipomagnesemi dikkati çeker (8). Fasciolasisle birlikte görülen bakteriyel hastalıkların en önemlisi koyunlarda görülen kara hastalıktır. Bu hastalık tahrip olmuş karaciğer dokusunda çoğalan B tipi *Clostridium novyi* toksinleri tarafından oluşturulur. Özellikle koyunlarda öldürücü olmakla beraber sığırlarda da görülür. Nekropside: karaciğerde bir anormallik söz konusudur. Karaciğer solgun, katılaşmış ve küçülmüştür. Karaciğerin ventral lobunun daha çok etkilendiği görülür. Karaciğerdeki patolojik bulgular hepatik fibrozis ve hiperplastik kolonjit ile karakterizedir (8).

3.4.2. Sığırlarda Patojenite

Sığır fasciolosisinin patolojisi koyunlarınkine benzemekle birlikte bazı farklılıklar gösterir. Sığırlar hastalığa çabuk yakalanmalarına rağmen fasciolosisin klinik bulgularının görülebilmesi için bu hayvanların 1000'den fazla metaserkerle enfekte olmaları gerekir. Bu durumda sığırlarda koyunlardakine benzer şekilde, kilo kaybı, anemi, hipoproteinemi ve 10.000'den daha fazla metaserkerin alındığı durumlarda ölümler görülür. Özellikle genç sığırlarda ağır tekrarlayan

enfeksiyonlar seyrek de olsa akut ve subakut seyir gösterebilir. Kronik form sığırlarda koyunlarinkinden daha önemli olup, kış ve bahar aylarının sonunda görülür (12). Sığırlarda, koyunlardaki patolojik bulgulara ilaveten safra yollarının kalsifikasyonu ve safra kesesinin genişlemesi söz konusudur. Safra duvarlarında kalsiyum birikmesi enfeksiyonun 16-20. haftalarından sonra görülmeye başlar. Kelebeklerin anormal göçleri sığırlarda daha siktir. Ağır enfeksiyonlarda anemi ve hipoalbuminemi şiddetlidir. Submandibular ödem kronik fasciolosiste sıklıkla görülür. Az miktardaki parazit yükünün olduğu enfeksiyonlarda klinik etkiler en az seviyede olup, verim kaybı vardır. Ancak bu belirtileri kötü besleme sonucu oluşacak verim kaybından ayırt etmek güçtür. Diyare görülebilir ancak bunun fasciolosise özel bir bulgu olmadığı unutulmamalıdır. *Fasciola* enfeksiyonları kışın ineklerde süt verimi kaybına neden olur (13).

3.5. Klinik bulgular

Fasciolosiste patogeneze ve buna bağlı gelişen klinik bulgular, metaserkerlerin enfektivite derecelerine, bir süreç dahilinde alınan metaserker sayısına, enfeksiyonun oluşumu için geçen süreye, konak türüne, konağın bağışıklığına ve karaciğerin büyüklüğüne göre değişebilmektedir (12). Parazitlerin konakları üzerine etkileri; mekanik, toksik ve kan kaybı biçimindedir. Parazitler parankimada hepatositlerin kan damarlarının tahribatına ve yıkımına, safra kanallarında mekaniksel irritasyon ile patolojik değişimlere ve kan emme sonucu anemiye neden olabilmekte (2), boşaltım ve salgısal ürünleriyle de dalak ve böbrek fonksiyonları üzerine bazı olumsuz etkiler yapabilmektedir. Hayvanlar tarafından alınan metaserkerlerden çıkan genç kelebeklerin ancak bir bölümü karaciğere ulaşabilmektedir (14).

Kronik fasciolosiste; ileri derece zayıflama ve kaşeksi, ilerleyen ve süregelen anemi, mukozalarda solgunluk ve siroza bağlı gelişebilen sarımsı renk, halsizlik, hareket etmeye karşı isteksizlik, özellikle çene ve boyun altında ödemler (bottle-jaw), hipoalbuminemi, yer değiştirebilen diyare ve konstipasyon, derinin kuru ve hamur kıvamında olması yapağının kuruması ve kolay dökülmesi, et verimi ile kalitesinde görülen düşme ile beraber süt ve döl veriminde de azalma meydana gelir (15).

Fasciolosiste aneminin nedeni uzun yıllar tartışılmış, hastalığın incelenmeye başlandığı dönemlerde paraziter göç sonucunda doku ve damar tahribatına bağlanmış ise de sonradan aneminin hemorajik, normositik ve normokromik yapıda olduğu ve parazitlerin kan emmesinin yanı sıra eritropoesiste meydana gelen eksiklikten de kaynaklandığı üzerinde görüş birliğine varılmış, ancak niçin normositik ve normokromik özellik gösterdiği net biçimde açıklanamamıştır (12). Kan kaybı erişkin parazitlerin kan emmesinden kaynaklanır ve bağlantılı olarak safra kanallarındaki kanama ile kendini gösterir. Ergin parazitlerin bağırsağında hemoglobin, hematin ve kırmızı kan hücreleri bulunmuştur (15). Anemi, fasciolosiste morbitide ve mortalitenin en önemli sebepleri arasında olup, hayvanlardaki kan kaybı parazit başına 0.2-0.3 ml/gün'dür (13). Fasciolosiste anemi 60. gün dolayında net biçimde görülmeye başlar ve hastalığın ilerleyen dönemlerinde retikulo-endotelial sistemdeki yetersizlik sonucu eritrosit yapımında da bir azalma meydana gelir (12). Enfeksiyonun ilk 7 haftasında plazma hacmindeki artıştan dolayı kırmızı kan hücre volümünde kısmen bir azalma görülebilir (15). Hasta hayvanlarda 63. günden itibaren eritrosit sayısında ani ve hızlı bir düşüş başlar ve düşük değerler uzun süre devam eder.

Eritrosit değeri 9 milyon/ml'den 2.2 milyon/ml'ye kadar düşer, 168-217. günler arasında yükselmeye başlayan değerler, hastalığı atlatan hayvanlarda 280. günlerde 10 milyon/ml'ye ulaşır (14). Normositik ve normokromik anemi başlamadan önce, demir bağlama kapasitesinde artış başlar, ayrıca makrofajlarda hemosiderin birikmesi, demir metabolizmasındaki bir düzensizliği ifade edebilir (16).

3.6. Teşhis

Genel olarak tüm hastalıklarda olduğu gibi fasciolosiste de başarılı tedavinin ilk koşulu doğru tanıdır. Bu amaçla tanı; klinik ve otopsi bulguları, dışkı muayene yöntemleri, biyokimyasal analizler, görüntüleme teknikleri ve serolojik yöntemlerle yapılmaktadır (2).

Hayvanlarda hastalığın tanısında klinik bulgular bazı durumlarda oldukça spesifiktir, ancak tek başına kesin tanıya götürmeyen bu bulgular hastalık konusunda önemli ipuçları vermektedir. Hastalığın akut formu, kısa süre içerisinde fazla sayıda metaserker alınmasıyla oluşmaktadır. Özellikle koyunların herhangi bir klinik belirti göstermeden travmatik-hemorajik hepatit sonucu aniden öldüğü, nekropside karaciğer kapsülünün yırtıldığı, karın boşluğunun kanlı sıvı ile dolduğu görülmektedir. Bu tip olayların görülmediği hafif seyreden akut olaylarda ise hayvanlar iştahsız, durgun olup solunum güçlüğü, soluk müköz membran, karında şişkinlik, sürüden geri kalma ve yürümede zorluk gözlenmektedir. Palpasyonda sternum gerisinde ağrı reaksiyonu görülmekte, bitkinliği giderek artan 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. Nekropside karın boşluğunda kanlı bir sıvı, karaciğerde büyüme, hemoraji ve gevrek bir yapı gözlenmektedir. Karaciğer üzerinde fibrin membranlar ile fibrinli peritonit görülmekte ayrıca, karaciğer kapsülü altında hematomlara rastlanabilmektedir. Kesit yüzeyinde genç parazitlerin göç izlerini gösteren kabartılar gözlenmektedir. Bu izler takip edildiğinde ön kısımlarında göç halinde beyaz renkte, 1-7 mm uzunluğundaki genç parazitlere rastlanmaktadır (2, 8, 17).

Kronik fasciolosis, akut fasciolosisi atlatan ya da uzun sürede daha az metaserker alan ve genellikle bir yaştan üzerindeki hayvanlarda görülmektedir. Klinik olarak koyunlarda anemi, iştahsızlık, kilo kaybı, çene, göz kapakları altında göğüs ve karın bölgelerinde yangısız ödem görülmektedir. Koyunların yünleri kolay kırılır hal almakta ve dökülmektedir. Nekropside yaygın bilier siroz dikkati çekmektedir. Karaciğer paransimi fibrotik ve serttir. Büyük safra kanalları kalınlaşmış ve fibrotik olup üzerinde şişlikler görülmektedir. Safra kanallarına yapılan kesitlerde olgun parazitlere rastlanmaktadır (2, 8, 17). Doku reaksiyonları daha şiddetli ve belirgin olduğu için sığırlar genellikle hastalığa koyun ve keçilerden daha dayanıklıdır. Sığırlarda alınan metaserkerlerin ancak %30'u safra kanallarına ulaşabilmekte ve buraya ulaşan parazitlerin etrafında güçlü bir fibröz reaksiyon meydana gelmesiyle kalsiyum fosfat taşları şekillenmektedir. Klinik olarak kilo alamama, iştah azalması, mukoz membranlarda anemi görülmekte ve süt verimi yarı yarıya' azalmaktadır. Karaciğerdeki fibrosis ve kalsifikasyon *Fasciola*'ların yaşam olanaklarını bozmakta ve semptomlar giderek ortadan kaybolmaktadır. Oluşan kalsiyum taşları ortadan kalkmasa da safra yollarının tam rejenerasyonu mümkün olabilmektedir (2, 8, 17).

Fasciolosisin tanısında dışkıda yumurtalar ancak parazitlerin olgunlaştığı dönemde, enfeksiyonun 8 ile 10. haftasından sonra görülebilmektedir. Genç parazitlerin karaciğer parankimasında göç geçirdiği erken dönemde, dışkıda parazit yumurtasına rastlanmamaktadır. Az sayıda parazitin oluşturduğu hafif enfeksiyonlardaki tekrarlanan dışkı bakılarında yumurtaların görülebildiği, *Fasciola* sp.'nin günden güne ve gün içinde yumurta atılımında değişkenlikler gösterdiği, dışkıda yumurta dağılımının düzensiz olduğu ve tek başına dışkı bakısı ile gram dışkıdaki yumurta sayısının (epg) enfeksiyonun gerçek durumu hakkında yeterli bilgi vermediği bildirilmektedir (2). Erişkin keleklerin yaşamı boyunca hergün 5.000-20.000 yumurta ürettiği (17) ancak, konakta oluşan tahribata neden olan ilgili parazit sayısı ile dışkı yumurta sayısı arasında bir ilişki bulunmadığı saptanmıştır (18). *Fasciola* sp. yumurtalarının saptanması veya gram dışkıdaki yumurta sayısının belirlenmesi için dışkı muayene yöntemlerinden sedimentasyon (Benedek, Modifiye McMaster) ve ZnSO₄ tekniklerinden faydaniılmaktadır (19).

Fasciolosis tanısında yumurtaların görülmesi tanıda spesifik olmakta ancak, bu iki türün yumurtaları renk ve yapı olarak birbirine benzemektedir. Her iki türün yumurtaları oval, kapaklı, altın sarısı renkte olup *F. gigantica* yumurtaları (132-197 X 76-104 µm), *F. hepatica*'ya (130-150 X 63-90 µm) oranla daha büyük olmakla birlikte iki yumurtanın yakın ölçülerde olması bu iki türün yumurtalarının birbiriyle karışabileceğini ortaya koymaktadır (2). Ayrıca, her iki türe ait yumurtaların mandalarda daha büyük olduğu bunu sığır ve koyunlardan elde edilen yumurtaların izlediği tespit edilmiştir.

Fasciolosisin tanısında özellikle akut formunda temel tanı yöntemi olarak serolojik yöntemlerin kullanılabileceği ve tanıya büyük katkı sağlayacağı ortaya

konmuştur. *Fasciola* türlerinden ileri gelen enfeksiyonların serolojik tanısında geçmişten günümüze kadar çeşitli yöntemler kullanılmış, antikor aramaya dayalı olarak özellikle ELISA, counter-electrophoresis, IHA ve Western blot (WB) en çok kullanılanlar olmuştur. Serolojik testlerde duyarlılığın ve özgünlüğün artması kullanılan antijenik materyale bağlı olarak değişmektedir. Kullanılan testlerdeki antijenlerin kompleks yapıda olması nedeniyle benzer immunojenik özellikler taşıyan parazitlerle çapraz reaksiyon verme riskini ortadan kaldırmada ergin parazit, ES (ekskresyon-sekresyon) ürünleri veya kısmen purifiye edilmiş parazit ürünleri kullanılmaktadır. Ancak, son zamanlarda daha çok purifiye ve rekombinant antijenler kullanılmaktadır. Buna karşın hastalık tedavi edilse de antikorların kanda uzun sürelerde bulunması ve geçmiş enfeksiyonlarda oluşan antikorlarla yeni enfeksiyonlarda oluşan antikorlar arasında benzerlik göstermesinin kesin tanıda zorluk oluşturduğu bilinmektedir. Bu nedenle dışkı ya da serumda antikor yerine *Fasciola* antijenlerinin saptanması ile ilgili çalışmalar yapılmakta, konak parazit yoğunluğu ile antiparaziter tedavinin başarısını önceden tahmin etmede kullanılabileceği bildirilmektedir (20).

3. 7. Tedavi

Sığır, koyun ve keçi gibi evcil hayvanlarda *F.hepatica*'nın neden olduğu ve fasciolosis olarak adlandırılan hastalığın tedavisinde kullanılan farklı kimyasal gruplara ait değişik ilaçlar (fasciolisit) bulunmaktadır. Bu bağlamda fasciolosiste kullanılacak ilaçların, bu özellikleri dikkate alınarak uygulanmaları esastır. Günümüzdeki fasciolisitlerin çoğu erişkin kelebeklere karşı yüksek etki göstermesine rağmen, genç kelebeklere karşı sadece triklabendazol ve diamfenetid kullanılmaktadır (21). Triklabendazol, keleklerin tüm gelişme dönemlerine

karşı kullanılabilen tek ilaç olma özelliğini taşıırken, diamfenetid ise erişkin kelebeklere karşı etkisizdir. Nitroksinil ise 6-8 haftalık kelebeklere karşı iyi, ancak düzensiz bir etki gösterir (11). Salisilanilidler, erişkin kelebeklere karşı yüksek etki gösterirler. Ayrıca 6-8 haftalık ve daha büyük kelebeklere de etkili, ancak genç formlara etkisizdirler. Rafoksanid, koyunlarda erişkin olmayan kelebeklere, klosantelden biraz daha fazla etkilidir. Rafoksanidin arttırılmış dozu (7.5-15 mg/kg) 4 haftalık ve daha yaşlı kelebeklere yüksek etki göstermektedir (11). *F.hepatica* ile enfekte sığırların klosantel ile tedavisinden sonra, dışkıdaki yumurta sayısının 6.haftada %95'e yakın oranda azaldığı tespit edilmiştir (22). Geniş spektrumlu benzimidazollerden olan cambendazol, fenbendazol, mebendazol ve oksfendazolün *F.hepatica*'ya az veya hiç etkileri bulunmamaktadır. Albendazolün etkisi sadece erişkin keleklerle sınırlıdır ve yüksek doz uygulaması gerekir (11). Triklabendazolün ise hem erişkin hem de genç kelebeklere karşı yüksek etkisi bulunur (23). Klorsulon, sığırdaki koyuna göre daha etkili olmakla birlikte deri altı yolla 2 mg/kg dozda verildiğinde erişkin kelebeklere %90'dan yüksek bir etki gösterir (24). Diamfenetid, 6 haftaya kadar olan erken dönemdeki genç kelebeklere karşı yüksek etki göstermekte olup 1 günden küçük kelebeklere dahi etkilidir (25).

3. 7. 1. Ekonomik Önemi

Helmint hastalıklarına evcil hayvanlarda yaygın olarak rastlanmaktadır. Bu hastalıklar viral, bakteriyel ve protozoon hastalıkları gibi sürü halinde ölümlere neden olmadıkları için fazla dikkat çekmemektedir. Çoğu zaman herhangi bir klinik belirti göstermeden uzun süre sinsi olarak seyrederek hayvanlarda büyümede geriliğe ve hayvansal ürünlerde nitelik ve nicelik yönünden azalmaya,

yük hayvanlarında iş gücü kaybına neden olmaktadırlar. Bunlara ek olarak hasta hayvanların tedavisi için veteriner, laboratuvar ve ilaç masrafları da ekonomik kayıpların artmasına yol açmaktadır. Hayvanlarda yaygın olarak rastlanan ve hayvancılık sektörünü olumsuz yönde etkileyen helmint hastalıklarından biri de fasciolosis olup, çiftlik hayvanlarında et, süt, yapağı, dölverimi ve güç kaybı gibi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (26). Hastalık çoğunlukla subklinik olarak seyretmekte ve kronik dönem boyunca düşük gebelik oranı, pubertanın gecikmesi, düşük doğum ağırlığı, süt verimi kaybı, yapağının nitelik ve nicelik olarak bozulması ve iş gücü kaybı gibi ekonomik kayıplara yol açmakta, yaygın karaciğer harabiyeti sonucu kemik iliğine giden protein ve mineral madde miktarının düşmesine bağlı çoklu yavrulama oranının düşmesi de görülebilmektedir (27). Fasciolosise dünya çapında her yıl yaklaşık olarak 600 milyon çiftlik hayvanının yakalandığı ve dünyanın bazı bölgelerinde 2.4-17 milyon insanın bu enfeksiyonu taşıdığı bildirilmektedir (28). Belçika’da, flukicide ilaçlarla tedavi edilen sığırlarda tedavi edilmeyenlere göre %18 daha fazla canlı ağırlık artışı olduğu ortaya konmuş, elde edilen kazancın tedavi masrafının 4.2 katına tekabül ettiği hesaplanmıştır (29). Amerika Birleşik Devletleri’nde flukicide ilaçlarla tedavi edilen besi sığırlarında verimliliğin arttığı, ortalama 40-140 arasında kelebek ile enfekte sığırlarda canlı ağırlığın %8-28 oranında düştüğü bildirilmiştir (30). Yine ABD’de, clorsulon ile tedavi edilen besi boğalarının tedavi edilmeyenlere göre haftalık 0.76 kg, besi düvelerinin ise haftalık 0.38 kg daha fazla canlı ağırlık kazandıkları ortaya konmuştur (31). Sığırlarda yılda en az bir kez yapılan fasiolasid tedavisi sonucu süt veriminde inek başına yıllık 150 litre artış olduğu saptanmıştır (32). Türkiye’de fasciolosisin neden olduğu ekonomik

kayıplar, daha çok kesim sonrası imha edilen karaciğer miktarı hesaplanarak ortaya konulmaya çalışılmıştır. Özyer (33), Adana Et ve Balık Kurumu'nda 1989 Ocak ayı ile 1990 Ağustos ayı arasında kesilen küçük ve büyük baş hayvanlarda distomatosis nedeniyle imha edilen karaciğerin maddi değerinin zamanın parasıyla 127.565.000 TL (46.557 USD) olduğunu bildirmiştir. Özer ve ark. (34), Elazığ Et ve Balık Kurumu Kombinası'nda Eylül 1992 ile Ağustos 1993 tarihleri arasında kesimi yapılan 6.235 koyundan 1.114'ünün karaciğerinin paraziter nedenlerden dolayı tam veya kısmi olarak imha edildiğini ve bunların 688'inin karaciğer kelebekleri nedeniyle olduğunu bildirmişlerdir. Kaplan ve Kuk (35), 1998-2000 yılları arasında Elazığ EL-ET kesimhanesinin kayıtlarını incelemişler, bu dönemde fasciolosis nedeniyle imha edilen karaciğerlerin neden olduğu ekonomik kaybın 21.428.000.000 TL (17.143 USD) olduğunu hesaplamışlardır.

Türkiye'nin çeşitli yörelerinde farklı tanı teknikleri ile yapılan çalışmalarda (dışkı muayenesi, nekropsi veya seroloji) sığır fasciolosisinin yaygınlığının %0.5-66 arasında değiştiği belirtilmiş, (36, 37, 38, 39) Erzurum'da sığır fasciolosisinin %21 oranında yaygın olduğu bildirilmiştir (40).

3.7.2. Kontrol Çalışmaları

Dünya çapında 600 milyondan fazla hayvanı enfekte eden ve yıllık 2 milyar dolar olarak tahmin edilen önemli ekonomik kayıplara neden olan fasciolosis (41) ile mücadelede uygulanacak olan kontrol yöntemleri; bölge çiftçiliği, hayvan sahiplerinin sosyo-ekonomik durumları ve iklim şartları gibi faktörlere bağlı olarak gelişmiş ve az gelişmiş ülkeler arasında olduğu gibi ılımlı ve tropikal bölgeler arasında da farklılıklar göstermektedir (32). Fasciolosis ile mücadelede genel olarak hayvanlarda stratejik ve taktik antelmintik kullanımı,

arakonak sümüklülerle mücadele, mera yönetimi ve meraya ilişkin önlemler alınması ve dirençli hayvanların kullanılması gibi yöntemler uygulanmakta (8, 32, 42) ayrıca coğrafik bilgi sistemleri ve diğer bazı tahmin sistemlerinden faydalanılmaktadır (43). Alternatif bir kontrol metodu olarak *F. hepatica* ve *F.gigantica* enfeksiyonlarına karşı aşı geliştirme çalışmaları yapılmaktadır (44). Çiftlik hayvanlarında fasciolosisin kontrolü amacıyla bu yöntemler arasında en çok başvuru ve en yaygın olarak kullanılan yöntem antelmintiklerle hayvanların tedavisidir (32).

Günümüzde fasciolosisin kontrolünde antelmintik kullanımı en geçerli uygulama yöntemidir. Bunlar içerisinde de en sık kullanılanı triclabendazole ve clorsulon'dur. Sınırlı sayıdaki bu ilaçların bilinçsiz kullanılması nedeniyle dirençli populasyonlar gelişmektedir. Bu nedenle farklı parazit türlerinde spesifik ilaçlara karşı gelişen direnç mekanizmalarının moleküler yöntemlerle belirlenmesi oldukça önemlidir (45). Antelmintik direnç günümüzde önemli bir problem olup, ilaç piyasadan geri çekilse bile antelmintik duyarlılığın normale döndüğüne ilişkin veri bulunmamaktadır (46). Kısa veya orta vadede parazit kontrolü için kullanılan mevcut kimyasalların kullanımına alternatif olacak gerçekçi bir uygulama da bulunmamaktadır. Mera yönetiminin gerekli antelmintik tedavi sayısını azaltmasına rağmen bu uygulamaların yerini tamamen alması olası değildir (47). Yakın gelecekte etkili aşılarda geliştirilmesi ve kimyasal olmayan bileşiklerin kullanılabilmesi mümkün görünmekle birlikte mevcut şartlarda eldeki kimyasalları kullanmaktan başka bir yol bulunmamaktadır (48).

Direnç, bir ilacın önerilen dozda veya daha fazla uygulandığında bir parazit populasyonundaki bireylere yeterince etki etmemesi olarak tarif

edilmektedir. İlaç direnci ile ilgili en önemli durum, direncin sonraki nesillere aktarılması ve parazitin birden fazla ilaca birbirinden bağımsız olarak direnç geliştirebilmesidir. Bir popülasyonda direnç gelişmişse bu direncin zayıflaması veya direncin kırılarak ilk haline gelinmesi mümkün değildir (46). Direnç, ilaç kullanımının kaçınılmaz sonucu değildir. Bazı parazitlerde ve ilaç kullanım durumlarında direnç asla gelişmeyebilir. Bir ilaca karşı direnç geliştiğinde rezistans allellerin birikimiyle ilgili üç dönem vardır: (i) direnç oluşumu büyük oranda popülasyonun büyüklüğü ve çeşitliliği ile şüpheli gen(ler)deki mutasyon oranı tarafından etkilenen bir olaydır, (ii) direnç, şüpheli parazite karşı kullanılan etken maddeye karşı gelişir fakat parazitin hayatta kalmasına ve çoğalmasına izin verir, ilaç kullanımı rezistans alleller için kuvvetli bir seçiciliktir ve bu olay devam ettiği sürece rezistans allellerin sıklığı artmakta ve popülasyonda yaygın hale gelmektedir, (iii) seçiciliğin artmasına bağlı olarak direnç ortaya çıkmakta ve kendini belli etmektedir (48).

İlaç direnci sınırlı sayıda yolla kendini göstermektedir: (i) ilacın moleküler hedefini artık tanımaması ve buna bağlı etkisizlik, (ii) parazit metabolizmasındaki değişikliğe bağlı olarak ilacın inaktive edilmesi veya atılması, (iii) ilacın parazitteki dağılımında meydana gelen değişikliğe bağlı olarak ilacın etki bölgesine girişinin önlenmesi, (iv) hedef genin ilaç etkinliğini azaltma yönünde güçlenmesi (48). Klinik olarak direnç, enfekte konağın ilacın önerilen dozuyla tedavi edilmesini takiben dışkıdaki yumurta sayısındaki azalmanın tedavi öncesi durumla yada tedavi edilmeyen kontrol grubuyla kıyaslanarak hesaplanmasıyla belirlenmektedir. Neticede yumurta sayısında %95'in altındaki azalma klinik dirence işaret etmektedir (49). Bu oran koyunlar için geçerli olup, bunun dışındaki

türler için farklı bir oran kabul edilebilir. Direnci henüz gelişme dönemindeyken belirlemek oldukça zor olup, hassas testlere ihtiyaç vardır. Genetik testler bir parazit popülasyonundaki spesifik direnç allellerinin varlığını belirleyebilir, çünkü bu gibi alleller direnç vakalarının çoğunda mevcuttur. Dirençli allellerin dominant olması direnç gelişimi için bir etkidir. Direnç olayında sadece bir gen etkin olabildiği gibi birden fazla gen de etkili olabilir. Parazit helmintlerdeki yüksek genetik çeşitlilik nedeniyle popülasyondaki rezistans allellerin varolma olasılığı ve dolayısıyla direnç gelişimi riski de daha yüksektir. Kısa biyolojik sıklusa ve yüksek fekunditeye sahip parazitler kısa sürede çok fazla sayıda nesil ürettikleri için rezistans allellerin hızlı yayılımına da o oranda katkı yapmaktadır. Konak hareketlerine bağlı olarak parazitlerin de farklı bölgelere taşınması, dirençli parazitlerin yayılmasına neden olmaktadır. Patojenik parazitlerle oluşan enfeksiyonlar tedavi ve kontrol önlemleri gerektirdiği için bu parazitlerdeki direnç de haliyle fazla olmaktadır (48).

Mikrotubüller bütün ökaryotik hücrelerdeki esansiyel hücre iskeleti benzeri yapılardır. Bunlar tubulin proteinin polimerleri olup α ve β -tubulin olmak üzere iki heterodimer alt birime sahiptirler. Bu alt birimler yapısal olarak benzer olup aminoasit sekanslarında %40 oranında benzerlik gösterirler (50). Tubulin, birçok etken ilacın hedef bölgesidir. Konak ve parazit tubulini arasında çok ince bir farklılık olması nedeniyle selektif bir toksisite elde edilir. Örneğin mevcut benzimidazoller nematodların β -tubulinine daha yüksek oranda bağlanırlar (48).

Yaklaşık 20 yıldan fazla bir zamandan beri çiftlik hayvanlarında fasciolosid olarak kullanılan triclabendazole (TCBZ) atipik bir benzimidazol (BZ) olup oldukça dar spektrumlu bir aktiviteye sahiptir. TCBZ'ye karşı direnç

1990'ların ortalarında ilk kez Avustralya'da çiftlik hayvanlarında ortaya konmuş (51) ve daha sonra Avrupa'nın çeşitli ülkelerinden (İrlanda, İngiltere, Hollanda ve İspanya) bildirilmiştir (52). Direnç mevcut haliyle gelişmeye devam ederse yakın gelecekte tedavi stratejilerinin değiştirilmesi gerekecektir. Nitekim fasciolosisin prevalansında, gerek iklim şartlarının değişmesine bağlı olarak arakonak sümüklünün hayatta kalabilirliğinin artması, gerekse dirence bağlı olarak artış olduğu gözlenmektedir (53).

Benzimidazol, tubulinin mikrotubul formuna polimerizasyonunu inhibe ederek etki göstermekte ve direnç olayı da β -tubulin genindeki mutasyona bağlı olarak ilaç bağlanmasının önlenmesi neticesinde oluşmaktadır. Fakat, BZ direnci ile ilişkili olarak β -tubulin geninde birkaç farklı polimorfizm şekillenmektedir (54). Bunlardan en iyi bilineni ve ilk tanımlananı β -tubulin izotip 1 geninin 200. kodonundaki Fenilalanin-Tirozin (Fe-Ti) polimorfizmidir (55). Ayrıca benzimidazol dirençli parazitlerde 6, 50, 134, 165, 167, 198 ve 257. nükleotidlerde mutasyon şekillendiğine ilişkin veriler bulunmaktadır (56). TCBZ direncinin nasıl geliştiğini anlamak için ilacın etki mekanizmasını anlamak gereklidir. Bu ilacın etkisi tipik BZ'ler gibi mikrotubul aktivitesine dayanmaktadır. İlacın aktif formu olan triclabendazole sulfoxide (TCBZ.SO), vitellin ve spermatogenik hücrelerde mitozisi inhibe etmekte, ayrıca tegumental sekresyonun çalışmasını engellemekte ve tegumentin yaygın bir şekilde hasara uğramasına yol açmaktadır. TCBZ'nin kelebeğe girişi oral yoldan ziyade tegumental sinsitiyumdan diffüzyon yoluyla olmaktadır (57). Hem TCBZ hem de TCBS.SO'nun dirençli kelebeklere girişinin hassas olanlara göre daha yavaş olduğu belirlenmiştir (58). Daha şaşırtıcı olanı, bu olayın diğer BZ'ler ve

albendazol için geçerli olmaması ve hem dirençli hem de hassas kelebekler girişin aynı hızda olmasıdır (59). Closentel, oxyclosanide, nitroxyinil ve albendazole, TCBZ dirençli erişkin kelebeklere karşı etkili bileşikler olup genç kelebeklere karşı yeterince etkili değildirler (60). Klinik olarak bu durum önemlidir çünkü parazitin göç dönemlerindeki genç parazitler en patojen etkiyi oluşturmaktadır. İnsanlarda enfeksiyona yol açan bir microsporidia olan *Vittaforma corneae*'da benzimidazol direnci araştırılırken β -tubulin genindeki 198. nükleotiddeki Glutamin değişikliğinin dirence işaret ettiği ifade edilmiştir (61). Yine çekirdekli meyvelerde önemli hasara neden olan *Monilinia fructicola* isimli mantarda β -tubulin geninde 6. ve 198. nükleotidlerinde mutasyon meydana geldiği gösterilmiş ve bu benzimidazol direncine bağlanmıştır (62). Son olarak trichostrongilid nematodlardaki benzimidazol direncinde özellikle 200. nükleotiddeki Fenilalanin/Tyrosin değişikliğinin dirence işaret ettiği uzun yıllardır bilinmektedir (63).

Antelmintik direncin belirlenmesinde dışkıda yumurta sayımı, in vitro testler ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Dışkıda yumurta sayısında azalma testi en yaygın kullanılan, uygulaması basit bir teknik olmakla birlikte, gerek parazit türüne gerekse de ilaca bağlı olarak değişen kabul edilebilirlik oranları nedeniyle, günümüzde bu yönteme göre direnci tanımlamak pek güvenilir görünmemektedir. Özellikle safra kanallarındaki erişkin karaciğer keleklerinin bütün yumurtalarını ne kadar sürede çıkardığı tam olarak bilinmediği için bu testle direnç belirlemek yanıltıcı olabilmektedir. In vitro testler ise iki kategoride incelenmektedir. Bunlardan biri, LD50 değerlerinin belirlenmesine yönelik olup, test oldukça sensitif olup %2'nin altındaki dirençli nematodları dahi belirleyebilir.

Diğer test ise yumurta açılım testi olup, taze yumurtaya ihtiyaç duyulması ve ovosidal olmayan grup 2 ve grup 3 antelmintikler için uygun olmaması nedeniyle kullanım alanı sınırlıdır. Moleküler yöntemler ise antelmintik dirence bağlı olarak şekillenen tek nükleotid mutasyonunun belirlenmesi esasına dayanmaktadır (64). Bu yöntemler arasında PZR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ve PZR-Single Stranded Conformation Polimorphism (SSCP) metodu oldukça güvenilir yöntemlerdir. İlk yöntemde PZR ürünlerinin uygun restriksiyon enzimleriyle tampon ortamında kesilmesi ve elde edilen bant profillerinin farklılığına göre genom üzerindeki mutasyon varlığının ortaya konması amaçlanmaktadır. PZR-SSCP metodunun prensibini ise tek iplikçikli DNA'nın şekil ve büyüklüğüne bağlı olarak, jel içerisindeki elektroforetik hareketi oluşturmaktadır. Çift iplikçikli DNA'nın jeldeki elektroforetik hareketi, onun büyüklüğü ve uzunluğu ile yakından ilişkili olup nükleotid farklılıkları bu hareketi fazla etkilememektedir. Oysa komplementeri olmayan DNA'nın stabil olmaması nedeniyle tek iplikçikli DNA'nın jeldeki elektroforetik hareketi yüzlerce nükleotid içerisindeki tek bir nükleotid farklılığından dahi etkilenmektedir. Böylelikle, poliakrilamid jel elektroforezinde DNA'nın yapısındaki tek bir nükleotid farklılığı dahi, oluşan hareket değişikliği sayesinde belirlenebilmektedir. SSCP analizinin sensitivitesi; DNA konsantrasyonu, incelenen fragmentlerin uzunluğu, elektroforez ısısı, jel kompozisyonu, kullanılan tampon ve pH gibi birçok parametreden etkilenebilir. Tekniğin en büyük avantajı çok sayıda PZR örneğinin eş zamanlı olarak incelenmesine olanak sağlamasıdır. Bu teknik PZR ürünlerini görüntülemek, incelenen genlerde yeterli polimorfizmin olup olmadığını ortaya koymak, polimorfizmin çok olduğu gen bölgelerini belirlemek, çok kopyalı

genlerde polimorfizm olup olmadığını tespit etmek ve intraspesifik varyasyonları belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (65, 66).

Saha ve laboratuvar şartlarında *F.hepatica*'nın flukicidlere direnciyle ilgili ilk bulgular 1980'lerin sonlarında elde edilmiştir (67). Özellikle 1995 yılından beri saha şartlarında *F.hepatica*'nın TCBZ'ye direnciyle ilgili Avustralya (51), İrlanda (68, 69), İskoçya (70), Galler (71), Hollanda (72, 73) ve İspanya'dan (74) bildirilen çok sayıda veri bulunmaktadır. Ancak Türkiye'de ilaç direnci ile ilgili sınırlı sayıda rapor mevcut olup, bunlar da genelde dışkıda yumurta sayımı ve yumurta açılım testleriyle yapılmış ancak moleküler yöntemlere dayalı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çırak ve ark. (75), Batı Anadolu'da atlarda cyathostominlere karşı TCBZ direncinin geliştiğini dışkıda yumurta azalım testiyle belirlemişlerdir. Köse ve ark. (76) ise Afyonkarahisar'da koyun sürülerinde dışkıda yumurta azalım testiyle yaptıkları çalışmada mide bağırsak nematodlarında albendazol ve oxfendazol-oxyclosanid kombinasyonuna karşı herhangi bir direnç tespit edemezlerken, ivermektine karşı direnç belirlemişlerdir.

Kemoterapi, veteriner hekimlikte paraziter enfeksiyonların kontrolünde en geçerli uygulama yöntemi olmaya devam etmektedir. Bu amaca yönelik olarak aşı çalışmaları yapılmakla birlikte, kısa veya orta vadede parazit kontrolü için mevcut kimyasalların kullanımına alternatif teşkil edecek bir gelişme sağlanamamıştır. Kematerapötik kontrolün önündeki en önemli problemin ilaç direnci olduğu aşıkardır. Bazı önemli parazit türlerindeki ilaç direnci, türe karşı uygulanan kontrol programlarının başarı oranını düşürmektedir. Gelecekte parazit

enfeksiyonlarının kontrol programlarının gerçekleştirilebilmesi için direnç gelişiminin saptanması ve eldeki verilere göre ilaç tercihlerinin yapılması hayati önem arz edecektir. Bu nedenle farklı parazit türlerinde spesifik ilaçlara karşı gelişen direnç mekanizmalarının belirlenmesi önem kazanmaktadır. İlaç direncinin belirlenmesinde moleküler yöntemlerin kullanılması, elde edilecek verilerin güvenilirliği açısından da oldukça önemlidir.

Bu çalışma ile farklı coğrafik alanlardan ve değişik konaklardan (sığır, koyun) elde edilen *F.hepatica* izolatlarında TCBZ direncine işaret edebilecek β -tubulin gen polimorfizminin olup olmadığı, varsa ne derecede yaygın olduğu ve konak spesifikliğini belirlenmesi amaçlanmıştır.

4. MATERİYAL VE METOD

4.1. Örnek Toplama

Erzurum ve Kayseri illerindeki mezbahalardan kesimi takiben her ilden 20 sığır ve 20 koyundan olmak üzere toplam 80 erişkin *F.hepatica* toplandı ve %70 etanol içerisinde laboratuvara ulaştırılıp, kullanılıncaya kadar -20 °C’de saklandı. Örnekler, ilgili literatüre göre morfolojik ve mikroskopik özellikleri bakımından

F.hepatica olduğu teyid edildikten sonra genomik DNA (gDNA) izolasyonuna geçildi.

4.2. Genomik DNA İzolasyonu

Bu amaçla erişkin parazitler bir lam üzerine alınıp ön 2/3'lük kısmı bir bistüri ile kesilip eppendorf tüplere konulduktan sonra en az 5 kez PBS (pH=7.4) ile yıkandı. Öncelikle bu tüplere gDNA izolasyon kitinde (Geneall, Korea) bulunan lizis buffer eklenip, 20 mg/μl proteinaz-K'dan 25 μl konulup 1 gece 56 °C'de bekletildikten sonra ticari kit prosedürü uygulanarak gDNA izole edilip kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı. Bu işlemin başarılı olup olmadığını anlamak için bütün örneklerdeki total DNA miktarı spektrofotometre ile ölçüldü ve yeterli gDNA olmayan örneklerden yeniden izolasyon yapıldı.

4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Fasciola hepatica β-tubulin genini çoğaltan β-tub295f (5'-AAYAAAYTGGGC YAARGGNCA-YTA-3') ve β-tub1230r (5'-TCRGTRAAYTCCATYTCRTCCAT-3') primerleriyle çoğaltılıp 935 bp büyüklüğünde bant veren örnekler sonraki işlemler için ayrıldı. PZR karışımı, 5 μl 10X PCR Buffer, 4 μl MgCl₂, 4 μl 1.25 μM dNTP, herbir primer çiftinden 0.5 μl, 0.2 μl Taq DNA polimeraz ve 30.8 μl distile sudan oluşmuştur. Bu karışıma herbir örneğin gDNA'sından 5 μl eklenmiş ve vorteks yapıldıktan sonra PCR ThermoCycler (SensoQuest, Germany) cihazında PZR işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlem 95°C'de 10 dakika ön denatürasyon, 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 56°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 1 dakika uzama şeklinde 40 siklus ve 72°C'de 10 dakika ekstra sentez halinde gerçekleştirilmiştir. Cihazdan çıkartılan örneklerin 10 μl'si %1.4'lük agaroz jele 5 μl loading buffer ile karıştırılarak

yüklenmiş ve 90 V akımda 30 dakika yürütölüp ethidium bromide ile boyandıktan sonra jel görüntölleme sisteminde (Vilber Lourmat Quantum-ST5-1100/26MX) görüntölünip fotoğrafi alınmıştır.

4.3.1. PZR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi

PZR-RFLP analizi için PubMed’de yayınlanmış sekanslar temel alınarak restriksiyon enzim kesim yerleri belirlenmiş ve RFLP işleminde *MboII*, *HphI* ve *HindII* enzimlerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Bütün örneklerin PZR ürünleri bu enzimlerle ayrı ayrı RFLP işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlem için 10 µl PZR ürünü, 10 U restriksiyon enzimi, 2 µl restriksiyon buffer, 0.2 µl BSA, 5.5 µl distile su olacak şekilde hazırlanan karışım 3 saat boyunca 37 °C’deki su banyosunda inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda %3’lük agaroz jelde yürütölüp 90 V akımda 45 dk yürütölün örnekler ethidium bromide (10 mg/ml) ile boyanıp, UV transilluminatörde bantların varlığı yönünden incelenmiştir (77).

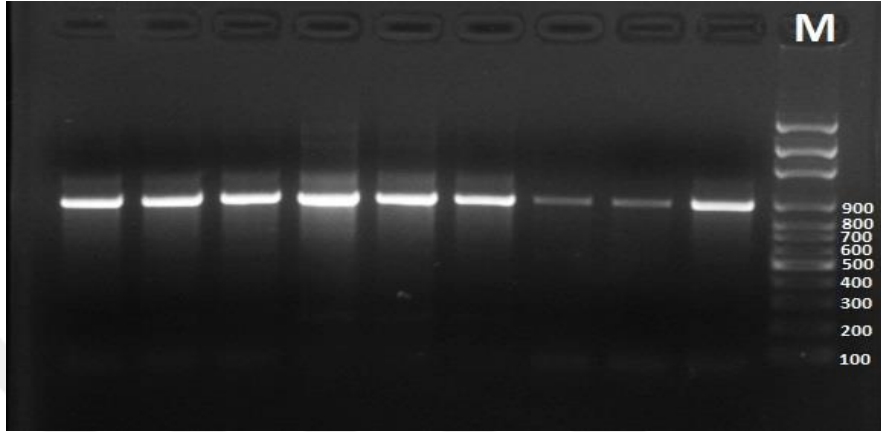
4.3.2. SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism)

SSCP işlemi mini dikey jel sisteminde gerçekleştirilmiştir. Bu jel için 2 ml %50 Acrylamide-bisacrylamide karışımı (49:1), 825 µl 5X TBE, 825 µl Gliserin, 5075 µl distile su, 150 µl %10 APS (Amonium peroxid disulphate), 4 µl TEMED karışımı cam plakalar arasına konulup tarak yerleştirildikten sonra 37 °C’de jelleşmesi için bekletilmiştir. Takiben cam plakalar tank içerisine konulup tarak çıkarıldıktan sonra üzerine 0.5X TBE tamponundan eklenip örneklerin hazırlanması işlemine geçilmiştir. Öncelikle 4 µl PZR ürünü 12 µl SSCP loading buffer (10 mM NaOH, %95 formamide, %0.05 bromophenol blue ve %0.05 xylene cyanole) ile karıştırılıp 95 °C’de 10 dakika denatüre edilip sonra hızlı bir şekilde buz kalıpları (-20°C) içine konulup soğutularak DNA iplikçiği tek sarmal

halinde kalması sağlanmıştır. Daha sonra bu örneklerden 10 µl alınıp jele yüklenmiş ve buz kalıpları içerisinde yaklaşık 3 saat 200 Volt akımda elektroforeze tabi tutulmuştur. Boyalı kısım jelin alt kısmına ulaşınca akım kesilip cam plakalar açılmış ve jel çıkarılıp gümüş nitrat metoduyla boyama işlemine geçilmiştir. Bu amaçla jel öncelikle distile su ile birkaç dakika yıkandıktan sonra 6 dakika boyunca 100 ml %10 etanol, %5 asetik asit ve %85 distile su karışımında bekletilmiştir. Bunu takiben solüsyon dökülüp jel üzerine 100 ml %0.1 gümüş nitrat eklenip 15 dakika inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda gümüş nitrat daha sonra tekrar kullanılmak üzere ayrılmış ve jel üzerine %1.5 NaOH (150 µl formaldehid de eklenerek) konularak 30 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda bantlar görünür hale gelmiş ve reaksiyonu durdurmak için NaOH atılıp jel üzerine 100 ml %0.75 Na₂CO₃ eklenmiş ve jelin görüntüsü alınmıştır (66).

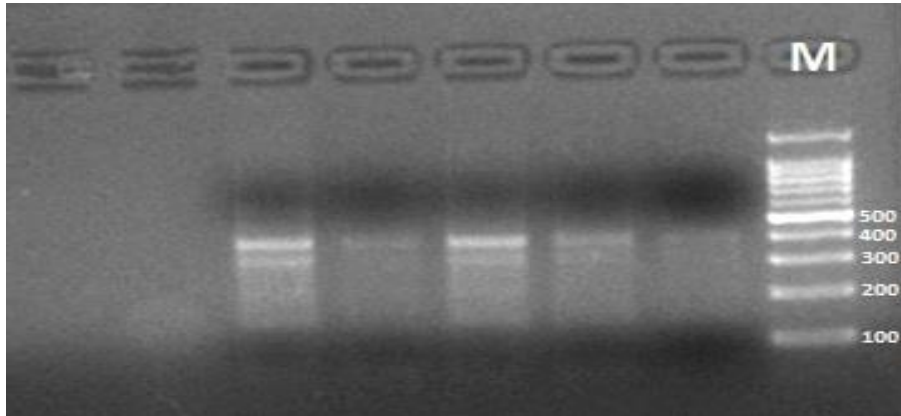
5. BULGULAR

Bu çalışma ile Erzurum ve Kayseri illerindeki sığır ve koyunlardan elde edilen toplam 80 *F.hepatica* izolatının hepsinde β -tubulin geni PZR ile başarılı bir şekilde çoğaltılmış ve 935 bp büyüklüğündeki bant elde edilmiştir (Şekil 1).



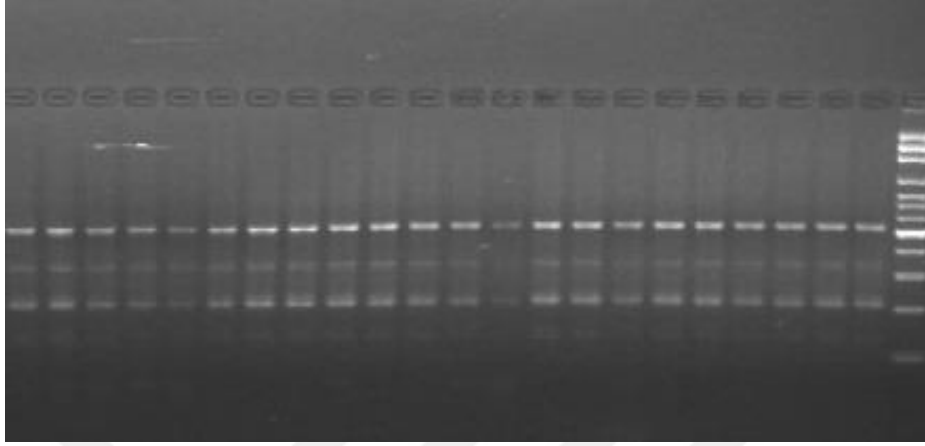
Şekil 1. *Fasciola hepatica* β -tubulin geninin PZR bulguları.

Bu PZR ürünlerinin hepsi üç farklı restriksiyon enzimiyle (*MboII*, *HphI* ve *HindII*) kesilmiştir. *MboII* enzimiyle kesim neticesinde bütün örneklerde yaklaşık 350 ve 390 bp'lik iki bant gözlenmiştir (Şekil 2).



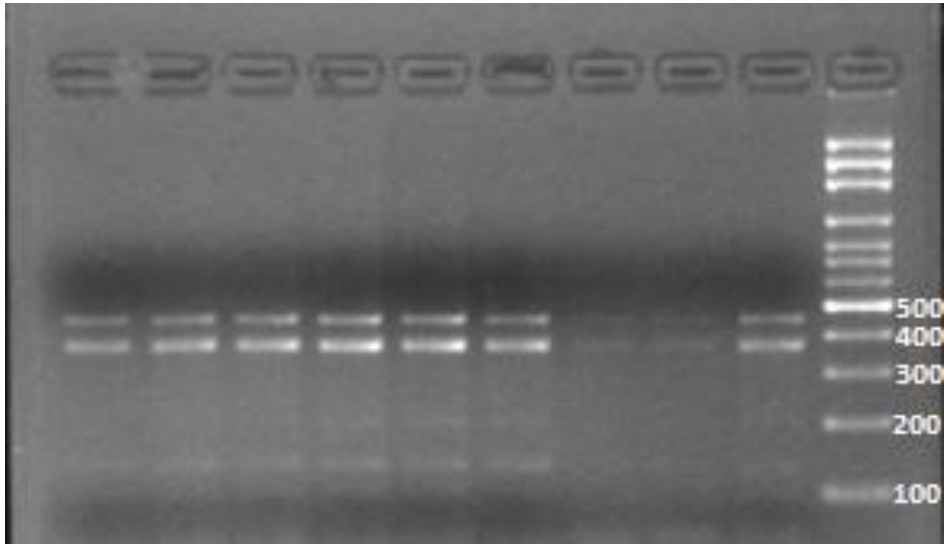
Şekil 2. PZR ürünlerinin *MboII* enzimi ile kesilmesi neticesinde elde edilen bantların görünümü.

HphI enzimiyle kesimde ise bütün örneklerde yaklaşık 210, 340 ve 540 bp büyüklüğünde üç bant elde edilmiştir (Şekil 3).



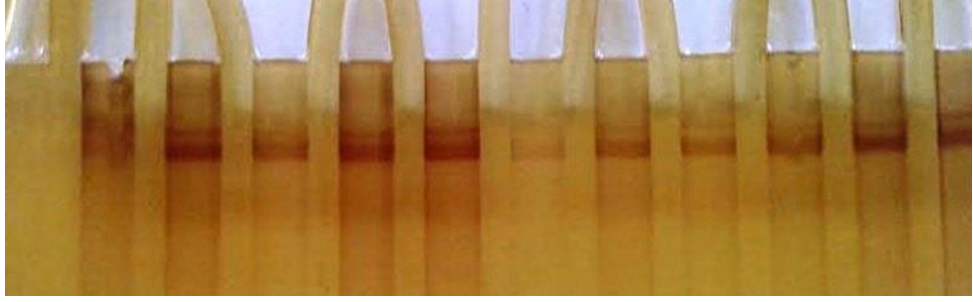
Şekil 3. PZR ürünlerinin, *HphI* enzimi ile kesilmesi neticesinde elde edilen bantların görünümü.

Son enzim olan *HindII* enzimi de bütün örnekleri kesmiş ve yaklaşık 380 ve 450 bp'lik iki bant belirlenmiştir (Şekil 4).



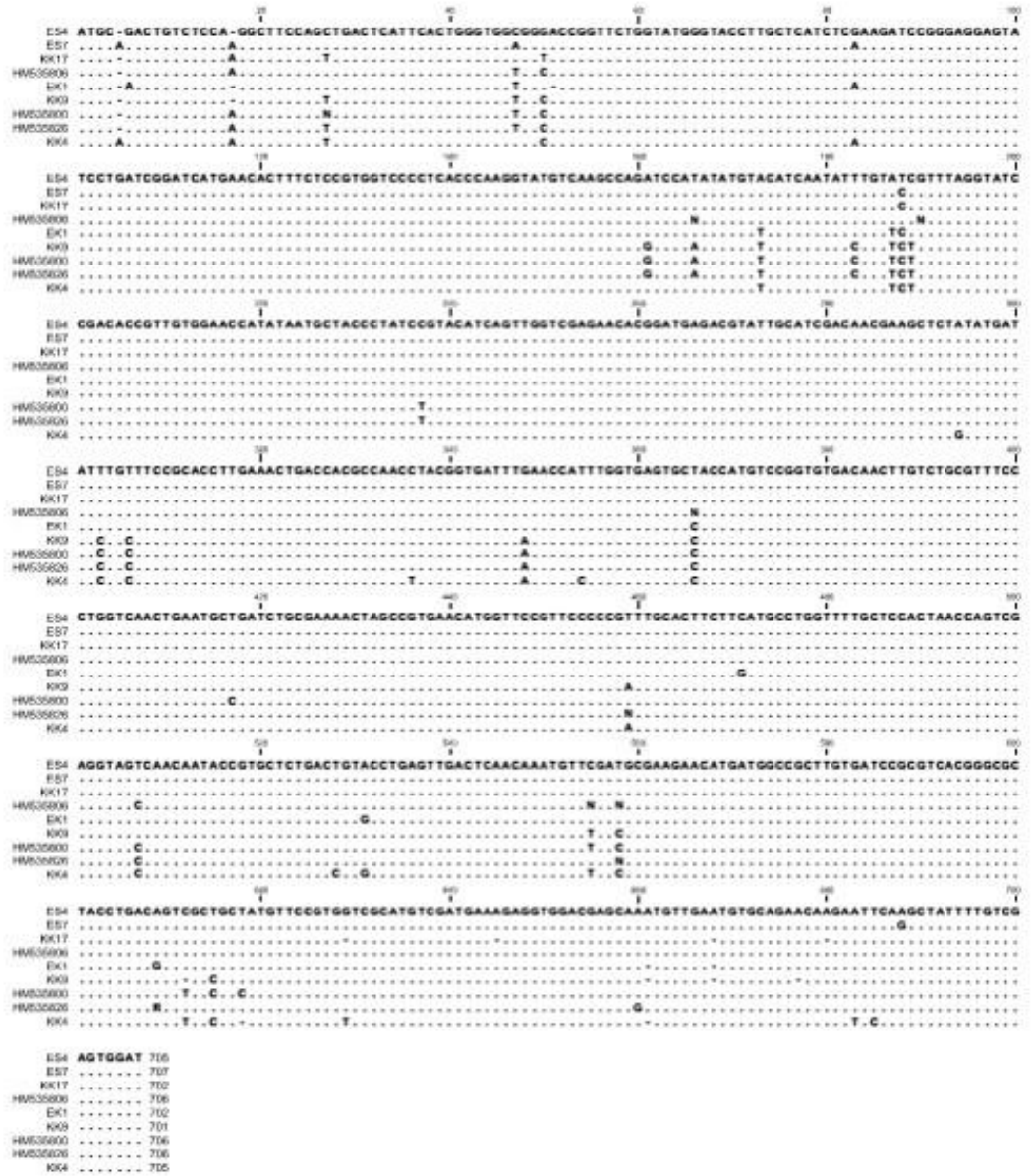
Şekil 4. PZR ürünlerinin, *HindII* enzimi ile kesilmesi neticesinde elde edilen bantların görünümü.

Takiben bütün örneklerin SSCP analizi yapılmış ve hepsinde benzer bant profilleri belirlenmiştir (Şekil 5).



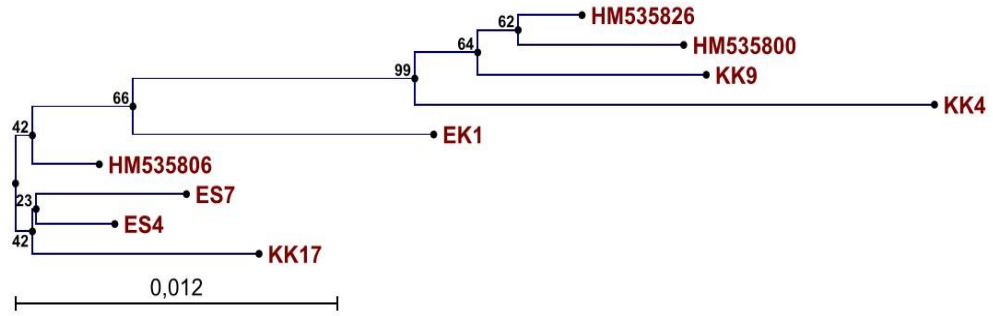
Şekil 5. Örneklerin SSCP analizi neticesinde oluşan bant profilleri.

Örnekler içinden rastgele seçilen 6 örneğin DNA dizi analizi yaptırılmıştır. Bunlar, Kayseri'den elde edilen üç koyun (KK4-KK9-KK17), (Genbank accession numaraları: KU523371, KU523372, KU523373), Erzurum'dan elde edilen bir koyun (EK1) (KU523368) ve iki sığır (ES4-ES7) (KU523369-KU523370) örneklerinden oluşmuştur. Dizi analizi sonuçları GenBank'taki yayınlanmış sekanslar (HM535826, HM535800 ve HM535806) ile kıyaslanmış ve alignment sonucu Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6. Sekans analizi yapılan örneklerin GenBank'taki referans sekanslarla kıyaslanması.

Bu şekilden de görüleceği üzere en çok nükleotid değişimi KK4, KK9 ve KK17 nolu örneklerde gözlenirken, sığırlardan elde edilen numunelerde daha az nükleotid değişimi belirlenmiştir. Dizi analizi yapılan örneklerin genetik ağaç görünümünde bu durum daha belirgin olarak izlenmiştir (Şekil 7).



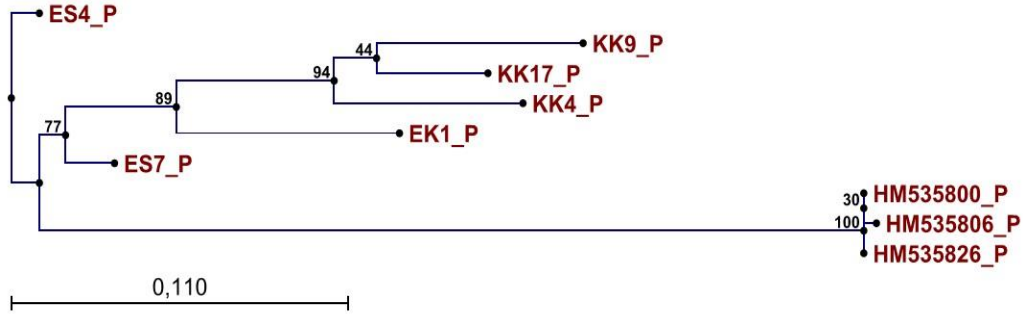
Şekil 7. Alignment yapılan örneklerin genetik ağaç görünümü.

Dizi analizi sonucunda protein translasyonu yapılan örneklerin protein kıyaslamaları yapılmış, dizinin baş ve son kısımlarında farklı oranlarda mutasyonlar olmasına rağmen özellikle triklabendazol direnciyle ilişkilendirilebilecek 200. nükleotid ve civarında herhangi bir mutasyon belirlenmemiştir (Şekil 8).

ES4_P	CDCL-QASS*	LIHWVAG-PV	LVWVPCSSRR	S-----GR	SILIGS*TLS	PWSPHPRYVK	51
ES7_P	MQTVSK	---	---	---	---	---	52
KK17_P	A-TVSK	---	---	---	---	---	51
EK1_P	MQL--SPGFQ	T-SLG-G	---	---	---	---	51
KK4_P	MQTVSK	---	---	---	---	---	52
KK9_P	---	---	---	---	---	---	51
HM535806_P	GHYTEG	-E-VDS.LDVVR	KEAES-DCLQ	GFQLTHSL-G	GTGS.MG..L	ISKIREE	56
HM535826_P	GHYTEG	-E-VDS.LDVVR	KEAES-DCLQ	GFQLTHSL-G	GTGS.MG..L	ISKIREE	56
HM535800_P	GHYTEG	-E-VDS.LDVVR	KEAES-DCLQ	GFQXTHSL-G	GTGS.MG..L	ISKIREE	56
ES4_P	PDPYM--YIN	ICIV-VSDTV	VEPNATLSV	HQLVENTDET	YCIDNEALYD	ICFRTLKLT	109
ES7_P	---	---	---	---	---	---	110
KK17_P	---	---	---	---	---	---	109
EK1_P	---	---	---	---	---	---	109
KK4_P	---	---	---	---	---	---	110
KK9_P	---	---	---	---	---	---	109
HM535806_P	---	---	---	---	---	---	116
HM535826_P	---	---	---	---	---	---	116
HM535800_P	---	---	---	---	---	---	116
ES4_P	PTYGDLNHLV	SATMSGVTTT	LRFPQQLNAD	LRKLAVNMVP	FPRLHFFMPG	FAPLTSRGSQ	169
ES7_P	---	---	---	---	---	---	170
KK17_P	---	---	---	---	---	---	169
EK1_P	---	---	---	---	---	---	169
KK4_P	---	---	---	---	---	---	170
KK9_P	---	---	---	---	---	---	169
HM535806_P	---	---	---	---	---	---	176
HM535826_P	---	---	---	---	---	---	176
HM535800_P	---	---	---	---	---	---	176
ES4_P	QYRALTVPEL	TQQMFDANKM	MAACDPRHGR	YLTVAAMFR	---GRMSMKE	VDEQMLNVQN	225
ES7_P	---	---	---	---	---	---	226
KK17_P	---	---	---	---	---	---	224
EK1_P	---	---	---	---	---	---	225
KK4_P	---	---	---	---	---	---	226
KK9_P	---	---	---	---	---	---	224
HM535806_P	---	---	---	---	---	---	232
HM535826_P	---	---	---	---	---	---	232
HM535800_P	---	---	---	---	---	---	232
ES4_P	KNSSYFVEW	---	---	---	---	---	234
ES7_P	---	---	---	---	---	---	235
KK17_P	RIQAILSSG	---	---	---	---	---	233
EK1_P	EKFLFORVD	---	---	---	---	---	234
KK4_P	DSKLFCRVD	---	---	---	---	---	235
KK9_P	RIQAILSSG	---	---	---	---	---	233
HM535806_P	---	---	---	---	---	---	243
HM535826_P	---	---	---	---	---	---	242
HM535800_P	---	---	---	---	---	---	242

Şekil 8. Örneklerin protein sekanslarının kıyaslanması.

Bu kıyaslamanın genetik ağaç görüntüsünden de izleneceği gibi (Şekil 9) örneklerimizde referans sekanslara göre farklılık olup, özellikle koyun kökenli izolatlarda sığırlara göre daha fazla protein değişimleri tespit edilmiştir.



Şekil 9. Protein sekanslarının genetik ağaç görünümü.

6. TARTIŞMA

Hayvanlarda yaygın olarak rastlanan ve hayvancılık sektörünü olumsuz yönde etkileyen helmint hastalıklarından biri de fasciolosis olup, çiftlik hayvanlarında et, süt, yapağı, dölverimi ve güç kaybı gibi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (26). Hastalık çoğunlukla subklinik olarak seyretmekte ve kronik dönem boyunca düşük gebelik oranı, pubertanın gecikmesi, düşük doğum ağırlığı, süt verimi kaybı, yapağının nitelik ve nicelik olarak bozulması ve iş gücü kaybı gibi ekonomik kayıplara yol açmakta, yaygın karaciğer harabiyeti sonucu kemik iliğine giden protein ve mineral madde miktarının düşmesine bağlı çoklu yavrulama oranının düşmesi de görülebilmektedir (27).

Fasciolosis dünyada her yıl yaklaşık olarak 600 milyon çiftlik hayvanının yakalandığı ve dünyanın bazı bölgelerinde 2.4-17 milyon insanın bu enfeksiyonu taşıdığı bildirilmektedir (28). Fasciolosis ile mücadelede genel olarak hayvanlarda stratejik ve taktik antelmintik kullanımı, arakonak sümüklülerle mücadele, mera yönetimi ve meraya ilişkin önlemler alınması ve dirençli hayvanların kullanılması gibi yöntemler uygulanmakta (8, 32, 42) ayrıca coğrafik bilgi sistemleri ve diğer bazı tahmin sistemlerinden faydalanılmaktadır (43).

Günümüzde fasciolosisin kontrolünde antelmintik kullanımı en geçerli uygulama yöntemidir. Bunlar içerisinde de en sık kullanılanı TCBZ ve klorsulondur. Sınırlı sayıdaki bu ilaçların bilinçsiz kullanılması nedeniyle dirençli populasyonlar gelişmektedir. Bu nedenle farklı parazit türlerinde spesifik ilaçlara karşı gelişen direnç mekanizmalarının moleküler yöntemlerle belirlenmesi oldukça önemlidir (45).

Mikrotübüller, bütün ökaryotik hücrelerin temel yapısal bileşenidir. Bunlar tubulin proteininin polimerleri olup oldukça iyi korunmuş, α ve β -tubulin adında iki subuniti olan heterodimerik yapılardır. Bu subunitle yapısal olarak benzerdirler ve yaklaşık %40 aminoasit sekans benzerliği taşırlar (80). *Fasciola* genomunun en az beş α ve altı β -tubulin izotipini kodladığı belirtilmektedir (84). Tubulin, birçok potansiyel veya etkili paraziter ilacın hedef bölgesidir. Konak ve parazit tubulini arasındaki küçük farklılıklar bazı ilaçlar için selektif toksisite elde etmek açısından önemlidir. Örneğin, bazı dinitroanilinler protozoonların α -tubulinlerine bağlanırken konağına bağlanmazlar ve bu yüzden iyi bir ilaç adayı olarak bilinirler (81) yine bazı benzimidazoller nematodların β -tubulin'ine bağlanırlar (82).

Cambendazole, fenbendazole, mebendazole ve oxfendazole gibi benzimidazol grubu etken maddeler nematod, sestod ve hatta diğer trematodlara karşı etkiliyken *F.hepatica*'ya karşı çok az veya hiç etkisizdirler. Erişkin parazitlere karşı sınırlı etkisi olması ve doz artırımı önerilmesine rağmen sadece albendazole fasciolosise karşı önerilmiştir (88). Luxabendazole ise diğer bir benzimidazol türevidir olup 6 haftalıktan büyük erişkin *Fasciolalara* karşı etkilidir fakat yaygın olarak kullanılmamaktadır (89, 90). Fakat triclabendazole hem genç hem de erişkin kelebeklere karşı yüksek etki göstermektedir (91). TCBZ'de klor atomu ve thiometil grubunun bulunması ve bir karbomat parçalarının bulunmaması onu diğer benzimidazol türevlerinde farklı hale getirmektedir (92). Bu nedenle fasciolosisin tedavisi için tercih edilen ilaç bir benzimidazol derivatı olan TCBZ'dir. Bu etken madde klasik bir BZ olmamasına rağmen morfolojik çalışmalar göstermiştir ki, tedaviyi takiben erişkin parazitin vitellin hücrelerinde,

testislerin spermatogenetik hücrelerinde ve tegumentteki mikrotubul ile ilişkili yapılarda şiddetli hasar oluşmaktadır (83). Bu da tubulunun TCBZ için bir hedef bölge olduğuna işaret etmektedir (84). Bu nedenle mevcut çalışma ile farklı konaklardan elde edilen *F.hepatica* izolatlarında β -tubulin geninin moleküler karakterizasyonu yapılarak olası direnç işaret edebilecek mutasyonlar araştırılmış ancak ilacın hedef bağlanma bölgesindeki aminoasitlerde direnç işaret edebilecek spesifik bir mutasyon veya polimorfizm belirlenmemiştir.

Benzimidazoller nematod, sestod, omurgalılar ve *F. hepatica*'da aynı tubulin bağlanma bölgelerine sahiplerdir. Özellikle 63-103. aminoasitler arasındaki değişiklikler ilacın selektivitesi üzerinde etkilidir. Bu bölgede iki aminoasit *F. hepatica* için spesifiktir ve nematod, sestod ve omurgalı tubulin sekanslarında gözlenmezler. Bu aminoasitler Glutamic acid⁸² ve Threonin⁹¹'dir (87). Bu çalışmada da 82. pozisyonda Glutamic acid (E) belirlenirken 91. pozisyonda Threonin (T) yerine Histidin (H) aminoasiti belirlenmiş olup, bu durumun ilaç etkinliği noktasında problem oluşturabileceği düşünülmüştür.

Benzimidazol direnci ile ilgili bugün bildiklerimiz sınırlıdır ve parazitik nematod türlerinde β -tubulin geni izotip 1'in dirençte rol oynayan başlıca gen bölgesi olduğu kabul edilmektedir. Bu dirençle ilgili olarak ya 167. pozisyonda fenilalanin yerine tirozin veya histidin değişikliği (85), 198. pozisyonda glutamik asitin alanin değişikliği (86) veya 200 pozisyonda fenilalanin tirozin değişikliği şeklinde olmaktadır (84). Kwa ve ark. *H. contortus* üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada allel spesifik PZR metodu ile dirençli popülasyonlarda Tir200 pozisyonunda değişiklik olduğunu göstermişlerdir (55). P200'deki Phe-Tyr değişikliği *H. contortus* türlerinde direncin önemli bir göstergesidir. Bu çalışmada

Erzurum ve Kayseri illerinden 80 adet *F.hepatica* izolatının β -tubulin geni PZR ile çoğaltılmış örnekler içinden rastgele seçilen 6 örneğin DNA dizi analizi yaptırılmıştır. Dizi analizi sonucunda protein translasyonu yapılan örneklerin protein kıyaslamaları yapılmış, dizinin baş ve son kısımlarında farklı oranlarda mutasyonlar olmasına rağmen özellikle TCBZ direnciyle ilişkilendirilebilecek 200. nükleotid ve civarında herhangi bir mutasyon belirlenmemiştir. Halbuki Ryan ve ark. (84), üç *Fasciola* örneğinde β -tubulin geninin 200. pozisyonunda tirozin, iki örnekte fenilalanin ve birinde de lösin tespit etmişlerdir. Bütün örneklerin 167. pozisyonunda fenilalanin ve 198. pozisyonunda da glutamik asit olduğunu bildirmişlerdir.

Özellikle 1995 yılından beri saha şartlarında *F.hepatica*'nın TCBZ'ye direnciyle ilgili Avustralya (51), İrlanda (68, 69), İskoçya (70), Galler (71), Hollanda (72, 73) ve İspanya'dan (74) bildirilen çok sayıda veri bulunmaktadır. Ancak Türkiye'de ilaç direnci ile ilgili sınırlı sayıda rapor mevcut olup bunlar da genelde dışkıda yumurta sayımı ve yumurta açılım testleriyle yapılmış ancak moleküler yöntemlere dayalı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çırak ve ark. (75), Batı Anadolu'da atlarda cyathostominlere karşı BZ direncinin geliştiğini dışkıda yumurta azalım testiyle belirlemişlerdir. Köse ve ark. (76) ise Afyonkarahisar'da koyun sürülerinde dışkıda yumurta azalım testiyle yaptıkları çalışmada mide bağırsak nematodlarında albendazol ve oxfendazol-oxyclosanid kombinasyonuna karşı herhangi bir direnç tespit edemezlerken, ivermektine karşı direnç belirlemişlerdir. İlaç direncinin gen düzeyinde araştırıldığı fazla sayıda araştırma bulunmamaktadır.

Fasciola hepatica izolatlarındaki moleküler karakterizasyon çalışmalarında genellikle az sayıda örnek kullanılmış ve çoğunlukla da sekans analizi yapılmıştır (87). Bu çalışma ile ilk defa sığır ve koyunlardan elde edilen 80 örnek işlenmiş ve PZR-RFLP ile SSCP teknikleri kullanılmıştır. Ancak her iki teknikle de mutasyon belirlenememiştir. Enzim kesim noktalarında mutasyon bulunmamasının buna yol açmış olabileceği düşünülmüştür.

Teofanova ve ark. (93), Yunanistan (n=143), Polonya (n=48) ve Bulgaristan (n=13)'dan elde ettikleri 204 *F.hepatica* izolatında β -tubulin 3 genindeki mutasyon ve polimorfizmleri sekans analiziyle incelemişlerdir. Neticede, Yunanistan ve Polonya'dan elde edilen izolatlarda bu gende azalan yüzdelerde polimorfizm belirlenirken β -tubulin 3 proteinlerinde Polonya kaynaklı örneklerin hiçbirinde aminoasit değişikliği saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda da sadece sekans analizinde önemsiz derecede polimorfizmler belirlenmiş olup, olası TCBZ direncine işaret edebilecek verilere ulaşılamamıştır.

Bu çalışma ile Türkiye'nin iki farklı hayvancılık bölgesinden sığır ve koyunlardan elde edilen *F.hepatica* izolatlarındaki β -tubulin gen polimorfizmi ilk kez araştırılmıştır. İlaç direncine işaret edebilecek mutasyonlar belirlenememesine rağmen deneysel çalışmalarla moleküler çalışmaların birlikte uygulanması ile daha net verilere ulaşılabileceği düşünülmüştür.

7. KAYNAKLAR

1. Fairweather I, Threadgold LT, Hanna REB. Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host. Dalton JP. (Editor) Fasciolosis, CABI Publishing University Press Cambridge. 1999; 47-111.
2. Kassai T. Veterinary Helminthology. Butterworth Heinemann, London. 1999; 4-11.
3. Euzebey J. Les Maladies Vermineuses des Animaux Domestiques et Leurs Incidences sur la Pathologie Humaine, Tome II. Maladies Dues aux Plathelminthes, Deuxieme Fascicule Trematodes. Vigot F. (Editor) Livre Generalites Distomoses Hepato-Biliaires Paris 1971; 327-387, 675-682.
4. Stuart JA. The life cycle of *Fasciola hepatica*. Dalton JP. (Editor) Fasciolosis, CABI Publishing Wallingford Oxon, UK. 1999; 1-29.
5. Ginetsinkaya TA. Trematodes, their life cycles, biology and evolution. Amerind Publishing New York. 1988.
6. Haas W, Haberl B. Host recognition by trematode miracidia and cercariae. Fried B, Graczyk TK. (Editors) CRC Press Boca Raton New York. 1997; 197-220.
7. Lee CG, Cho SH, Lee CY. Metacercarial production of *Lymnaea viridis* experimentally infected with *Fasciola hepatica*. Vet Parasitol 1995; 58(4); 313-318.
8. Gralp N. Helmintoloji. Ankara niv Vet Fak Yayın (ikinci baskı). Ankara 1981;1-36.

9. Sukhdeo MWK, Mettrick DF. The behaviour of the juvenile *Fasciola hepatica*. J parasitol 1986; 72: 492-497.
10. Gerber HC, Hörchner F, Oguz T. *Fasciola Gigantica* infestation in small laboratory animals. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 1974; 87(11): 207-210.
11. Boray JC. Trematode infections of domestic animals. Campbell WC, Rew RS. (Editors) Chemotherapy of Parasitic Diseases Plenum Pres. New York. 1986:401-425.
12. Behm CA, Sangster NC. Pathology, pathophysiology and clinical aspects. Dalton JP. (Editor) Fasciolosis, CABI Publishing Wallingford Oxon, UK. 1999;185-224.
13. Urquhart GH, Armour J, Duncan J, Dunn AM, Jennings FW. Veterinary Parasitology Longman Scientific & Technical, Longman Group England. 1987:100-109.
14. Sinclair KB. Observations on the clinical pathology of ovine fascioliasis. Brit Vet J 1962; 118: 37-53.
15. Soulsby EJJ. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. CABI Publishing Wallingford Oxon, UK. 1982; 809.
16. Haroun EM, Hussein MF. Some clinico-pathological aspects of experimental *Fasciola gigantica* infection in calves. J Helminthol 1976; 50: 29-30.

17. Hansen J, Perry B. The epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of ruminants. Kenya: International Laboratory for Research on Animal Diseases. 1994.
18. Honer MR. The interpretation of faecal egg count. Z. f. Parasitenkunde 1965; 26: 143-155.
19. Thienpont D, Rochette F, Vanparijs OFJ. Diagnosing Helminthiasis Through Coprological Examination. Belgium: Janssen Research Foundation. 1979.
20. Hillyer GV. Immunodiagnosis of human and animal fasciolosis. Dalton JP. (Editor) Fasciolosis, CABI Publishing University Press Cambridge. 1999; 435-443.
21. Fairweather I, Boray JC. Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. Vet J 1999; 158(2): 81-112.
22. Bauer C, Hermosilla C, Çırak VY. Wirksamkeit von Closantel gegen *Fasciola hepatica* und *Haemonchus contortus*. Der praktische Tierarzt 1996; 77(10): 917-922.
23. Turner K, Armour J, Richards RJ. Anthelmintic efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* in sheep. Vet Rec 1984; 114(2): 41-42.
24. Wyckoff JH, Bradley RE. Efficacy of a benzenedisulfonamide against experimental *Fasciola hepatica* infections in calves. Am J Vet Res 1983; 44(11): 2203-2204.

25. Annen JM, Boray JC, Eckert J. Testing of new fasciolicides. II. Efficacy comparison between Rafoxanide and Diamphenethide in subacute and chronic fascioliasis of the sheep. *Schweis Arch Tierheilkd* 1973; 11: 527-538.
26. K ro lu E, Şimşek S. Ekonomik Kayıplar, Fasciolosis. Tınar R, Korkmaz M. (Edit rler). Türkiye Parazitoloji Derne i No 18. Bornova, İzmir: Meta 2003: 249-263.
27. Mukasa-Mugerwa E, Kasali OB, Said AN. Effects of nutrition and endoparasite treatment on growth onset of puberty and reproductive activity in merz ewe lambs. *Theriogenol* 1991; 36: 319-328.
28. Mas-Coma S, Bargues MD, Esteban JG. Human Fasciolosis, Fasciolosis. Dalton JP (Editor). Wallingford, Oxon, UK: Cabi Publishing 1999: 411-434.
29. Genicot B, Mouligneau F, Lekeux P. Economic and production consequences of liver fluke disease in double-muscled fattening cattle. *J Vet Med Series B* 1991;38: 203-208.
30. Marley SE, Corwin RM, Hutchesan DP. Effect of *Fasciola hepatica* on productivity of beef steers from pasture through feedlot. *Agri-Pract* 1996; 17: 18-23.
31. Johnson EG. Effects of liver fluke on feedlot performance. *Agri-Pract* 1991; 12: 33-36.
32. Torgerson P, Claxton J, Epidemiology and Control, Fasciolosis. Dalton JP (Editor). Wallingford, Oxon, UK: Cabi Publishing 1999: 113-149.

33. Özyer İ. Adana Et ve Balık Kurumunda imha edilen ruminant karaciğerlerinde görülen helmint türleri ve ekonomik önemleri. Etlik Vet Mikrobiyol Derg 1990; 6: 67-78.
34. Özer E, Özcan C, Arslan N, et al. Elazığ Et ve Balık Kurumunda atılan koyun karaciğerlerinde bakteriyel ve paraziter etkenlerle bunların oluşturduğu ekonomik kayıplar. Turk J Vet Anim Sci 1996; 20: 191-201.
35. Kaplan M, Kuk S. Elazığ ELET AŞ Kesimhanesinde 1998-2000 yılları arasında kesilen hayvanlarda fasyoliaz görülme sıklığı. 12. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Elazığ 2001; 149.
36. Gargılı A, Tüzer E, Gülanber A, et al. Trakya’da kesilen koyun ve sığırlarda karaciğer trematod enfeksiyonlarının yaygınlığı. Turk J Vet Anim Sci 1999; 23: 115-116.
37. Yıldırım A, Kozan E, Kara M, et al. Kayseri bölgesinde kapalı sistemde yetiştirilen sığırlarda helmint enfeksiyonlarının durumu. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2000; 47: 333-337.
38. Şimşek S, Köroğlu E, Ütük AE, et al. 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 2006; 30: 411-415.
39. Simsek S, Risvanli A, Utuk AE, et al. Evaluation of relationship between repeat breeding and *Fasciola hepatica* and hydatid cyst infections in cows in Elazig district of eastern Turkey Res Vet Sci 2007; 83: 102-104.

40. Balkaya İ, Şimşek S, Erzurum'da kesilen sığırlarda hidatidosis ve fasciolosis'in yaygınlığı ve ekonomik önemi. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 2010; 16 (5): 793-797.
41. Bacerra-Rozo WM. Considerations on sustainable strategies for the control of *Fasciola hepatica* in Latin America. Rev Colom Ciencias Pecuarias 2001; 14(1): 28-35.
42. Roberts JA, Suuhardono. Approaches to the control of fasciolosis in ruminants. Int J Parasitol 1996; 26: 971-981.
43. Yilma JM, Malone JB. A geographic information system forecast model for strategic control of *Fasciolosis* in Ethiopia. Vet Parasitol 1998; 78(2): 103-127.
44. Spithill TW, Smooker PM, Copeman DB. *Fasciola gigantica*: Epidemiology, control, Immunology and molecular Biology. Dalton JP (Editor). Wallingford, Oxon, UK: Cabi Publishing 1999: 465-525.
45. Sangster N, Batterham P, Chapman HD, et al. Resistance to parasitic drugs: The role of molecular diagnosis. Int J Parasitol 2002; 32: 637-653.
46. Sangster N, Dobson RJ. Anthelmintic Resistance, The Biology of Nematodes. Lee DL (Editor). Harwood 2002: 531-567.
47. Barger I. Control by management. Vet Parasitol 1997; 72: 493-506.
48. Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard R, et al. Drug resistance in veterinary helminths. Trends Parasitol 2004; 20: 469-76.

49. Coles GC, Bauer C, Borgsteede FH, et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 1992; 44: 35-44.
50. Nogales E, Downing KH, Amos LA, et al. Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat Struct Mol Biol* 1998; 5: 451-458.
51. Overend DJ, Bowen FL. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust Vet J* 1995; 72: 275-276.
52. Fairweather I. Triclabendazole: new skills to unravel an oldish enigma. *J Helminthol* 2005; 79: 227-234.
53. Mitchell GBB. Update on Fasciolosis in cattle and sheep. *In Pract* 2002; 24: 378-385.
54. Prichard RK. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends Parasitol* 2001; 17: 445-453.
55. Kwa MS, Veenstra JG, Roos MH. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 63: 299-303.
56. Downing KH. Structural basis for the action of drugs that affect microtubule dynamics. *Emerg Therap Targets* 2000; 4: 219-237.

57. Mottier L, Alvarez L, Fairweather I, et al. Resistance induced changes on TCBZ-transport in *Fasciola hepatica*: ivermectin reversal effect. J Parasitol 2006; 92: 1355-1360.
58. Alvarez AI, Solana HD, Mottier MI, et al. Altered drug influx/efflux and enhanced metabolic activity in triclabendazole-resistant liver flukes. Parasitol 2005; 131: 501-510.
59. Mottier L, Alvarez L, Ceballos L, et al. Drug transport mechanisms in helminth parasites: passive diffusion of benzimidazole anthelmintics. Exp Parasitol 2006; 113: 49-57.
60. Coles GC, Stafford KA. Activity of oxyclozanide, nitroxynil, clorsulon and albendazole against adult triclabendazole resistant *Fasciola hepatica*. Vet Rec 2001; 148: 723-724.
61. Franzen C, Salzberger B. Analysis of the beta-tubulin gene from *Vittaforma corneae* suggests benzimidazole resistance. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(2): 790-793.
62. Ma Z, Yoshimura MA, Michailides TJ. Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. Appl Environ Microbiol 2003; 69 (12):7145-7152.
63. Humbert JF, Cabaret J, Elard L, et al. Molecular approaches to studying benzimidazole resistance in trichostrongylid nematode parasites of small ruminants. Vet Parasitol 2001; 101(3-4): 405-414.

64. Coles GC. Anthelmintic resistance-looking to the future: A UK perspective. Res Vet Sci 2005; 78: 99-108.
65. Gasser RB, Monti JR. Identification of parasitic nematodes by PCR-SSCP of ITS-2 rDNA. Mol Cel Prob 1997; 11: 201-209.
66. Ütük AE, Şimşek S, Köroğlu E. Echinococcus cinsinin moleküler genetik karakterizasyonu. Türk Parazitol Derg 2005; 29: 171-176.
67. Boray JC, De Bono D. Drug Resistance in *Fasciola hepatica*, Advances in Veterinary Sciences. Outteridge PM, Richards RD (Editors). Australia, Artarmon: 1989: 166.
68. Lane G. Anthelmintic resistance. Vet Rec 1998; 143: 232.
69. O'brain DJ. Fasciolosis: a threat to livestock. Irish Vet J 1998; 51: 539-541.
70. Mitchell GBB, Maris L, Bonniwell MA. Triclabendazole-resistance liver fluke in scottish sheep. Vet Rec 1988; 143: 399.
71. Thomas I, Coles GC, Duffus K. Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica* in South-West Wales. Vet Rec 2000; 146: 200.
72. Moll L, Gaasenbeek CP, Vellema P, et al. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in the Netherlands. Vet Parasitol 2000; 91: 153-158.
73. Gaasenbeek CP, Moll L, Cornelissen JB, et al. An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. Vet Parasitol 2001; 95:37-43.

74. Alvarez-Sanchez MA, Mainer-Jaime RC, Perez-Garcia J, et al. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. Vet Rec 2006; 159: 424-425.
75. Çırak VY, Güleğen E, Bauer C. Benzimidazole resistance in cyathostomin populations on horse farms in western Anatolia, Turkey. Parasitol Res 2004; 93: 392-395.
76. Köse M, Kozan E, Sevimli FK, et al. The resistance of nematode parasites in sheep against anthelmintic drugs widely used in western Turkey. Parasitol Res 2007; 101: 563-567.
77. Simsek S, Utuk AE, Balkaya I. Molecular differentiation of Turkey cattle isolates of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. Helminthologia 2011; 48(1): 3-7.
78. Boray JC. Experimental fasciolosis in Australia. Adv Parasitol 1993; 7:95-210.
79. Yadav SC, Sharma RL, Kalichoran A, Mehra UR, Dass RS, Verma AK. Primary experimental infection of riverine buffaloes with *Fasciola gigantica*. Vet Parasitol 1999; 82: 285-296.
80. Nogales E, Downing KH, Amos LA, Lowe J. Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. Nat Struct Biol 1998; 5: 451-8.
81. Morrisette NS, Mitra A, Sept D, Sibley LD. Dinitroanilines bind-tubulin to disrupt microtubules. Mol Biol Cell 2004; 15: 1960-8.

82. Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard R, von Samson-Himmelstjerna G, Sangster NC. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol* 2004; 20: 469-76.
83. Fairweather I. Triclabendazole: new skills to unravel an old(ish) enigma. *J Helminthol* 2005;79:227–34.
84. Ryan, L.A., Hoey, E., Trudgett, A., Fairweather, I., Fuchs, M., Robinson, M.W., Chambers, E., Timson, D., Ryan, E., Fetwell, T., Ivens, A., Bentley, G. & Johnston, D. (2008) *Fasciola hepatica* expresses multiple α - and β -tubulin isoforms. *Molecular and Biochemical Parasitology* 159, 73–78.
85. Prichard RK. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends Parasitol* 2001; 17: 445–53.
86. Ghisi M, Kaminsky R, Maser P. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. *Vet Parasitol* 2007; 144: 313-20.
87. Robinson MW, Hoey, EM, Fairweather I, Dalton, JP, McGonigle S, Trudgett A. 2001. Characterisation of a β -tubulin gene from the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Int. J. Parasitol.* 31, 1264-1268.
88. Boray JC.. Trematode infections of domestic animals. In *Chemotherapy of Parasitic Diseases*, ed. W.C. Campbell & R.S. Rew, pp. 401–25. New York 1986: Plenum Press.
89. Kassai T, Takáts C, Fok É, Redl P. Activity of luxabendazole against liver flukes, gastrointestinal roundworms, and lungworms in naturally infected sheep. *Parasitology Research* 153, 14-18.

90. Boray JC. Drug resistance in *Fasciola hepatica*. In *Resistance of Parasites to Antiparasitic Drugs*, ed. Boray PJ. Martin & R.T. Roush 1990, pp. 51-60. Rahway, New Jersey: MSD AGVET.
91. Boray JC, Crowfoot PD, Strong, MB, Allison JR, Schellenbaum M, Von Oorelli M, Sarasin G. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole (1983). *Veterinary Record* 113, 315-7.
92. Fairweather I, Boray JC. Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance and its Management. *The Veterinary Journal* (1999), 158, 81-112.
93. Teofanova D, Kantzoura V, Walker S, Radoslavov G, Hristov P, Theodoropoulos G, Bankov I, Trudgett A. Genetic diversity of liver flukes (*Fasciola hepatica*) from Eastern Europe. *Infection, Genetics and Evolution* 11, (2011) 109-115.

8. ÖZGEÇMİŞ

10.06.1982 tarihinde Burdur’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Bahçelievler İÖÖ (1996) yılında tamamladıktan sonra 1999 yılında Burdur Cumhuriyet Lise’sinden mezun oldu. Lisans eğitimini Elazığ Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nde 2007 yılında tamamladıktan sonra 2012 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Evlidir.

