



T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**VAN BELEDİYE MEZBAHASINDA KESİLEN RUMİNANTLARDA
PARAMPHİSTOMUM spp.'NİN MOLEKÜLER
İDENTİFİKASYONU**

Yusuf PADAK

PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe KARAKUŞ

VAN-2019

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VAN BELEDİYE MEZBAHASINDA KESİLEN RUMİNANTLARDA
PARAMPHISTOMUM spp.'NİN MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU**

Yusuf Padak

PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe KARAKUŞ

VAN-2019

Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TYL 2018-6882 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

KABUL VE ONAY

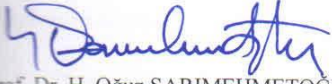
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji (Veteriner Programı) Anabilim Dalında Yusuf PADAK tarafından hazırlanan "Van Belediye Mezbahasında Kesilen Ruminantlarda *Paramphistomum* spp.'nin Moleküler İdentifikasyonu" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04/07/2019

Prof. Dr. M. Serdar DEĞER

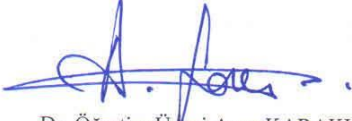
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Jüri Başkanı


Prof. Dr. H. Oğuz SARİMEHMETOĞLU

Ankara Üniversitesi

Jüri Üyesi


Dr. Öğretim Üyesi Ayşe KARAKUŞ

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Jüri Üyesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

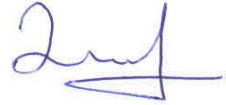
Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Van Belediye Mezbahasında Kesilen Ruminantlarda *Paramphistomum* spp.'nin Moleküler İdentifikasyonu" başlıklı tezimin; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Yusuf PADAK

Tarih: 04.07.2019

İmza:



TEŞEKKÜR

Bu tez çalıőmasının gerçekleőmesinde büyük katkısı olan ve benden daima desteğini esirgemeyen ve yol gösteren danışman hocam Dr. Öğretim yesi Ayşe KARAKUŞ'a, çalıőmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Serdar DEğER, Prof. Dr. Kamile Biçek, Prof. Dr. Nalan ÖZDAL, Dr. Öğretim yesi Vural DENİZHAN, Dr. Öğretim yesi Bekir OğUZ, Öğr. Gör. M. Faruk YİğİT ve TYL 2018-6882 No'lu proje ile bana destek veren Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Baőkanlıęına sonsuz teőekkürlerimi sunarım.



ÖZET

Padak Y., Van Belediye Mezbahasında Kesilen Ruminantlarda *Paramphistomum* spp.'nin Moleküler İdentifikasyonu, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalı (Veteriner Programı) Yüksek lisans Tezi, Van, 2019. *Paramphistomum* türlerinin morfolojik olarak teşhisi mikroskopik yöntemlerle yetersiz olduğundan, kesin teşhis için moleküler yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma Mart 2018–Eylül 2018 tarihleri arasında Van Belediye mezbahasına kesime getirilen ruminantlarda bulunan *Paramphistomum* spp.'nin moleküler yöntemler ile identifikasyonu amaçlandı. Çalışma materyali, toplam 100 adet enfekte ruminantdan (50 sığır ve 50 koyun) toplanan ergin *Paramphistomum* spp.'lerden oluşmaktadır. *Paramphistomum* parazitlerinin DNA izolasyonları, ticari kit ile yapıldıktan sonra rDNA ITS2 gen bölgesi PCR ile çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek 399 bp'lik bantlar elde edildi. Amplikonlar sekanslanmış ve BLAST ile Genbank'daki referans sekanslarla karşılaştırıldı. İzolatların genotipleri tam veya en yakın benzerliklerine göre belirlendi. Ayrıca, Neighbour-Joining Tree kullanılarak MEGA 7 program ile filogenetik ağaç oluşturuldu. Çalışmamızda elde edilen 10 adet PCR ürününden çift yönlü sekans analizi yapıldı. Sekans analizi sonucu 5 koyun ve 3 sığırdan *Paramphistomum leydeni*, 2 adet sığırdan ise *Calicophoron daubneyi* tanımlandı. Sonuç olarak, Türkiye'de daha önce morfolojik tanı yöntemleri ile varlığı bildirilen *Calicophoron daubneyi*'nin Van ilinde moleküler yöntemler ile varlığı kesinlik kazanmış olup, ayrıca daha önce Türkiye'de bildirilmeyen *P. leydeni* ise ilk defa moleküler yöntemlerle bu çalışma ile tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Paramphistomum, PCR, Moleküler İdentifikasyon, Van

ABSTRACT

Padak Y., Molecular Identification of *Paramphistomum* spp. in Ruminants Cut in Van Municipality Slaughterhouse, Van Yuzuncu Yıl University, Institute of Health Science, Department of Parasitology, Master Thesis, Van, 2019 Since the morphological diagnosis of *Paramphistomum* species is insufficient by microscopic methods, molecular methods are needed for definitive diagnosis. In this study, it was aimed to identify by molecular methods of *Paramphistomum* spp in ruminants that were brought in Van Municipality slaughterhouse between March 2018 and September 2018. The study material consisted of adult *Paramphistomum* spp, collected from 100 infected ruminants (50 cattle and 50 sheep). DNA isolations of *Paramphistomum* parasites were made by commercial kit and then rDNA ITS2 gene region was amplified by PCR. The resulting PCR products were run on agarose gel and 399 bp bands were obtained. Amplicons were sequenced and compared with reference sequences in Genbank with BLAST. Genotypes of isolates were determined according to their complete or nearest similarities. Also, a phylogenetic tree was created with MEGA 7 program by using Neighbor-Joining Tree. In our study, bi-directional sequence analysis was performed from 10 PCR products obtained. As a result of the sequence analysis, 5 sheep and 3 cattle were identified as *Paramphistomum leydeni*, while 2 cattle were identified as *Calicophoron daubneyi*. In conclusion, previously diagnosed with of morphological methods *C. daubneyi* in Turkey which has become definite the diagnosis with molecular methods in Van province. Also the presence of the previously unreported *P. leydeni* was determined by molecular methods for the first time in Turkey.

Keywords: *Paramphistomum*, PCR, Molecular identification, Van

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	Error! Bookmark not defined.
ETİK BEYAN.....	Error! Bookmark not defined.
TEŞEKKÜR.....	V
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
SİMGELER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Üstaile: Paramphistomoidea (Stiles ve Goldberger, 1910).....	3
2.1.1. Aile: Paramphistomidae (Fisthoeder, 1901)	4
2.2. Etkenlerin Morfolojisi.....	8
2.3. Paramphistomiasis	9
2.3.1. Hastalık etkenlerinin yaşam döngüsü ve çoğalması	9
2.3.2. Yaşam döngüsü.....	9
2.2.3. Epidemiyoloji.....	11
2.2.4. Klinik belirtileri	11
2.2.5. Patojenite ve immünite	12
2.2.6. Teşhis	13
2.2.7. Tedavi	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1. Gereç	15
3.2. Moleküler Analiz	15
2.4. Mastermix hazırlanışı	17

2.5. Sekans Analizi ve Filogenetik Analiz.....	17
4. BULGULAR.....	18
5. TARTIŞMA.....	21
KAYNAKLAR	26
ÖZGEÇMİŞ	300
EKLER.....	311
EK 1: Etik kurul onay formu	31
EK 2: Lisansüstü Tez Orjinallik Raporu.....	35



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
spp.	: Subspecies (altcins)
µm	: Mikrometre
Sin.	: Sinonim
ITS	: Internal transcribed spacer
rDNA	: Ribozomal Deoksiribo Nükleik asit
PBS	: Phosphate Buffer Saline

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1.** Rumen papillalarının arasında erişkin *Paramphistomum* parazitleri 15
- Şekil 2.** Sığırlarda bulunan *Paramphistomum* türlerinde rDNA ITS2 gen bölgesi
PCR amplifikasyonu (Amplikon uzunluğu 399 bp). 18
- Şekil 3.** Koyunlarda bulunan *Paramphistomum* türlerinde rDNA ITS2 gen bölgesi
PCR amplifikasyonu (Amplikon uzunluğu 399 bp). 19
- Şekil 4.** Çalışmada elde edilen izolatların, Genbank'tan elde edilen diziler ile
filogenetik ilişkisi. 20

1. GİRİŞ

Trematodlar halk arasında ‘kelebek‘ olarak adlandırılan yassı helmintlerdir. Vücutları bölümlenmemiş olup tek parçalıdır. Genel olarak lanset ve yaprak şeklinde (*Fasciolidae*), çok nadir olarak konik (*Paramphistomidae*), hafif oval kahve çekirdeği şeklinde (*Paragonimus* spp.) yâda iplik şeklinde (*Shistosoma* spp. dişileri) yapı gösterirler. Bir veya daha çok sayıda çekmen adı verilen yapışma organları vardır. (Tınar ve ark., 2006).

Paramphistomiasis ya da amphistomosis, evcil ve yabani birçok ruminant türünü enfekte edebilen *Paramphistomidae* ailesindeki parazitlerin neden olduğu bir hastalık olarak bilinmektedir (Şenlik, 2013). Parazitin erişkin formu rumen ve retikulumda; genç formu ise ince bağırsakta yaşar. Az sayıdaki erişkin parazit konaklarda ciddi bir problem oluşturmazken, çok sayıdaki parazitler rumen dokusunda yıkıma neden olmaktadır. Olgun parazitler rumen papillalarında tahribat ve kayıplara neden olmasına rağmen klinik olarak belirti vermeyebilir. Duodenum ile ileumun başlangıç bölgesine yerleşen genç ve olgunlaşmamış *Paramphistomum*’lar bu bölgede ciddi hemoraji ve nekrozlara neden olmaktadır. Olgunları fazla patojen olmayan, ancak genç şekilleri ciddi patolojik bozukluklar ve klinik belirtiler gösteren *Paramphistomum* türleri verim kayıplarına sebep olan ve hayvan sağlığını olumsuz yönde etkileyen bir trematoddur. Vücudu konik veya armut şeklinde olup, 5-15 mm uzunluğunda, 2-4 mm çapındadır, çapı önden arkaya doğru artar. Dorsalden hafifçe konveks (dışbükey), ventralden ise konkavdır (içbükey). Arka çekmenin çapı ağız çekmeninkinden birkaç kat daha büyüktür. Ağız çekmeninde divertikül yoktur, özofagus uzun olup posterior bulbus taşımaz, sekumları dallanma göstermez ve arka çekmene kadar boru şeklinde devam eder (Güralp, 1981; Coşkun, 1988; Celep ve ark., 1990; Tınar ve ark., 2006).

Paramphistomum cinsinde yer alan türler ruminantların mide (rumen-reticulum) ve nadiren safra kanallarında yaşarlar. Tropikal ve subropikal iklim bölgelerindeki tüm ülkelerde görülürler. Bazı çalışmalarda ağız çekmeni ile arka çekmen arasındaki büyüklük oranına göre bu cinste *Paramphistomum* ve *Explanatum* olmak üzere iki alt cins olduğunu bildirmişlerdir (Tınar ve ark., 2006).

Paramphistomiasis ara konakların varlığına bağılı olarak dünyanın hemen her bölgesinde görölmesine rağmen, klinik enfeksiyonların çoğı tropik ve subtropik bölgelerde görölmemektedir. Türkiye’de en yaygın tür *P.cervi* olup, diğıer türler ise *P.ichikawai* ve *Calicophoron daubneyi* olarak kabul edilmektedir (Şenlik, 2013).

Ekonomik açıdan önemli olan bu helmintlerin tanımlanması için geleneksel yöntem çoğunlukla morfolojik karakterlere dayanır. Ayrıca, geleneksel teşhis yöntemi özellikle morfolojik olarak benzer, ancak ilaç direnci ve duyarlılığı bakımından genetik olarak farklı olan, trematodlar gibi yumuşak gövdeli parazitlerde zor ve hatalı olmaktadır (Ronghang ve ark., 2018). Bu yapısal parazitlerin tanımlanmasındaki problemler ultra yapısal gözlemler kullanılarak çözülebilir. (Roy ve Tandon, 1993; Tandon ve Roy, 2002). Örneğın polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak, yüksek oranda korunduğı bilinen ITS2 rDNA gibi moleküler markerler üzerinde çalışma yapılarak teşhise gidilebilmektedir (Sharma ve ark., 2016-2016a).

Paramphistomum türleri morfolojik olarak benzer olabileceğinden, moleküler biyolojik teknikler ile sınıflandırma ve türlerin tanımlanmasında yardımcı olabilmektedir. Bazı *Paramphistomum*’lar cins ve türleri Itagaki ve ark. (2003) ve Rinaldi ve ark. (2005) gibi araştırmacılar tarafında moleküler yöntemler ile ITS-2 gen bölgesi üzerine çalışarak *Paramphistomum* türlerini karakterize etmişlerdir (Sanabria ve ark., 2011).

Bu çalışma ile Van ilinde bulunan ruminantlar kesim sonrası muayene edilerek, rumen ve retikulumda bulunan *Paramphistomum* spp. türlerinin moleküler yöntemler kullanılarak identifikasyonu amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Üst aile: *Paramphistomoidea* (Stiles ve Goldberger, 1910)

Ruminantlarda hastalığa neden olan türler *Paramphistomoidea* ailesinde yer alan *Paramphistomidae* ve *Gastrothylacidae* ailelerinde bulunmaktadır. Koyun ve keçileri enfekte eden türler ise çoğunlukla *Paramphistomidae* ailesinde yer alan *Paramphistomum*, *Cotylophoron*, *Calicophoron* ve *Gigantocotyle* cinslerinde bulunmaktadır. Bununla birlikte daha çok sığır, manda ve zebuları enfekte eden *Gastrothylacidae* ailesinde *Fischoederius*, *Carnyerius* ve *Gastrothylacidae* ailesinde *Fischoederius*, *Carnyerius* ve *Gasthylax* cinslerindeki türlerin de nadiren koyun ve keçilerde görülebildiği bildirilmektedir. Bu üst ailede yer alan trematodların vücutları tombul ve konik olup 6-12 mm uzunluğunda, 2-5 mm kalınlığındadır, tegüment dikensizdir, ancak ağız çekmeni civarında küçük papiller vardır. Ağız ve karın çekmenleri vücudun ön ve arka uçlarındadır. Sekumlar dallanma göstermez, vücudun arka ucuna kadar uzanır. Testisler yuvarlak ve hafifçe loblanma gösterir, ovaryum testislerin arkasında yer alır. Uterus iyi gelişmiş olup dorso-lateral olarak sekumlar arasındaki geniş bir bölgeyi kaplar. Yumurtaları *Fasciola hepatica* yumurtalarına benzer ancak daha büyük (150-170 x 80-95 µm) ve gri renktedir. Gençleri sonkonakların duodenumunda, olgunları rumen ve retikulumlarında yaşayan bu trematodların gelişmelerinde tek arakonak mevcut olup, bu bir su sümüklüsüdür (Toparlık ve Tüzer, 2004; Tınar ve ark., 2006; Sanabria ve Romero, 2008; Tınar, 2011).

Paramphistomoidea üst ailesinde 3 aile yer alır.

Bunlar:

-*Paramphistomidae*: Vücudu koniktir, ventral cep yoktur.

-*Gastrothylacidae*: Vücudu koniktir, ventral cep vardır.

-*Gastrodiscidae*: Vücut kalın fakat dorsoventral yassı olup, transversal olarak iki kısma ayrılır. Avrupa' da *Paramphistomidae* ailesinden genelde iki cinste yer alan türler bulunur. Bunlar: *Paramphistomum* ve *Cotylophoron*'dur. Bu iki cinsin birbirinden ayırt edilmesi genital çekmenin bulunup-bulunmamasıyla olur. *Paramphistomum* cinsinde

genital çekmen (gonoty) yoktur, *Cotylophoron* cinsinde ise mevcuttur (Tınar ve ark., 2006).

2.1.1. Aile: *Paramphistomidae* (Fisthoeder, 1901)

Cins: *Paramphistomum* (Fischoeder, 1901)

Vücudu konik veya armut şeklinde olup, 5-15 mm uzunluğunda, 2-4 mm çapındadır, çapı önden arkaya doğru artar. Dorsalden hafifçe konveks (dışbükey), ventralden ise konkavdır (içbükey). Arka çekmenin çapı ağız çekmeninkinden birkaç kat daha büyüktür. Ağız çekmeninde divertikül yoktur, özofagus uzun olup posterior bulbus taşımaz, sekumları dallanma göstermez ve arka çekmene kadar boru şeklinde devam eder. *Paramphistomum* cinsinde yer alan türler ruminatların mide (rumen-reticulum) ve nadiren safra kanallarında yaşarlar. Tropikal ve subtropikal iklim bölgelerindeki tüm ülkelerde görülürler. Bazı yazarlar ağız çekmeni ile arka çekmen arasındaki büyüklük oranına göre bu cinste *Paramphistomum* ve *Explanatum* olmak üzere iki altcins tarif ederler (Tınar ve ark., 2006).

Bu görüşe göre *Paramphistomum* altcinsinde yer alan türlerde ağız çekmeni/arka çekmen büyüklük oranı 1/1.15-1/2.5; *Explanatum* cins altında ise 1/3.6-1/7.6 dır. Ayrıca testisler *Paramphistomum* alt cinsinde arka arkaya, *Explanatum* alt cinsinde çapraz olarak bulunur. *Paramphistomum* türleri ön midede, *Explanatum* türleri safra kanallarında yerleşirler (Tınar ve ark., 2006).

Tür: *Paramphistomum cervi* (Zeder, 1790)

Morfoloji: Bu tür, morfolojik olarak cins özelliklerini taşır, sifinkterlerde papil bulunmaz, vücut konik olup 6-12 uzunluğunda, 2-4 mm genişliğindedir, canlı iken açık kırmızı renkte olup her iki ucu daha koyudur. Farinkste ve ağız etrafında az gelişmiş papiller bulunur. Genital delik vücudun ön 1/3 inde yer alır, testisler hafifçe loblara ayrılmıştır, birbirlerinin arkasında ve ovaryumun önünde yerleşmiştir. Vitellojen bezler özofagus ile arka çekmen arasında yayılmıştır, testisler yuvarlak veya hafifçe lobludur, vücudun arka ortasını kaplar, arka arkaya ve çapraz yerleşmişlerdir, sirrus kesesi bulunmaz. Ovaryum vücudun arka 2/3 sinde ve testislerin arkasında yer alır.

Yumurtaları oval ve *F.hepatica* yumurtalarından biraz daha büyük olup 114-176 X 73-100 µm boyutlarında ve gri renktedir (Tınar ve ark., 2006).

Sonkonakları ve yerleşim yerleri:

Paramphistomum cervi'nin olgunları koyun, keçi, sığır, manda gibi ruminantların rumen ve retikulumlarında, gençleri ise duodenumda yerleşir (Tınar ve ark., 2006).

Arakonakları: Gelişmelerinde arakonak olarak *Planorbidae* ve *Melaniidae* ailelerinde yer alan su sümükleri rol oynar. *Planorbidae*'lerin kabukları disk şeklindedir. *Planorbis planorbis*, *Indoplanorbis exustus*, *Bulinus controtus*, *B.truncatus*, *B. syngenes*, *B.alluaudi* ve *Anisus vortex* türleri arakonaktır. Burgu (1980), Türkiye'deki arakonağın *Planorbis planorbis* olduğunu, Kamel ve Burgu (1986) ise *Gyraulus laevis* türü sümüklülerde de *Paramphistomum* serkerlerine rastladıklarını bildirmişlerdir (Tınar ve ark., 2006).

Yaygınlığı: *P.cervi* tropikal ve subtropikal iklim bölgeleri ve yurdumuzda da yaygındır (Tınar ve ark., 2006).

Gelişme: *Paramphistomidae*'lerin gelişmeleri *Fasciolidae*'lerin gelişmelerine benzer. Dışkıdan temizlenmiş yumurtalar 22-28°C ısıda ve sulu ortamda 12-15 günde gelişmesini tamamlar, mirasidyumlar gelişdikten sonra, yumurta kapağını açarak dışarı çıkarlar. Mirasidyumlar 200-225 X 65-70 µm boyutlarında ve 5 sıra halinde dizilmiş kirpikli hücresel plakalarla örtülmüştür. Mirasidyumların ömrü 24 saat kadardır. Çok hızlı hareket ederek arakonaklarının etrafında toplanır ve mandibula boşluğunda sümüklüye (*Planorbidae*, *Lymneidae*, *Melaniidae* ailelerindeki türler) girerler. Enfeksiyonun onüçüncü gününde 1 mm uzunluğunda, 300-330 µm genişliğinde uzun bir kese şeklinde 10-15 redi içeren sporokistler gelişir. Sporokistler patladıktan sonra rediler karaciğer ve pankreasa giderek yerleşirler. İklim koşullarına göre kız ve torun rediler oluşabilir. Redilerin içinde 350-450 µm çapında, kuyruk uzunluğu 600 µm olan serkerler gelişir ve sümüklüyü terk eder. Serkerlerin sulu ve ışıklı ortamda gelişdikten sonra ve sümüklüyü terk eder. Serkerlerin sümüklüyü terk etmeleri sulu ve ışıklı ortamda 29-30°C de 10 dakikada gerçekleşir. Bu süre iklim koşullarına göre 7-8 hafta olarak sürebilmektedir. Serkerler suda 20-30 dakika yüzer, otlara tutanarak 30-40

dakika içinde kistlenir, metaserker haline geçerler. Metaserkerler siyah renkte, yassı ve 300 µm civarında bir çapa sahiptir. Sonkonaklar tarafından otlarla birlikte alınan metaserkerler sindirimin etkisiyle abomasumda kistten kurtulur ve duodenuma geçer, mukozaya tutunarak mukoza içine ve mukoza altına girebilirler. Burada bir-iki ay kadar kalıp geliştikten sonra 0.4-2 mm uzunluğa ulaşırlar, geriye doğru göç ederek rumen ve retikuluma gelir, arka çekmenleri ile mukozaya yapışır ve buralarda gelişmelerini sürdürerek 2-3 ay içinde seksüel olgunluğa ulaşırlar. Bu süre bazı türlerde daha kısa, bazılarında ise daha uzundur. Beslenmeleri rumen içeriği ve epitel artıklarıyla olur. Hematofaj değillerdir, ancak gençleri mukozayı delmeleri veya zedelemeleri esnasında çıkan kanı absorbe ederler. Bu nedenle gençler kırmızı, olgunlar pembe renkte görülürler. Sonkonaktaki yaşam süreleri 2 ile 7 yıl arasında tespit edilmiştir (Tınar ve ark., 2006).

Tür: *Paramphistomum hiberniae* Wilmet, 1950

Genital delik özofagusun orta hizasında yer almıştır, genital sifinkterden yoksundur. Testisler yuvarlak, loplara ayrılmış ve birbirine yapışıktır. Büyüklükleri 4-7 X 1.5-2.2 mm dir. Daha çok sığırlarda görülen bir türdür. İskoçya, İrlanda ve Hollanda'dan bildirilmiştir (Tınar ve ark., 2006).

Tür: *Paramphistomum scotiae* Wilmott, 1950

Bu türün genital deliği özofagusun arka 1/3'i hizasındadır, testisler hafifçe loplu ve yapışıktır, farinkste iyi gelişmiş papiller vardır, 5 X 2.6 mm boyutlarındadır. Sığırlarda görülen bu tür İskoçya ve İrlanda'dan bildirilmiştir (Tınar ve ark., 2006).

Tür: *Paramphistomum microbothrium* Fishoeder, 1901

Testisleri derinlemesine loplara ayrılmış ve ince bir kılıf ile sarılmıştır. Büyük olan bu tür 8-11 X 2.7-3 mm boyutlarında olup, arka çekmenin çapı 2-2.5 mm dir. Sığır ve koyunlarda bulunan bu tür Afrika ve Avrupa' da bildirilmiştir (Tınar ve ark., 2006).

Tür: *Paramphistomum microbothrioides* Price and McIntos, 1944

Bu tür 5-7 X 3 mm büyüklüktedir. Karın çekmeni 1.5-1.8 mm çapındadır ve kassal fibriller çok az sayıdadır (6-9 adet). Farinkste az gelişmiş, az sayıda papil bulunur. Sığır ve koyunlarda görülen bu tür Amerika Birleşik Devletleri'nden bildirilmiştir (Tınar ve ark., 2006).

Tür: *Paramphistomum ichikawai* Fukui, 1922

Konik olan bu tür 5.42-971 mm uzunlukta, 2.21-3.43 mm genişliktedir. Ülkemizde koyunlarda bulunmuştur (Coşkun, 1988).

Cins: *Cotylophoron* Stiles ve Goldberger, 1910

Bu cinsin genel morfolojik özellikleri *Paramphistomum* cinsine benzer, ancak genital delik bir çekmen (gonotyl) ile çevrilmiştir. Bu cinste bir tür bulunur (Tınar ve ark., 2006).

Tür: *Cotylophoron cotylophorum* Fishoeder, 1901

Vücut 4.8-8 X 2.5-3.5 mm boyutlarında olup testisleri çok lopludur. Başta koyun, keçi, sığır olmak üzere diğer ruminantların rumen ve retikulumlarında parazitlenirler. Yumurtaları 125-135 X 61-68 µm büyüklüktedir. Asya, Afrika ve Amerika'da bildirilmiştir (Tınar ve ark., 2006).

Cins: *Calicophoron* Nasmark, 1937

Tür: *Calicophoron calicophorum* Fishoder, 1901 (Sin; *Paramphistomum (Explanatum) explanatum* Fukui, 1929)

Bu tür manda, sığır ve koyunlarda Avustralya ve Afrika'dan bildirilmiştir. Bu cinste yer alan *Calicophoron raja* Nasmark, 1937 Afrika'dan, *C. cauliorchis* Stiles ve Goldberger, 1910 Hindistan ve Japonya'dan bildirilmiştir (Tınar ve ark., 2006).

Cins: *Ceylonocotyle* Nasmark, 1937

Tür: *Ceylonocotyle streptocoelium* Fishoeder, 1901 (Sin: *Paramhistomum orthocoelium*).

Sığır, koyun ve antiloplarda Hindistan ve Avustralya'da bildirilmiştir. Yumurtaları 148 X 74 µm boyutlarındadır (Tınar ve ark., 2006).

Tür: *Ceylonocotyle scolicoelium* Fishoeder, 1910

Hindistan, Güney- Asya ve Afrika'da bildirilmiştir. Bu cinste bildirilen *Ceylonocotyle gigantopharynx* sığır ve mandalarda bulunmuştur (Tınar ve ark., 2006).

Cins: *Gigantocotyle* Nasmark, 1937

Tür: *Gigantocotyle explanatum* Nasmark, 1937

Sığır ve mandaların safra kanalları, safra kesesi ve duodenumlarında yaşar. Orta-Doğu, Hindistan ve Uzak-Doğu'dan bildirilmiştir (Tınar ve ark., 2006).

2.2. Etkenlerin Morfolojisi

Koyun ve keçilerde Paramphistomiasise neden olan trematodların vücutları tombul ve konik yapılıdır. Erişkin parazitler taze iken pembe ya da açık kırmızı renkte görülmekte olup, parazitler bu haliyle nar tanesini andırmaktadırlar. Erişkin parazitlerin 5-12 mm uzunluğunda, 2-4 mm genişliğinde oldukları bildirilmektedir (Rojo-Vaquez ve ark., 2012). Genç parazitler ise genellikle 1-2 mm boyutunda olup, türler arasında bazı farklılıklar bulunmakla birlikte genel morfolojik özellikleri birbirlerine benzemektedir. Ülkemizde en yaygın tür olan, *Paramphistomum cervi* de ailenin genel özelliklerini taşımakta olup, açık kırmızı renkte görülen parazitlerde testisler hafifçe loplara ayrılmış ve ovaryumun önünde yer almaktadır. Farinks ve ağız etrafında az gelişmiş papiller bulunmaktadır. Vitellojen bezler özefagus ile ovaryum arasında yer almaktadır. Bu türün yumurtaları oval şekilli olup boyutları 114-176 X 73-100 µm arasında değişmektedir. Gri renkteki yumurtaların bir kutbunda kapak bulunmakta, kapağın karşısındaki kutupta ise dışa doğru bir kalınlaşma görüldüğü bildirilmektedir (Schinieder, 2006; Tınar, 2011).

Ülkemiz ruminantlarında görülen bir diğer tür olan, *Paramphistomum ichikawai* ise 5.68-5.78 mm uzunluğunda ve 1.9-2.4 mm genişliğinde olup, loplara ayrılmış olan testisler parazitin arka 2/3'ünde birbiri ardına dizilmiş durumda, vitellojen bezler parazitin ön kısmında dorso medial olarak toplanmış olup, genital delik ise özefagal bifurkasyon noktasının gerisinde yer almakta olduğu bildirilmiştir (Coşkun, 1988).

2.3. Paramphistomiasis

2.3.1. Hastalık etkenlerinin yaşam döngüsü ve çoğalması

Etkenler koyun ve keçilerin dışında sığır, manda gibi evcil hayvanlar ile birçok yabani ruminantlarda görülmektedir. Başlıca ara konaklar *Planorbidae* ve *Bulinidae* ailesindeki akuatik salyangozlar olmakla birlikte *Melaniidae* ve *Lymnaeidae* ailelerinde yer alan bazı türler de ara konak olarak görev yapabilmektedir. *Planorbis palanorbis*, *İndoplanorbis exustus*, *Bulinus contorus*, *B.turuncatus*, *B. syngenes*, *B. alluadi* ve *Anisus vortex* bu ailelerde yer alan ara konak salyangoz türlerinden bazıları olarak bildirilmiş olup, ara konakların değişik coğrafik bölgelerdeki yayılışları farklılıklar göstermektedir. Türkiye'deki arakonaklar *Planorbidae* ailesinden *P. palanorbis* türü salyangozlar olduğu bildirilmiştir. Ayrıca aynı aileden *Gyraulus laevis* türü salyangozlarda da *Paramphistomum* sekerleri saptanmış olup bu türün de ara konak görevi yaptığı ortaya konmuştur. Nem, çevre ıssısı vb. birçok çevresel faktör akuatik özellikte olan bu salyangozların yaşama kabiliyetleri ve üreme potansiyelleri üzerinde, dolaylı olarak da enfeksiyonlar üzerinde etkili olmaktadır (Burgu, 1982; Kamel ve Burgu, 1986; Tınar, 2011).

2.3.2. Yaşam döngüsü

Erişkin parazitler ruminantların rumenlerinde, bazen retikulumlarında, gençler ise ince bağırsaklarında yerleşim göstermektedir. Erişkin parazitler tarafından üretilen yumurtalar dışkı ile dış ortama atılmaktadır. Yumurtaların konaktan atılmasıyla birlikte gelişmenin external dönemi başlamakta olup dış, ortamda cereyan eden bu dönem *Fasciola hepatica*'nın dış ortamdaki gelişmesine benzemektedir. Bu yumurtaların içerisinde ancak sulu ortamlarda miracidium gelişebilmektedir. Yumurtalarda miracidium'un gelişmesi 28 °C'lik çevre ıssında 17 günde tamamlanmaktadır. Işığın

uyarıcı etkisiyle kapağı açan miracidiumlar yumurtayı terk ederek suda yüzmeye başlamaktadırlar. Kirpikli yapıdaki bu miracidiumların yaşam süreleri oldukça kısa olup uygun şartlarda bile ancak 24 saat canlı kalabilmektedir. Salyangoz için enfektif olan miracidiumlar uygun ara konağı bulunduğu onun vücuduna girerek üzerindeki kirpikli kılıftan kurtulmakta ve sporocyst halini almakta oldukları bildirilmektedir. Salyangozdaki sporocyst'ler redi haline gelmektedirler. Redi'lerden ikinci redi ya da genç redi olarak da adlandırılan yeni nesil rediler meydana gelmekte bunlardan da serkerler oluşmaktadırlar. Redi'lerin parçalanmasıyla serbest kalan serkerler salyangozda 10 gün içinde olgunlaşarak, pigmentli olan ve 2 adet göz lekesi taşıyan olgun serkerler haline geldikleri bildirilmiştir (Schinieder, 2006, Sanabrio ve Romero, 2008, Tınar, 2011; Rojo-Vazquez ve ark, 2012).

Salyangozdaki gelişmenin süresi ısı, nem, kuraklık gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişmekte olup bu sürenin bazen 110 güne kadar uzayabildiği bildirilmiştir (Schinieder, 2006). Salyangozu terk eden serkerler sudaki bitkilere ve değişik cisimlere tutunarak 1 saat içerisinde kistlenip metaserker haline gelmektedirler. Serkerlerin kistlenmesinde sarı ve yeşil rengin diğerlerine göre daha fazla cezbedici olduğu bildirilmiştir (Burgu, 1982). Son konaklar için enfektif formlar olan metaserkerler nemli ortamlarda 3 ay kadar canlılıklarını koruyabilmektedirler (Sanabrio ve Romero, 2008; Rojo-Vazquez ve ark., 2012). Son konaklar, metaserkerli otları yemek suretiyle hastalığa yakalanmakta olup, mideden duodenuma gelen metaserkerler çeşitli enzimler ve safra tuzlarının etkisiyle üzerindeki kist duvarını parçalayarak açığa çıkıp genç parazit haline dönüşürler. Daha sonra genç parazitler ince bağırsak mukozasına derin bir şekilde tutunarak gelişmeye başlamaktadırlar. Hafif enfeksiyonlarda genç parazitler burada 3-5 hafta kaldıktan sonra rumen ve retikuluma göç ederek orada erişkin hale gelmektedirler. Şiddetli enfeksiyonlarda ise ince bağırsaklarda kalış süresi uzamakta ve dört ayı geçmekte olduğu bildirilmiştir (Lloyd ve ark., 2007). Prepatent süre 3-3,5 ay arasında değişmekte olup erişkin parazitler tarafından üretilen yumurtaların dışkı ile atılmasıyla dış ortamdaki gelişme yeniden başlamaktadır. Enfekte konaklardaki erişkin parazitlerin 4 yıl kadar yaşayabildikleri bildirilmiştir (Rojo-Vazquez ve ark., 2012).

2.2.3. Epidemiyoloji

Paramphistomum türlerinin mirasidyumları yumurtayı terk ettikten sonra en uygun koşullarda 24 saat, arakonaklardaki sporokist ve redi safhaları ise sümüklü canlı kaldığı takdirde kış süresince yaşamlarını sürdürürler. Sümüklüden çıkan serkerler ise bir saat içinde kistlenmek zorundadırlar. Serbest dönemleri çok kısadır. Metaserkerlere gelince, +4 °C de veya laboratuvar sıcaklığında, rutubetli ortamda en az 1-3 ay canlı kalırlar. *Fasciola* metaserkerleri gibi daha uzun yaşadıkları sanılmaktadır.

Paramphistomiasis bir mera enfeksiyonudur. Arakonakların su sümüklüsü olması nedeniyle hastalık çamurlu ve çok sulak meralarda otlayan hayvanlarda görülür ve mevsimsel özellik gösterir. Enfeksiyon Mart-Nisan aylarında başlar, hayvanlar otlakta kaldığı sürece devam eder. Bu durumda meraya çıkan hayvan daha çok Mayıs-Eylül aylarında enfekte olur. Geç dönem enfeksiyonlarda, genç *Paramphistomum*'lar Eylül ve Ekim'de duodenum ve abomazumda, olgunlar ise Kasım ayında rumen ve retikulumda görülürler ve buralarda yıl boyu kalırlar (Tınar ve ark., 2006).

Patojenik etki önce duodenum ve abomazumda, daha sonra rumen ve retikulumda görülür. Duodenum ve abomazumdaki gençler mukozayı delerek, olgunları ise rumen ve retikulum mukozasını yapıştırdıkları yerde boğarak tahrip ederler. Hayvanlarda parazitin etkisi sonucu eozinofili, yeterli beslenmemeleri sonucu da kaşeksi görülür. Antijenik etki enfekte hayvanlarda kısmi bağışıklık oluşturur. Koyunlar sığırlara, gençler yaşlılara göre enfeksiyona daha duyarlıdırlar. Patojenitesi hayvanda bulunan parazit sayısına bağlıdır, 2.000 den az olduklarında fazla ciddi değildir, 5.000 den sonra klinik belirtiler dikkati çeker. Kuzularda 2.700 parazit ciddi klinik belirtilere, 5.000 parazit ise ölüme neden olur (Tınar ve ark., 2006).

2.2.4. Klinik belirtileri

a) Enfeksiyon ve Duodeno Abomazal Dönemi, b) Rumen- Retikulum Dönemi olmak üzere iki safhada incelenebilir.

a)Enfeksiyon ve Duodeno–Abomazal Dönemi (Erken dönem): Erken enfeksiyonlarda ilkbahar sonu, geç enfeksiyonlarda yaz sonu sonbahar başında genç

parazitler duodenum ve abomasum mukozasındadır. Klinik belirtiler metaserkerlerin alınmasından sonraki 10 gün içinde dikkati çeker. Bu dönemde akut şekillenen hastalık, hayvanlarda düşkünlük, iştahsızlık, sulu mukuslu yeşilimtırak kahverengi pis kokulu şiddetli ishale neden olur, hayvanlar bol miktarda su içerler. Yapılacak dışkı muayenesinde yumurta bulunmaz ancak pembe renkli 2-4 mm boyutlarında genç *Paramphistomum*'lar görülebilir. Erken dönemde oluşan akut Paramphistomiasis yüksek oranlara ulaşan ölümlere neden olabilir. Hayvanlarda yavaş ilerleyen anemi, zayıflama, kaşeksi, çene altında ödem, hypoalbüminemi, kalsiyum kaybı ve genel eozinofili görülür. Plazma protein konsantrasyonunun azalması yaygın ödemlere, hidroperikardium, hidrotoraks ve vücut boşluklarında sıvı toplanmasına neden olur. Açlık, kaşeksi ile birlikte akciğer ödeminin şekillenmesi ani ölümlere yol açabilir. Nekropside, mukozaya gömülü olarak duodenumda 30.000, abomasumda 4.000 genç parazit sayılan olgularda mukozalar parazit yatağı gibidir, şiddetli akut-kataral yangılıdır, kanlı müköz salgı ile kaplıdır, peteşi ve nekroz odakları dikkati çeker (Tınar ve ark., 2006).

b)Rumen-Retikulum Dönemi (Olgun dönem): Olgunları gençlerden daha az patojendir, rumen ve retikulumda 5.000 den fazla parazit bulunduğu iştahsızlık, rumen atonisi, ruminitis ve travmatik retikülit şekillenir. Yetersiz beslenme sonucu hayvanlarda kilo kaybı, anemi, süt ve yapağı veriminde azalma dikkati çeker. Dışkı muayenesinde yumurta görülür. Nekropside; rumen ve retikulum mukozasına yapışmış parazitler, muköz salgı artışı, ödem, mukozada tahribat ve delikler dikkati çeker (Tınar ve ark., 2006).

2.2.5. Patojenite ve immünite

Paramphistomiasiste asıl patolojik etki duodenum ve abomasumda mukoza içine gömülen gençler tarafından meydana getirilir. Gençler mukozada delik açarak ve hücreleri parçalayarak ciddi lezyonlara, nekroz, ülser, kanamalara neden olur, sindirim bezlerini tahrip ederler. Olgun *Paramphistomum* türleri, arka çekmenleri ile rumen ve retikulum mukozasını emerek yapışır mukozayı boğar, tahrip eder, küçük hemorajilere, ülser ve nekroza sebep olurlar. Hayvanlarda meydana gelen beslenme bozukluğu kaşeksiye, protein kaybına bağlı olarak hayati organlarda ödemlere ve sonuçta ölüme

neden olabilir. Mukozadaki genç parazitlerin antijenik etkileriyle antikor şekillenir ve kısmi bağışıklık oluşur (Tınar ve ark., 2006).

2.2.6. Teşhis

Paramphistomiasis de klinik bulgularla teşhise gitmek çok zordur. Sonbahar ve kış başlangıcında görülen semptomlar bu hastalık hakkında şüphe uyandırır. Hastalığın laboratuvar teşhisi parazitlerin duodenum ve/veya abomazum mukozasında buldukları erken dönemde çok güç olup ancak dışkının sulandırılarak yapılan muayenesinde tesadüfen atılan 1-2 mm boyundaki gençlerin küçük beyaz boncuklar şeklinde görülmesi ile olur. Parazitler rumen ve retikuluma geçip olgunlaştıklarında, dışkının muayenesinde yumurtalar görülerek kesin teşhis konur. *Paramphistomum* spp. yumurtaları büyüklük ve şekil açısından, *Fasciola* spp. yumurtalarına benzerlik gösterir. *Cotylophoron cotylophorum* yumurtaları daha küçüktür (125x25µm). *Paramphistomum* yumurtalarının tümünde yumurta kabuğu renksiz veya soluk yeşil olduğu halde *Fasciola* spp. yumurtaları sarı-kahverengidir. *Paramphistomum* spp. yumurtalarında embrio 4-6 hücreli ve yumurtanın ortasındadır. Oysaki *Fasciola* spp. yumurtalarında embriyo bölünmemiştir ve kutuplardan birine daha yakındır. Dışkının muayenesinde; zenginleştirme yöntemlerinden sedimentasyon (çöktürme) veya potasyum iyodomerkurat uygulanır. Erken teşhiste serolojik ve alerjik reaksiyonlara başvurulabilir ise de kesin sonuç almak oldukça güçtür. Nekropside teşhis; genç veya olgun *Paramphistomum* 'ların duodenum abomasum rumen ve/veya retikulumda görülmesiyle kolayca tanımlanır. Duodenum mukozasındaki dönemlerini saptamak için histolojik kesitler yapılıp incelenmelidir (Tınar ve ark., 2006).

2.2.7. Tedavi

Paramphistomiasisin tedavisinde ilaçların parenteral yolla değil, ağız yoluyla kullanılmaları tercih edilmelidir (Tınar ve ark., 2006).

Paramphistomiasisin tedavisinde kullanılan ilaçlar ve dozları (Tınar ve ark., 2006);

Oxyclozanide: Koyunlara 15mg/kg dozda verilen ilaç genç *Paramphistomum*'lara %80-92, olgunlara %70- 90; sığırlara 10 mg/kg dozda uygulanan axyclozanide gençlere %60 olgunlara %70-90 düzeyinde etkili olmaktadır (Tınar ve ark., 2006).

Resorantüel: Koyun ve sığırlarda 65 mg/kg dozda verilen ilaç, genç parazitlere %80-99 erişkinlere %85-100 düzeylerinde etkili olmaktadır (Tınar ve ark., 2006).

Niclosamide: Koyunlara 50, sığırlara 90 mg/kg dozda verildiğinde gençlere etkilidir. Niclopholan; Koyunlara 10-15 sığırlara 6-9 mg/ 99 dozlarda uygulanan ilaç parazitin gençlerine etkili olmaktadır.

Hexachlorophene: Koyunlara 10-20 sığırlara 15-20 mg/kg dozlarda verildiğinde olgunlara etkilidir.

Hexachloroethane: Koyun ve sığırlarda 200-300 mg/kg dozlarda olgunlara etkili olduğu bildirilmektedir.

Hexachloroparaxylene: Koyunlara 150, sığırlara 125 mg/kg uygulandığında olgunlara etkili olmaktadır.

Rafoxanide; Koyunlarda 15-20mg/kg doz gençlere etkilidir.

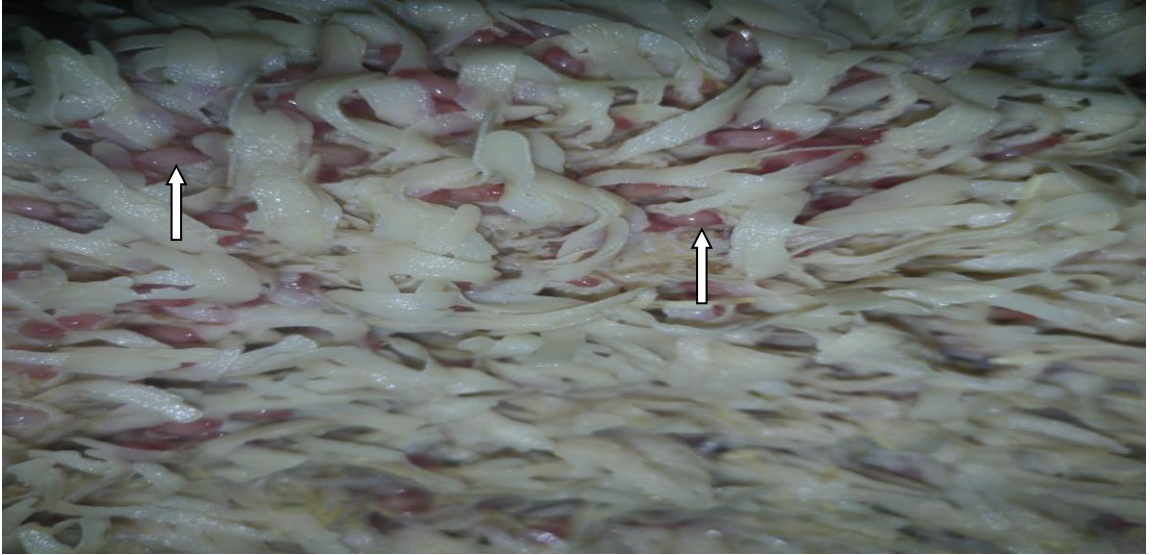
Brotianide: Sığır ve koyunlara uygulanan 15mg/kg doz hem genç, hem de olgunlara %85-90 düzeylerinde etkili bulunmuştur.

Bithionol: Koyunlara 75 mg/kg, sığırlara 35 mg/kg dozda verilir (Tınar ve ark., 2006).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışma da Mart 2018–Eylül 2018 ayları düzenli olarak Van Belediye Mezbahasına ayda 4 defa gidilerek kesim için getirilen koyun ve sığırların kesimi yapıldıktan sonra rumen ve retikulmaları makroskopik olarak incelenerek varsa parazitler bir pens yardımı ile toplanıp bir kaba konuldu. Toplanan parazitler PBS (Phosphate-buffer saline) ile yıkandıktan sonra %70'lik etanol içerisinde koyuldu. Toplanan parazitler Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında -20 °C'de çalışma yapılana kadar saklandı. Daha sonra toplanan numuneler DNA kit prosedürüne göre moleküler analizleri yapıldı.



Şekil 1. Rumen papillalarının arasında erişkin *Paramphistomum* parazitleri

3.2. Moleküler Analiz

DNA saflaştırılması Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Kat no:K0722) genel kurallarına uymak koşuluyla manuel olarak yapıldı. Genomik DNA izolasyonu için ilk önce etanolle korunmuş paramphistomlar 20 mg alınarak PBS ile 5 defa yıkandı. Daha sonra paramphistomlar bir homojenizatör (Marka: Qiagen Model: Tissue LyserII) yardımı ile iyice ezildi. Kit prosedürüne uyularak ezilen dokular ependorf tüplere aktarıldı.

Genomic DNA Purification Kit Prosedürü:

1. 20µl proteinaz K ve 180 µl digestion solüsyonu ilave edildi, 56°C'lik su banyosunda tamamen lize oluncaya kadar bekletildi. (bir gece).
2. Lizasyondan sonra 20 µl RNase A solüsyonu eklenip vortexlenerek 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
3. 200 µl Lysis solüsyonu eklenerek 15 saniye vortekslendi
4. 400 µl %50 etanol eklenerek tekrar vortexlendikten sonra bu karışım spin kolonlu tüplere aktarıldı. 6000g'de 1 dk santrifüj edildi.
5. Spin kolonlu tüplerin üzerine 500 µl Wash Buffer 1 (Etanol ile sulandırılmış) solüsyonu eklenerek 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Alttaki sıvı kısım atılarak spin kolon yeni bir tüpe yerleştirildi
7. 500 µl Wash Buffer II eklenerek 12000g'de 3 dakika santrifüj edildi.
8. Alttaki tüp atılarak spin kolonlu tüp steril edilmiş ependorfa koyulup daha sonra üstüne 200 µl Elution Buffer eklendi ve 2 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Üstteki spin kolon atılarak ependorfa tüpündeki Genomik DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

Primerler, *Paramphistomoidea* spp. *Paramphistomum* spp. (GenBank Erişim No. GU735643) PCR amplifikasyonu kullanıldı. PCR amplifikasyonu ve tam ribozomal DNA ITS2 sekansı için *Paramphistomum* spp. ITS-2 F 5'-AGAACATCGACATCTTGAAC-3' ve R 5'TATGCTTAAATTCAGCGGGT-3' (Lotfy ve ark., 2010) primerleri kullanılarak rDNA ITS2 gen bölgelerinde kısmi sekanslama yapılarak amplifiye edildi.

2.4. Mastermix hazırlanışı

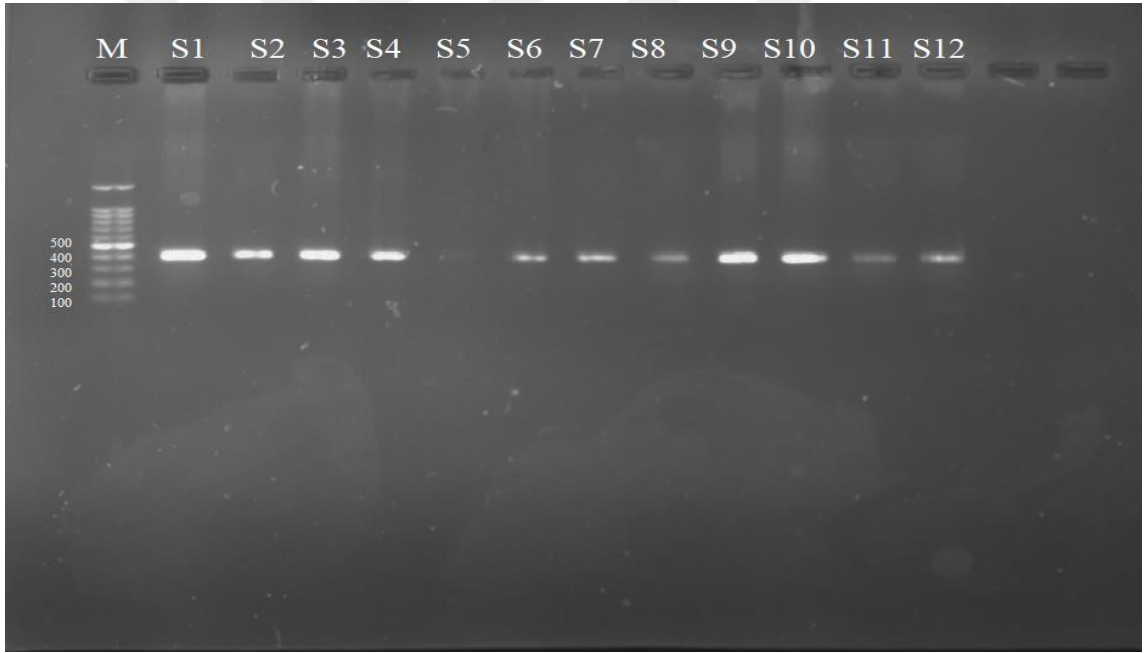
PCR için 25 µl içeren toplam hacimde; 10X PCR buffer 2.5 µl, 25mM MgCl₂ 1 µl, 25mM dNTP 0.5 µl, her bir primer 0.5 µl, Taq DNA polimeraz 5U/µl 0.2 µl, genomik DNA 5 µl ve dH₂O 14.8 µl kullanıldı. Ribozomal ITS2 sekansı için PCR şartları; PCR termal döngü şartları 94 °C de 5 dk ön denatürasyon, 94 °C'de 1 dk denatürasyon, 50 °C de 35 sn. annealing (bağlanma), uzama 72 °C'de 1-3 dk 30 siklus ve 72 °C'de 10 dk şeklinde gerçekleştirildi (Marka: BİO-RAD, Model: Power pac Basic). PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde jel red (Safe view classic, katalog no: G108) ile boyanarak koşturuldu (Elektroforez: BİO-RAD, Model: Power pac Basic). 100 Voltluk elektriksel alanda 1 saatlik koşturma işleminden sonra UV ışığı altında fotoğraflandı. (Şekil 1-2).

2.5. Sekans Analizi ve Filogenetik Analiz

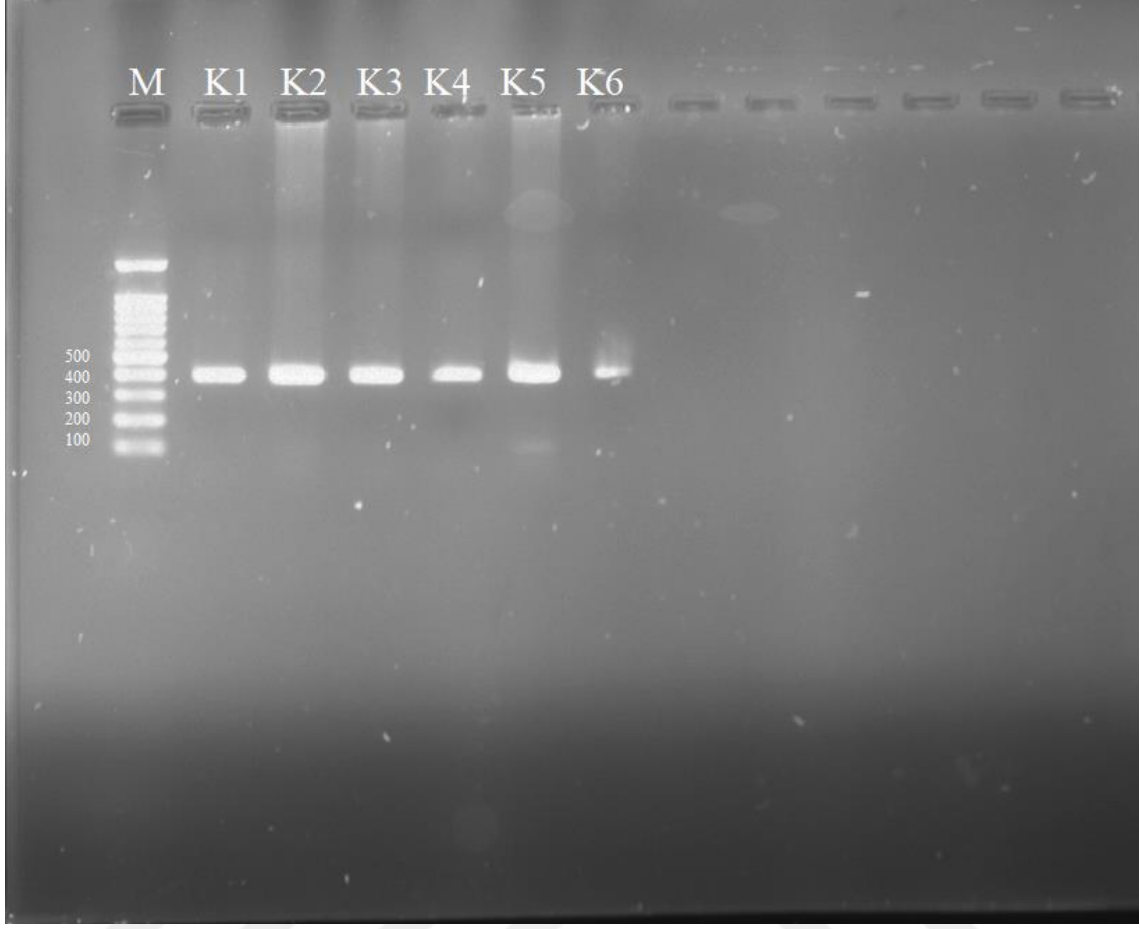
Agaroz jelde yürütülen PCR ürünlerinden DNA bandı görülen örneklerden her biri 25 µl ve primerler (10 pmol) her örnek için 2 µl olacak şekilde PCR tüplerine ayrıldı. Etiketlenerek Medsantek (İstanbul, Türkiye) firmasına sekans analizi için gönderildi. Burada pürifiye edilen amplikonlar Applied Biosystems 377 DNA Sequencer cihazı kullanılarak dizilendi. Sekanslar Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 (MEGA) programında ClustalW algoritması kullanılarak Gen bank'tan alınan KJ995529, KX668915, MH558675, KX668943, MK416145, LN610457 referanslar ile sıralandı. Neighbor-Joining metodu kullanılarak Bootstrap testi (500 tekrar) ile filogenetik ağaç oluşturuldu. İzolatlar arasındaki evrimsel uzaklık Maximum Composite Likelihood kullanılarak belirlendi. Çoğaltılan ITS2 bölgesinin sekansları ile KJ995529, KX668915, MH558675, KX668943, MK416145, LN610457 ile karşılaştırmalar sonucunda elde edilen filogenetik ağaç Şekil 3'te verilmiştir. Sekans sonucu elde edilen izolatlara ait sekansların Genbank'tan elde edilen KJ995529.1 (Sanabria ve ark., 2011), LN610457.1 (Hamidechi , 2014) ile ITS2 gen sekansının birebir (%100) aynı olduğu görüldü.

4. BULGULAR

Bu çalışma Mart 2018-Ekim 2018 arasında Van Belediye mezbahasında kesime getirilen *Paramphistomum* spp. ile enfekte sığır ve koyunların rumen ve retikülumları kesim sonrası incelendikten sonra 50 sığır, 50 koyun olmak üzere toplam 100 adet enfekte hayvandan toplanan erişkin *Paramphistomum* türünün doku numunelerinden DNA ekstraksiyonu Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit genel kurallarına uyularak manuel olarak yapıldı. DNA izolasyon işlemi yapıldıktan sonra PCR amplikonları elde edilerek, bu PCR amplikonları jelde oda sıcaklığında 100 Volt ve 50 miliamper sabit akımda 1 saat koşturuldu (Elektroforez: BİO-RAD, Model: Power pac Basic). Elektroforezde yürütülen PCR ürünlerinden 399 bp'lik ürün boyutu elde edildi (Şekil 1-2).



Şekil 2. Sığırlarda bulunan *Paramphistomum* türlerinde rDNA ITS2 gen bölgesi PCR amplifikasyonu (Amplikon uzunluğu 399 bp).

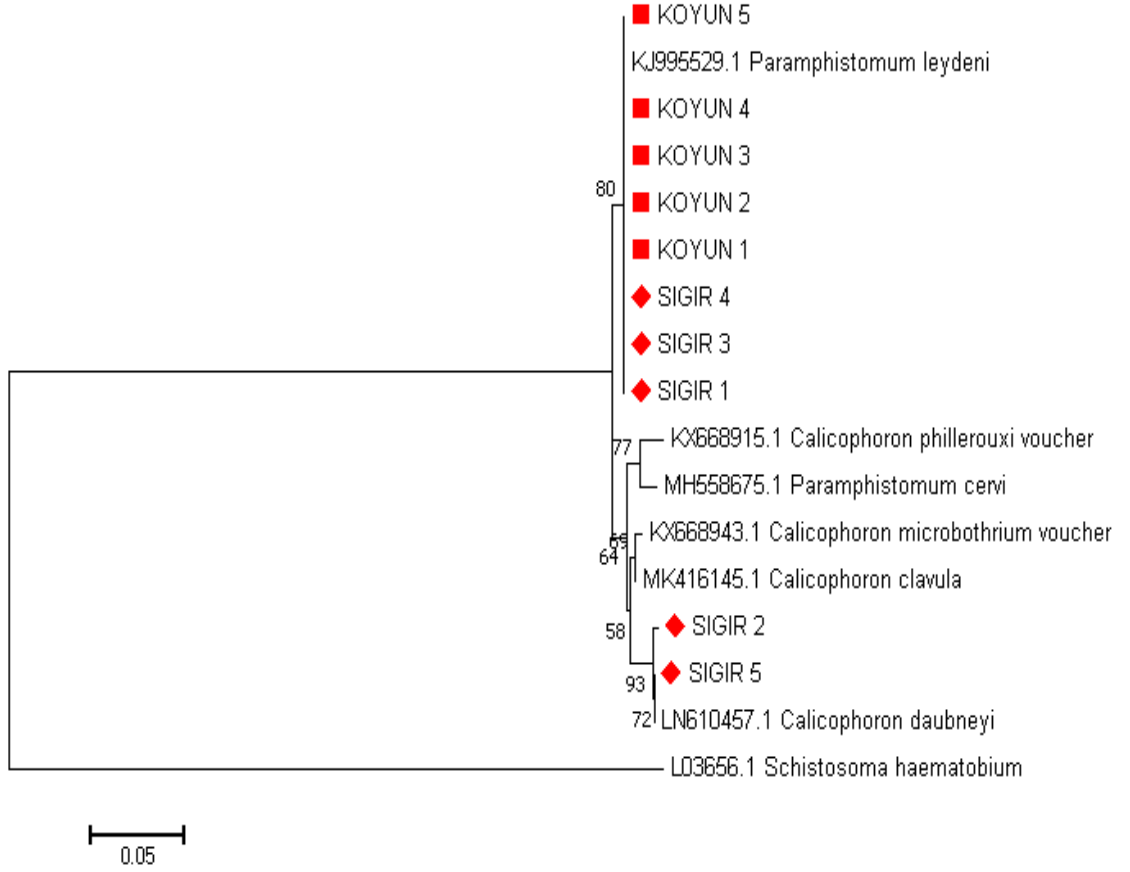


Şekil 3. Koyunlarda bulunan *Paramphistomum* türlerinde rDNA ITS2 gen bölgesi PCR amplifikasyonu (Amplikon uzunluğu 399 bp).

5 enfekte sığır, 5 enfekte koyundan toplanan erişkin *Paramphistomum* parazitlerinden elde edilen PCR ürünleri Medsantek (İstanbul, Türkiye) firmasının yapmış olduğu çift yönlü sekans analizi sonucu *C. daubneyi* ve *P. leydeni* türleri tespit edildi. Saflaştırılmış amplikonlar sonucu elde edilen *C. daubneyi* ve *P. leydeni* türleri Applied Biosystems DNA Sequencer'ı kullanılarak dizildi. Genetik Analiz versiyon 7.0 (MEGA), programdaki ClustalW algoritması kullanılarak Şekil 3'te belirtilen referanslarla sıralandı. Komşu Birleştirme yöntemi kullanılarak, bir ön yükleme testi ile filogenetik bir ağaç oluşturuldu (100 tekrar) (Şekil 3).

Çalışmada elde edilen izolatların Genbank'tan elde edilen *Paramphistomum leydeni* (KJ995529), *Calicophoron phillerouxi voucher* (KX668915), *Paramphistomum cervi* (MH558675), *Calicophoron microbothrium voucher* (KX668943), *Calicophoron clavula* (MK416145), *Calicophoron daubneyi* (LN610457) dış grup olarak seçilen

Schistosoma haematobium (L03656) ile filogenetik ilişkisi. Diziler, MEGA7 yazılımı ve Kimura 2 modeli (K2+G) modeli kullanılarak maksimum olasılık (ML) analizi ile elde edilen ağaç ile hizalanmıştır (Şekil 3).



Şekil 4. Çalışmada elde edilen izolatların, Genbank'tan elde edilen diziler ile filogenetik ilişkisi.

S (1-2-3-4-5):Sığırlardan toplanan *Paramphistomum* türleri

K (1-2-3-4-5):Koyunlardan toplanan *Paramphistomum* türleri

5. TARTIŞMA

Paramphistomiasis ya da amphistomosis, evcil ve yabani birçok ruminant enfekte edebilen *Paramphistomidae* ailesindeki parazitlerin neden olduğu bir hastalık olarak bilinmektedir. *Paramphistomum* cinsi içinde birçok patojen tür bulunmaktadır. Türkiye'deki *Paramphistomum* oranı %14.5-79.3 arasında olup, yapılan çalışmalarda ülkemizde *P. ichikawai*, *P. cervi*, *Cotylophoron daubneyi* türleri bildirilmiştir (Güralp, 1981; Celep ve ark., 1990; Coşkun, 1988; Tınar ve ark., 1992; Yıldırım ve ark., 2000; Toparlak ve Tüzer, 2000; Şenlik, 2013).

Hastalık bütün dünyada görülmek ile birlikte, tropik ve subtropik bölgelerdeki prevalansın oldukça yüksek olduğu bilinmekte olup, bu hastalık özellikle Afrika, Asya, Avusturya ve Batı-Avrupa'da daha yaygın görülmektedir. Konak, arakonak, etkin tür, meteorolojik ve çevresel faktörler gibi birçok değişkene bağlı olarak paramphistomiasis'in yayılışı bölgeden bölgeye değişiklik göstermektedir. Bu nedenle değişik ülkelerde yapılan çalışmalarda farklı prevalans oranları bildirilmektedir (Khan, 2008; Özdal ve ark., 2010).

Paramphistomlarla enfekte olmuş sığırlarda en gözlenebilir klinik işaret, yem sindiriminin azalması ve iştahın azalmasından kaynaklanan zayıflama olmuştur. Ayrıca anemi, özellikle paramphistomların olgunlaşmamış evrelerinde hematophagous aktivitesinden dolayı kan emmesinden kaynaklanmıştır. Hastalık, Türkiye'de 20 yıl öncesinde sığırlardaki prevalansı %3.3 ile %60.9 arasında değişen paramphistomiasis'in yaygınlığıyla ilgili olarak son yıllardaki çalışmalarla yeni veriler elde edilmektedir. (Coşkun, 1988; Doğanay ve Öge, 1997; Diaz ve ark. 2006; Dorny ve ark., 2011).

Türkiye'de yapılan çalışmalarda paramphistomiasis yaygınlığı Ordu'da % 33.05 (Celep, 1984), Ankara'da % 26.70 (Coşkun, 1987), Samsun'da % 15.3 (Celep ve ark., 1994), Kayseri ilinde % 14,5 (Yıldırım ve ark., 2000), Afyon'da % 13.6 (Kırcalı Sevimli ve ark., 2005), Malatya'daki sığırlarda % 1.75 (Kara ve ark., 2009) ve Van'da % 8.75 (Özdal ve ark., 2010) oranında *Paramphistomum* spp. bildirilmiştir. Bartın ilinde dışkı bakısı ile yapılan çalışmada sığırlarda *Paramphistomum* spp. ile enfekte oranı % 41.34 olarak bulunmuş (Kozan, 2014). Değer ve Biçek (2005), Van ve

yöresinde bulunan koyunlarda dışkı muayenesi sonucu *Paramphistomum* türlerini % 40 ve kesim sonrası yapmış oldukları muayene sonucunda ise % 58.2 oranında bulunduğunu bildirmişlerdir. İran'da kesim sonrası muayene sonucunda 1000 adet sığırdaki 369'u (%36.9) *Paramphistomum* spp. yönünden enfekte bulunmuştur (Khedri ve ark., 2015).

1995 yılına kadar yapılmış olan çalışmalarda *Paramphistomum cervi*'nin koyunlardaki yayılışı % 0.2 ile % 80,7 arasında, tür belirtilmeden ise *Paramphistomum* spp'nin yayılışı ise % 4.9-57.7 arasında bulunduğu bildirilmiştir (Doğanay ve Öge, 1997). Coşkun, yapmış olduğu bir çalışmada Ankara'da koyunlarda % 2.48 ve Ankara keçisinde ise % 10 olarak Paramphistomiasis yönünden enfekte bulmuştur (Coşkun, 1987). Güney Marmara bölgesi koyunlarında Paramphistomiasisin yaygınlığı % 4.9 olarak belirlenmiş olup, enfeksiyonlardan sorumlu türlerin de *P. cervi* ve *C. daubneyi* olduğu bildirilmiştir (Tınar ve ark., 1992). Ankara yöresindeki tiftik keçilerinde *C. daubneyi*'nin yaygınlığı %3 olarak tespit edilmiştir (Umur, 1991).

Son on yılda yapılan çalışmalarda hastalığın koyunlardaki yayılışı Kars'ta % 1.64 (Gıcık ve ark., 2003), Van'da % 4.43 (Özdal ve ark., 2010) Bingöl'de % 12 (Gül ve Günyaktı Kılınç, 2016) olarak tespit edilmiştir Ancak bu çalışmalarda da tür düzeyinde bir teşhis yapılamamış sonuçlar cins düzeyinde (*Paramphistomum* spp.) verilmiştir.

Dünyanın farklı coğrafyalarında yapılan çalışmalara bakıldığında Avrupa'da %5,2-4,66 (Adjide ve ark., 2000; Diakou ve Papadopoulos, 2002), Uzak Doğu'da %68,4 (Chang ve Wook, 1971), Orta Asya'da % 2,9-7,3 (Nasher, 1990; Haridy ve ark., 2006) Afrika'da % 51,6 (Phiri ve ark., 2006), İspanya'da % 36 (Diaz ve ark., 2007), oranında *Paramphistomum* spp. varlığı saptanmıştır. Bu patojenlerin dünya çapında olası dağılımı, paramphistomozun daha yaygın olabileceği ve ekonomik etkisinin daha önce düşünülenenden daha fazla olabileceği anlamına gelir (Sindičić ve ark., 2017).

Hastalığın yayılışını ortaya koymak amacıyla ülkemizin değişik illerinde yapılan çalışmalarda bölgenin iklimi, coğrafik yapısı, çalışmanın metodolojisi gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak farklı oranlar elde edilmiştir. Ancak bu çalışmaların önemli bir

kısımında sonuçlar cins düzeyinde verilmiş olup tür düzeyinde yayılışın verilmiş olduğu çalışma sayısı yetersizdir (Şenlik, 2013a).

Parazitolojide geleneksel tanı yöntemleri, belirli endemik bölgelerde epidemiyolojik çalışmalar veya fenotipik özelliklerin kökenine dayalı suşlar ve yeni türlerin tanımlanması ile ilişkili karışık taksonomik konuların çözümüne yardımcı olmak için şimdilerde çeşitli moleküler yöntemler kullanılmaktadır (Thompson, 2004).

Nekropside toplanan parazitlerin histomorfolojik olarak tür düzeyinde tanısı farinks, genital delik ve asetabulum gibi kas yapısına sahip organların tam ortalarından geçecek şekilde yapılan “median-sagittal” kesitlerin incelenmesiyle yapılmaktadır. Ancak morfolojik olarak yapılan tür ayrımların oldukça zor olduğu ve bazı dezavantajlarının bulunduğu açıklanmış olup, günümüzde özellikle filogenetik çalışmalarda kullanılan moleküler yöntemlerin, tür ayırımında alternatif bir yöntem olduğu ve bu amaçla ITS2 gen bölgesi sekansının spesifik bir marker olarak kullanılabilmesi bildirilmektedir (Lotfy ve ark., 2010).

Bu çalışma, Van ilinde çeşitli konak türlerinde (sığır ve koyun) toplanan *Paramphistomum* spp.’nin PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi kullanılarak rDNA ITS2 gen bölgesini karakterize etmek için DNA analizi yapılmıştır. Yapmış olduğumuz bu çalışmada 50 sığır ve 50 koyun olmak üzere toplam 100 enfekte ruminandan erişkin *Paramphistomum* spp. parazitleri toplandıktan sonra gerekli moleküler işlemler yapılmıştır. Moleküler yöntemlerden sonra 5 koyun ve 5 sığır olmak üzere toplam 10 adet ruminandan toplanan parazitin PCR ürünleri sekans analizine gönderilmiştir. Sekans analizi sonucunda 2 adet sığırdan elde edilen parazitin PCR ürünününün *Calicophoron daubneyi*, 5 koyun ve 3 sığırdan elde edilen parazitin PCR ürünlerinden ise *Paramphistomum leydeni* identifiye edilmiştir. Türkiye’de *Paramphistomum* spp.’ler üzerine daha önce yapılan morfolojik tanı yöntemleri ile *Calicophoron daubneyi*’nin varlığı bildirilmiş olup, bu çalışma ile Türkiye’de *Calicophoron daubneyi*’nin varlığı ilk defa moleküler yöntemler kullanılarak kesinlik kazanmıştır.

İtalya’nın Sardunya bölgesinde yapılan bir çalışmada hem dışkı hem de mezbahalarda kesimi yapılan hayvanlar muayene edilerek *Paramphistomum* spp. ‘lerin

prevalansı değerlendirilmiştir. Mezbahalarda kesimi yapılan koyunların %2'sinin, sığırların ise % 10,9'unun *Paramphistomum* spp. ile enfekte bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca rumen ve retikulumda toplanan *Paramphistomum* spp.'ler üzerine yapılan moleküler çalışmalar ve sekans analizinde Sardunya'da bulunan *Paramphistomum* spp.'lerin *Calicophoron daubneyi*'ye ait olduğunu göstermiştir (Sanna ve ark., 2016). Bu çalışma yapmış olduğumuz çalışma ile uyumluluk göstermektedir. Bu çalışma ile 2 adet sığırdan yapılan moleküler yöntemler ve sekans analizi sonucunda *Calicophoron daubneyi* identifiye edilmiştir.

İrlanda'da yapılan bir araştırmada çiftliklerdeki koyunların dışkılarında görülen yumurtalar ile yapılan moleküler çalışma sonucunda *C. daubneyi* ve *P. leydeni* tespit edilmiş olup, *P. leydeni* ilk defa bu çalışma ile o bölgede görüldüğü bildirilmiştir (Martinez-Ibeas ve ark., 2016).

Hırvatistan'da bir ren geyiğinde toplanan *Paramphistomum* parazitlerinin moleküler çalışmalar sonucunda rDNA ITS2 gen bölgesini çoğaltarak *P. cervi* ve *P. leydeni* moleküler yöntemler ile tespit edilmiştir (Sindičić ve ark., 2017). Bu çalışma da Türkiye'de daha önce makroskopik olarak elde edilen türlerden farklı olarak *Paramphistomum leydeni* türü sekans sonucunda tespit edilmiştir. Türkiye'de daha önce belirtilen *P. cervi*, *P. ichikawai* ve *Calicophoron daubneyi* türlerine ek olarak *P. leydeni* moleküler yöntemler kullanılarak ve sekans analizi sonucunda kesinlik kazanmış olup, bu çalışma ile Türkiye'de varlığı ilk defa bildirilmiştir.

Bu çalışma Van ilinde bulunan ruminantlarda *Paramphistomum* türlerinin moleküler yöntemler ile identifikasyonu amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda *Calicophoron daubneyi* moleküler yöntemler sonucunda Van ilinde var olduğu kesinlik kazanmış olup, ayrıca daha önce bildirilmeyen *P. leydeni* ise yapılan bu çalışma ile Türkiye'de ilk defa varlığı bildirilmiştir.

Sonuç olarak, ruminantlarda paramphistomiasis Van bölgesinde halen yaygın ve ekonomik kayıplarla sonuçlanan bir paraziter enfeksiyon olduğu görülmektedir. Moleküler yöntemler, teşhis yöntemleri arasında potansiyel olarak kesinlik kazandırdığı için, taksonomik tespitlere ve paramphistomiasis'in epidemiyolojisi ile ilgili çalışmalarda katkı sağlayabilir. PCR yöntemi ile rDNA ITS2 gen bölgesinin

Paramphistomum türlerinin teşhisinde Türkiye’de ilk defa yapılması ve Türkiyede daha önce belirtilmeyen bir türün tespiti yapılan çalışmanın önemini göstermektedir. Bunun dışında bu çalışma Türkiye’de *Paramphistomum* ile ilgili morfolojik teşhis ve taksonomik konuların sınırlı olmasından dolayı, paramphistomid enfeksiyonu ile ilgili önceki bulguların dikkatlice gözden geçirilmesi gerektiğini de göstermektedir.



KAYNAKLAR

- Adjide VS, Abrous M, Adjide CC, Dreyfuss G, Lecompte A, Cabaret J, ve ark. Prevalence of *Paramphistomum daubneyi* infection in cattle in central France. *Vet Parasitol.* 2000; 87: 133-38.
- Burgu A. Eskişehir çifteler harası yöresinde koyunlarda *paramphistomum cervi* schrank, 1790'ın biyolojisi üzerine çalışmalar [Doktora tezi]. Ankara: Ankara Üniversitesi; 1980.
- Burgu A. Kistlenme sırasında *Paramphistomum cervi* serkerlerinde renk seçimi. *Ankara Univ Vet Fak Derg.* 1982;29.143-50.
- Celep A, Açıcı M, Çetindağ M, Coşkun ŞZ, Gürsoy S. Samsun yöresi sığırlarında helmintolojik araştırmalar. *Etlik Vet Mikrob Derg.* 1990;6(6):117-30.
- Celep A, Açıcı M, Çetindağ M, Gürbüz İ. Samsun yöresi sığırlarında paraziter epidemiyolojik çalışmalar. *Etlik Vet Mikrob Derg.* 1994; 7(5):153-62.
- Celep A. Samsun ve Ordu illeri ile ilçelerinde sığırlarda gaita muayene sonuçlarına göre tespit edilebilen helmintolojik bulgular ve perifer kan frotisi muayene sonuçları. *Etlik Vet Mikrob Derg.* 1984; 5(6-7): 106-12.
- Chang LW, Wook LK. Epizootological survey on infestation rate of helminths in Korean native. *Korean J Parasitol.* 1971;9(2):54-7.
- Coşkun ŞZ. Ankara mezbahasında kesilen ruminantlarda paramphistomiasis'in yayılışı ve görülen türler [Doktora tezi]. Ankara: Ankara Üniversitesi; 1987.
- Coşkun ŞZ. Ruminantlarda *Paramphistomum* türlerinin bulunuş ve yayılışı. *Turk J Vet Anim Sci.* 1988;12(3):168-79.
- Değer S, Biçek K. Van ve Yöresinde Koyunlarda Endoparaziter Fauna Tespiti ve Paraziter İnvazyonların Kontrolü Üzerine Öneriler. *YYÜ Vet Fak Derg.* 2005;16(1):51-4.
- Diakou A, Papadopoulos E. Prevalence of gastrointestinal parasites of cattle in Greece. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society.* 2002;53(4):304-09.
- Diaz P, Lomba C, Pedreira J, Arias M, Sanchez-Andrade R, Suarez JL, ve ark. Analysis of the IgG antibody response against *Paramphistomidae* trematoda in naturally infected cattle: application to serological surveys. *Veterinary Parasitology.* 2006;140(3-4):281-88.
- Diaz P, Pedreira J, Sanchez-And R, Suarez JL, Arias MS, Francisco L, ve ark. Risk periods of infection by *Calicophoron daubneyi* (Digenea: *Paramphistomidae*) in cattle from oceanic climate areas. *Parasitol Res.* 2007;101(2): 339-42.
- Doğanay A, Öge S. Türkiyede koyun ve keçilerde görülen helmintler. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* 1997;3:97-114.

Dorny P, Stoliaroff V, Charlier J, Meas S, Sorn S, Chea B, ve ark. Infections with gastrointestinal nematodes, Fasciola and Paramphistomum in cattle in Cambodia and their association with morbidity parameters. *Vet Parasitol.* 2011;175(3-4):293-99.

Gıcık Y, Arslan MA, Kara M, Köse M. Kars ilinde kesilen koyunlarda Paramphistomiasisin yaygınlığı. *T Parazitol Derg.* 2003;27:260-61.

Gül A, Günyaktı Kılınç Ş. Bingöl Belediye Mezbahasında Kesimi Yapılan Koyun ve Keçilerde Dışkı Bakılarına Göre Endoparaziterin Yaygınlığının Araştırılması. *Dicle Üniv Vet Fak Derg.* 2016;2:61-6.

Güralp N. *Helmintoloji.* 2. Baskı. Ankara: Ankara Üniv Basımevi; 1981, s. 266-368.

Hamıdechı A. La paramphistomose gastro-duodénales des ruminants dans le nord-est algérien: investigations sur les bovins et le mollusque hôte [Master Thesis]. Constantine: Constantine University; 2014.

Haridy FM, El-Sherbiny GT, Morsy TA. Some parasitic flukes infecting farm animals in Al-Santa Center, Gharbia Governorate. *J Egypt Soc Parasitol.* 2006;36(1):259-64.

Itagaki T, Tsumagari N, Tsutsumi K, Chinone S. Discrimination of three amphistome species by PCR-RFLP based on rDNA ITS2 markers. *J Vet Med Sci.* 2003;65:931-33.

Kamel EG, Burgu A. First record of fresh water snail *gyraulus laevis* (Alder) naturally infected with *paramphistomum cercaria* from Turkey. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 1986; 33:352-62.

Kara M, Gıcık Y, Sarı B, Bulut H, Arslan MÖ. A slaughterhouse study on prevalence of some helminths of cattle and sheep in Malatya province, Turkey. *J anim Vet Adv.* 2009; 8:2200-5

Khan UJ. *Epidemiology, economic importance and therapy of paramphistomosis in cattle and buffaloes.* [Doctoral Thesis]. Lahor: University of Punjab; 2008.

Khedri J, Radfar MH, Borji H, Mirzaei M. Prevalence and intensity of *Paramphistomum* spp. in cattle from South-Eastern Iran. *Iran Journal of Parasitology.* 2015;10:268-72.

Kırcalı Sevimli F, Köse M, Kozan E, Doğan N. Afyon ili sığırlarında paramphistomosis ve distomatosisin genel durumu. *Türkiye Parazitol Derg.* 2005;29:43-6.

Kozan E. Bartın Yöresi Sığırlarında Dışkı Bakısı İle Tespit Edilen Helmintler. *Türkiye Parazitol Derg.* 2014;38:17-21.

Lloyd J, Joe B, Stephen L. Stomach fluke (paramphistomes) in ruminants. *Primefact.* 2007;452:1-4.

Lotfy WM, Brant SV, Ashmawy KI, Devkota R, Mkoji GM, Loker ES. A molecular approach for identification of paramphistomes from Africa and Asia. *Vet Parasitol.* 2010;174:234-40.

- Martinez-Ibeas AM, Munita MP, Lawlor K, Sekiya M, Mulcahy G, Sayers R. Rumen fluke in Irish sheep: prevalence, risk factors and molecular identification of two paramphistome species. *BMC Vet Res.* 2016;12:143.
- Nasher AK. Parasites of livestock in Asir Province, southwestern Saudi Arabia. *Vet Parasitol.* 1990;37:297-300.
- Özdal N, Gül A, İlhan F, Değer S. Prevalence of Paramphistomum infection in cattle and sheep in Van Province, Turkey. *Helminthologia.* 2010;47:20–4.
- Phiri AM, Phiri IK, Monrad J. Prevalence of amphistomiasis and association with *Fasciola gigantica* infections in Zambian cattle from communal grazing areas. *J Helminthol.* 2006;80(1):65-8.
- Rinaldi L, Perugini AG, Capuano F, Fenizia D, Musella V, Veneziano V, ve ark. Characterization of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA of *Calicophoron daubneyi* from various hosts and locations in southern Italy. *Vet Parasitol.* 2005;131:247– 53
- Rajo-Vazquez FA. Update on trematode infections in sheep. *Vet Parasitol.* 2012;189:15–38.
- Ronghang B, Philayung Zimik P, Roy B. Stereoscan And Molecular Characterization Of Rumen Flukes Of Mithun (*Bos Frontalis*, Lambert 1804) From Arunachal Pradesh, India. *NBU J Anim Sci.* 2018;12:1–10.
- Roy B, Tandon V. Morphological and microtopographical train variations among *Fasciolopsis buski* originating from different geographical areas. *Acta Parasitol Pol.* 1993;38:72-7.
- Sanabria R, More G, Romero J. Molecular characterization of the ITS-2 fragment of *Paramphistomum leydeni*(Trematoda: Paramphistomidae). *Veterinary Parasitology.* 2011;177:182–5.
- Sanabria REF, Romero JR. Review and update of paramphistomosis. *Helminthologia.* 2008;45:64–8.
- Sanna G, Varcasia A, Serra S, Salis F, Sanabria R, Pipia AP, ve ark. *Calicophoron daubneyi* in sheep and cattle of Sardinia, Italy. *Helminthologia.* 2016;53(1):87-93.
- Schinieder T. Helminthosen der Wiederkauer. Ed. Schnieder T. *Veterinärmedizinische Parasitologie.* Berlin: Paul Parey Verlag; 2006.
- Sharma S, Lyngdoh D, Roy B, Tandon V. Differential diagnosis and molecular characterization of *Hymenolepis nana* and *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidea: Hymenolepididae) based on nuclear rDNA ITS2 gene marker. *Parasitol Res.* 2016;115(11):4293-8.

Sharma S, Lyngdoh D, Roy B, Tandon V. Molecular phylogeny of Cyclophyllidea (Cestoda:Eucestoda): An in-silico analysis based on mtCOI gene. Parasitol Res. 2016a; 115(9):3329-35.

Sindicic M, Martinkovic F, Striskovic T, Spehar M, Stimac I, Bujanic M. Molecular identification of the rumen flukes *Paramphistomum leydeni* and *Paramphistomum cervi* in a concurrent infection of the red deer *Cervus elaphus*. J Helminthol. 2017;9:637–41.

Şenlik B. Sığırlarda sindirim sisteminde görülen helmint hastalıkları. Editör: M. Ali Özcel. Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları. 1. Baskı. İzmir. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri. 2013;219-24.

Şenlik B. Sindirim sisteminde görülen helmint hastalıkları. Editör: M. Ali ÖZCEL. Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları. 1.Baskı. İzmir. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri. 2013a; 889-95.

Tandon V, Roy B. SEM Pictorial Guide to Trematodes of Live Stock In India. Regency Publication, New Delhi. 2002.

Thompson RCA. Advances in the diagnosis and systematics of parasites of veterinary importance: new and exciting prospects. In: Gasser RB, Zarlenga DS (Eds), Molecular systematics and diagnosis. Vet Parasitol. 2004;125:69–92.

Tınar R, Coşkun ŞZ, Doğan H, Demir S, Akyol ÇV. Güney Marmara bölgesi ruminantlarında *Amphistomum* türlerinin bulunuşu ve yayılışı. Turk J Vet Anim Sci. 1992;16:187-97.

Tınar R, Umur Ş, Köroğlu E, Güçlü F, Şenlik B, Muz MN. Helmintoloji. Editör: Recep Tınar. Nobel Yay Dağ. Ankara, 2006.

Tınar R. Trematoda Veteriner Helmintoloji. Dora Basım Yayın; Bursa: 2011.

Toparlak M, Tüzer E. Veteriner Helmintoloji. İstanbul: İÜ Vet Fak Parazitoloji AD Ders Notları, 2000.

Umur Ş. Ankara yöresi tiftik keçilerinde sindirim sistemi helmintleri. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 1991;38:322-36.

Yıldırım A, Kozan E, Kara M, Öge H. Kayseri bölgesinde kapalı sistemde yetiştirilen sığırlarda helmint enfeksiyonlarının durumu. AÜ Vet Fak Derg. 2000;47(3):333-7.

ÖZGEÇMİŞ

29.01.1990 yılında Erciş'in Kızılören köyünde doğdum. İlköğretimi Milli Eğitim Vakfı İlköğretim Okulunda okudum. Liseyi Milli Piyango Anadolu Lisesinde okudum. Lisans eğitimimi Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Hemşirelik bölümünde tamamladım. 6 çocuklu ailenin 4. çocuğuyum. 2015 yılında Van Sağlık İl Müdürlüğüne bağlı Özalp Kırkçalı ASM'ye sağlık memuru kadrosuna atandım ve şuan halen aynı görevi yürütmekteyim.



EKLER

EK 1. Etik kurul onay formu

Evrak Tarih ve Sayısı: 05/12/2017-84946



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



Sayı : 27552122-604.01.02-E.84946
Konu : Yrd. Doç. Dr. Ayşe KARAKUŞ'a ait
Çalışma için Onay Gerektirmeyen
Belge

05/12/2017

Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayşe KARAKUŞ

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 30.11.2017 tarih ve 11 sayılı kararı gereğince; Yürüttüğü yapmış olduğunuz, "Van Belediye Mezbahasında Kesilen Koyunlarda *Paramphistomum cervi* Moleküler İdentifikasyonu" adlı çalışma ile ilgili, 15 Şubat 2014 tarih ve 28914 sayı ile yayınladığı yönetmeliğin 2. Maddesi 2. Fıkrasının b bendinde yer alan "Bu Yönetmelik; Deneysel olmayan klinik veteriner hekimliği uygulamalarını kapsamaz." hükmü gereğince YUHADYEK'ten Çalışma ve Araştırma Kesin Sonuç Onay Belgeleri alınmasına gerek olmadığına karar verilmiştir.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

e-İmzalıdır
Prof. Dr. Semiha DEDE
Etik Kurulu Başkanı

Ek: Yrd. Doç. Dr. Ayşe KARAKUŞ (1 sayfa)

Adres: Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Zeve
Kampusu 65080 Tuşba / Van
Telefon: +90 432 2251701-04 / +90 4445065 Faks: +90 432 4865413
e-Posta: yuhadyek@yyu.edu.tr Elektronik Ağ: http://www.yyu.edu.tr

Ayrıntılı bilgi için irtibat: Mehmet Şah OĞUZ
Unvanı: Bilgisayar İşletmeni
Dahili No: 22007

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.



T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
ONAY BELGESİ

YUZUNCU YIL UNIVERSITY (TURKEY)
ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE
APPROVAL CERTIFICATE

Araştırmanın Adı Van Belediye Mezbahasında Kesilen Koyunlarda Paramphistomum cervi Moleküler İdentifikasyonu
Title of the Research Paramphistomum cervi molecular Identification in Slaughtered Sheeps in the province of Van Municipality Salughterhouse
Araştırmacı(lar) Yürütücü / Chief investigator: Yrd. Doç. Dr. Ayşe KARAKUŞ
Investigator(s) Yardımcı Araştırmacı(lar) / Co-investigator(s): Yük. Lis. Öğr. YUSUF PADAK

Araştırmada kullanılacak hayvanlar / Animals to be used in the research: Koyun/Sheep
Tür / species: - Sayı / Numbers: 100
Yaş / Age: 2-4 Cinsiyet / Sex: Dişi ve erkek
Araştırmanın Öngörülen Başlama Tarihi / Proposed Research Starting Date: Ocak 2018
Araştırmanın Öngörülen Bitiş Tarihi / Proposed Research Completion Date: Ocak 2019
Dosya no / File no:

Karar:
Yukarıda bilgileri verilen planlanan araştırma projesi için Hayvan Deneyleri Etik Kurul Onayı gerekmektedir. Tarih:30/11/2017 ; Karar no: 2017/11
Decision:
The proposed research project detailed above does not need Animal Researches Ethic Committee Approval. Date: 30/11/2017 Decision number 2017/11

	BAŞKAN/CHAIR Prof. Dr. Semiha DEDE	
ÜYE Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL	ÜYE Prof. Dr. Siddik KESKİN	ÜYE Prof. Dr. Süpbi DENİZ
ÜYE Prof. Dr. Nalan ÖZDAL	ÜYE Doç. Dr. Atilla DÜRMÜŞ	ÜYE Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN
ÜYE Yrd. Doç. Dr. Ferda KARAKUŞ	ÜYE Yrd. Doç. Dr. Oruc ALLAHVERDİYEV	ÜYE Yrd. Doç. Dr. Canser Yılmaz DEMİR
ÜYE Vet. Hek. İsmail Hakkı BEHÇET	ÜYE Zır. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU	



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

Sayı : 49072339-050.01.04-E.42400
Konu : Enstitü Yönetim Kurulu Kararı
2019/15-18



07/06/2019

Sayın Dr. Öğr. Ü. Ayşe KARAKUŞ

Enstitü Yönetim Kurulumuzun 21.05.2019 tarih ve 2019/15-18 sayılı kararı ekte gönderilmiştir.
Bilgilerinize rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Semiha DEDE
Enstitü Müdürü

Ek: Karar_2019_15_18 (1 sayfa)

	T.C. VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ Sağlık Bilimleri Enstitüsü		
ENSTİTÜ YÖNETİM KURULU KARARI			
Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Alınan Karar Adedi	Karar Numarası
21.05.2019	2019/15		2019/15-18
Yönetim Kurulumuz Enstitü Müdürü Prof. Dr. Semiha DEDE Başkanlığında toplanarak aşağıdaki kararı almıştır.			
<p>Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanlığının 15.05.2019 tarih ve E.37342 sayılı yazısı görüşüldü.</p> <p>Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Yusuf PADAK'ın "Van Belediye Mezbahasında Kesilen Ruminatlarda Paramphistomum Cervi'nin Moleküler İdentifikasyonu" tez konusunun isminin "Van Belediye Mezbahasında Kesilen Ruminatlarda Paramphistomum Spp'nin Moleküler İdentifikasyonu" olarak değiştirilmesine oybirliği ile karar verildi.</p>			
BAŞKAN Prof. Dr. Semiha DEDE Enstitü Müdürü			
ÜYE Prof. Dr. Taylan AKSU	ÜYE Prof. Dr. Yavuz YARDIM	ÜYE Doç. Dr. Gökhan OTO	
ÜYE Doç. Dr. Yunus Emre BEYHAN	ÜYE Dr. Öğr. Üyesi Hacer ŞAHİN AYDINYURT	RAPORTÖR Enst. Sekr. V. Recep VAROL	

EK 2. Lisansüstü Tez Orjinallik Raporu

	<p style="text-align: center;">T.C. VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ Sağlık Bilimleri Enstitüsü</p>	
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU		

Tarih: 17/06./2019...

Tez Başlığı / Konusu: Van Belediye Mezbahasında Kesilen Ruminantlarda Paramphistomum spp.'nin Moleküler İdentifikasyonu

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam ...44... sayfalık kısmına ilişkin, ...17/06/2019. tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından TURNİTİN..intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orjinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 7 (Yedi) dir.

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 kelimededen daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orjinallik 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.

YUSUF PADAK
İmza

Öğrencinin Adı Soyadı	YUSUF PADDAK
Anabilim Dalı	: PARAZİTOLOJİ
Öğrenci No	159301030
Programı	: <input checked="" type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input type="checkbox"/> Doktora
DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR (Unvan, Ad Soyad, İmza) Dr. Öğr. Üyesi Ayşe KARAKUŞ	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR (Unvan, Ad Soyad, İmza)

