

## İNEKLERDE DÖL TUTMAMA PROBLEMİ İLE *FASCIOLA HEPATICA* ARASINDAKİ İLİŞKİ

Sami ŞİMŞEK<sup>1</sup>

Ergün KÖROĞLU<sup>1</sup>

Ali RİŞVANLI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Elazığ – TÜRKİYE

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Elazığ – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 10.07.2003

**Effect of *Fasciola hepatica* on Repeat Breeding Problem of Cows**

### Summary

Frequency of *Fasciola hepatica* infections in cows with repeat breeding was investigated. Results indicated that 66 of 120 (55%) cows with repeat breeding were seropositive for *F. hepatica* whereas 54 (45%) were found to be seronegative by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). In control group without repeat breeding, 45 of 80 (56.25%) cows were found to be seropositive whereas 35 (43.75 %) were seronegative. These results revealed that there was no statistically significant difference ( $p>0.05$ ) in terms of seropositivity of *F. hepatica* between with and without repeat breeding cows.

**Key Words:** *Fasciola hepatica*, repeat breeding, ELISA, cow, ES antigen

### Özet

Bu çalışmada döl tutmayan ineklerde *Fasciola hepatica* enfeksiyonunun sıklığı araştırılmıştır. Döl tutmayan toplam 120 hayvandan elde edilen serum örnekleri Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ile incelenmiştir. Bu örneklerin 66'sı (%55) seropozitif, 54'ü ise (%45) seronegatif bulunmuştur. Kontrol grubu olarak test edilen döl tutmama probleminin görülmediği toplam 80 ineğin 45'inde (%56.25) *F. hepatica*'ya karşı seropozitiflik belirlenmiş ve 35'inde (%43.75) ise bu parazite karşı antikorlara rastlanmamıştır. Bu bulgulara göre, döl tutan ve tutmayan gruptaki ineklerde *F. hepatica* seropozitifliği açısından istatistikî bir fark tespit edilememiştir ( $p>0.05$ ).

**Anahtar Kelimeler:** *Fasciola hepatica*, döl tutmama, ELISA, inek, ES antijeni

### Giriş

*Fasciola hepatica* hemen her ülkede görülen, koyun, keçi, sığır gibi gevişenlerde yaygın olarak bulunan, özellikle sığır ve koyunlarda ciddi ekonomik kayıplara neden olan bir parazittir (6,12). *F. hepatica*'nın yolaçtığı fasciolosis akut dönemde özellikle koyun ve keçilerde ani ölüm, abdominal ağrı ve asites, subakut dönemde hemorajik anemi ve ani kilo kaybı, kronik dönemde ise et, süt, yapağı kaybı, döl verimi düşüklüğü ve iş gücü kaybına yol açmaktadır (3). Genç sığırlar koyunlar gibi duyarlı olup ağır enfeksiyonlar ölümle sonuçlanırken, erginlerde verim kayipları ortaya çıkmaktadır (3).

Sığır yetişiriciliğinde döl tutmama önde gelen problemlerden birisi olarak değerlendirilmektedir (1). Bu problemin ortaya çıkmasından sorumlu en önemli nedenler; erken embriyonik ölümler, fertilizasyonun şekillenmemesi ve hormonal dengesizliklerdir (1).

Dişi hayvanlarda hormonal dengesizliklere sebep olan etkenlerden birisi de fasciolosistir. Karaciğerde

patolojik bozukluklara yol açan karaciğer kelebekleri ve benzeri etkenler steroid hormon metabolizmasını bozmakta ve neticede üreme fonksiyonlarının bozulmasına sebep olmaktadır (9). Progesteronun yetersiz salınımının döl tutmama ile yakın ilişkisi olduğu tespit edilmiştir. Gebe ve gebe olmayan fertil ineklerdeki plazma progesteron seviyesinde 16. güne kadar farklılık görülmediği, buna rağmen döl tutmayan ineklerde plazma progesteron konsantrasyonunda düzensizlikler olduğu belirlenmiştir (1). Deneysel olarak *F. hepatica* metasikerleri ile enfekte edilen ineklerde serum progesteron seviyesinin enfekte olmayan kontrol grubuna göre daha düşük olduğu, bu düzensizliğin fasciolosis ile bağlantılı olabileceği ileri sürülmüştür (9).

Fasciolosisin teşhisinde kullanılan geleneksel metod, enfeksiyonun prepatent döneminden sonra dışkıda yumurta görülmesi ve sayısına dayalı direkt tanı metodudur. Bu metod, hafif enfeksiyonları tespit

edememekte ve parazitli hayvanlar negatif olarak bilinen hayvanlar için yeni enfeksiyon kaynağı olmaktadır (14).

İndirekt immunoenzimatik tanı teknikleri *F. hepatica* enfeksiyonunun erken tanısında oldukça önemlidir (14). Ekskresyon/sekresyon (ES) antijeni kullanılarak yapılan indirekt-ELISA ile sığırlardaki deneyel enfeksiyondan sonraki üç ile beşinci haftada enfeksiyonu tespit etmek mümkün olmaktadır (11). Yapılan değişik çalışmalarında ELISA'nın fasciolosisin serolojik tanısında oldukça uygun bir test olduğu belirlenmiştir (16).

Bu çalışma, döl tutmayan ineklerde *F. hepatica* seropozitifliğinin ELISA ile belirlenmesi ve seropozitiflik ile döl tutmama arasındaki ilişkinin ortaya konması amacıyla yapılmıştır.

#### **Materyal ve Metot**

**Serum Örnekleri:** Bu çalışmada *F. hepatica* antikorları yönünden test edilen serum örnekleri Elazığ yöresindeki yaşları 2-10 arasında değişen 200 inekten toplanmıştır. Bu ineklerin 120 tanesi daha önce en az bir defa doğum yapmış, seksüel siklusları düzenli olan ve fertil bir boğa veya suni tohumlama ile en az üç kez tohumlanmasına rağmen gebe kalmayan hayvanlardan oluşmuştur. Geri kalan 80 inek ise gebelik problemi olmayan ineklerden kontrol amaçlı olarak seçilmiştir. Kan alınan bütün ineklerin ultrasonografik, rektal ve vaginal muayeneleri yapılmış ve anamnez bilgileri alınmıştır.

**Antijen Hazırlanması:** Ekskresyon/sekresyon (ES) antijeni hazırlamak amacıyla mezbahanede kesimi yapılan *F. hepatica*'lı bir sığırın karaciğeri laboratuvara getirilmiştir. Canlı *F. hepatica*'lar karaciğerden toplanıp üç kez 15'er dakika 37 °C'deki distile su ve üç kez de 15'er dakika 37 °C'deki 0.01 M PBS ile yıkılmıştır. Karaciğerden çıkarılan toplam 60 adet parazit 50 ml PBS içinde 37 °C'de altı saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda altta kalan kısım atılıp süpermatant 10000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemini takiben altta kalan pelet atılmış, üstteki sıvı 0.2 µm çaplı filtreden geçirilmiş, içeresine protein koruyucusu olarak 5 mM EDTA ve 5 mM Sodyum Azid katılarak porsiyonlara ayrılmıştır. Antijenin protein konsantrasyonu Lowry ve ark. (10)'na göre belirlenmiştir.

**Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA):** ELISA'da antijen olarak sığır karaciğerindeki *F. hepatica*'lardan hazırlanan Ekskresyon/sekresyon (ES) antijeni kullanılmıştır. Deney Santiago ve ark. (15)'na göre yapılmıştır. Antijen, karbonat tamponu (pH 9.6) ile 1.2 mg/ml olacak şekilde sulandırılmıştır. Bu solusyondan 96 kuyucuklu

ELISA plaklarının (Deltalab) her kuyucuga 100 µl konulmuş ve antijenin bağlanması için +4 °C'de bir gece bekletilmiştir. Bunu takiben % 0.1 Tween 20 içeren PBS ile bir kez yıkama işlemi yapılmıştır. Bu çalışmada, hem kuyucuklarda boş kalan bölgelerin kapatılması hem de sığırlarda *F. hepatica* proteinlerine karşı olusabilecek bağlanmaların engellenmesi amacıyla bloklama solusyonu olarak 1X PBS ile sulandırılmış % 5'lik yağsız süt tozu kullanılmıştır. Bloklama aşamasını takiben, iki kez yıkama işlemi yapılmış ve %0.02 Tween 20 içeren PBS ile 1/200 oranında sulandırılan her bir test serum örneğinden iki ayrı kuyucuga 100'er µl bırakılmıştır. İnkübasyon (37°C'de 1.5 saat) ve yıkamalardan (%0.1 Tween 20 içeren PBS ile 5 kez) sonra, kuyucuklara %0.02 Tween 20 içeren PBS ile 1/10000 oranında sulandırılan peroksidaz enzimiyle işaretli rabbit anti-bovine IgG'leri (Sigma Co. St. Louis, MO, USA, Cat no: A7414) ilave edilmiştir. İnkübasyon ve yıkamaları takiben 100 µl substrat-kromojen solusyonu (%0.03 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 0.5 mg/ml O-phenylen diamine içeren 0.1 M sitrat-fosfat tamponu) eklenmiştir. Oda ısısında karanlık ortamda 15 dakika beklendiğinden sonra kuyucuklara 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklenerek renk reaksiyonu durdurulmuştur. Kuyucuklardaki absorbans değerleri ELISA okuyucusunda (Medispec ESR 200, Awareness Technology Inc., Palm City, FL) 450 nm dalga boyunda okutulmuştur. Bu çalışmada negatif kontrol serumu olarak üç kuyucuktaki iki-üç aylık buzağılardan alınan serum, pozitif kontrol serumu olarak ise mezbahanede kesimi takip edilen fasciolosisli bir sığırın serumu kullanılmıştır. Negatif kontrol serumlarının absorbans değerlerinin aritmetik ortalamasının +3 standart sapma (X+3SD) değerinin (cut-off) üstü pozitif olarak kabul edilmiştir.

Döl tutmama ile *F. hepatica* seropozitifliği arasında ilişki bulunup bulunmadığı SPSS istatistik programında  $\chi^2$  (ki kare) testi ile belirlenmiştir.

#### **Bulgular**

Bu çalışmada incelenen hayvanların ELISA bulguları tablo 1'de verilmiştir. Buna göre, ELISA ile test edilen toplam 200 serum örneğinin 111 tanesinde (%55.5) *F. hepatica* antikorları saptanmıştır. Döl tutmayan ineklere ait 120 serum örneğinin 66'sında (%55) *F. hepatica* antikorları saptanırken, bu problemin görülmemiği 80 ineğe ait serum örneklerinin ise 45'i (%56.25) bu antikorlar yönünden pozitif bulunmuştur. Döl tutmama problemi olan inekler ile bu tür problemi olmayan kontrol grubu ineklerde belirlenen seropozitiflik oranları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık saptanmamıştır ( $p>0.05$ ).

Tablo 1. Çalışmada incelenen hayvanların ELISA bulguları

D ö l T u t m a y a n ( n = 1 2 0 )				K o n t r o l ( n = 8 0 )			
F.hepatica (+)		F.hepatica (-)		F.hepatica (+)		F.hepatica (-)	
n	%	n	%	n	%	n	%
66	55.00	54	45.00	45	56.25	35	43.75

## Tartışma

*Fasciola hepatica*, birçok ülkede sığır, koyun ve keçi gibi gevşenlerde yaygın olarak bulunmakta olup daha az sıklıkla da insanlarda parazitlenmektedir. Özellikle sığır ve koyunlarda önemli ekonomik kayıplara yol açtığı bilinmekte olup (6,12), sığır ve mandaların distomatosise yakalanma oranının %50, verim kayıplarının ise %5 oranında olduğunu bildirilmiştir (4). Bu çalışmada test edilen toplam 200 sığır serum örnekindeki seropozitiflik %55.5 olarak tespit edilmiş, sığırlarda belirlenen bu yüksek oran dikkat çekici bulunmuştur.

*Fasciola hepatica*'nın evcil ruminantlarda önemli verim düşüklüğüne yolaçtığı, genellikle subklinik enfeksiyon sonucu iştahın kaybolduğu, gıdaların sindiriminin azaldığı, normal metabolik ve hormonal proseslerin bozulduğu bildirilmiş, buna bağlı olarak da verim kayıpları ile birlikte enfekte hayvanların meraları parazit yumurtaları ile kontamine ettiği iddia edilmiştir (2,5,7).

*Fasciola hepatica*'nın genç sürülerde büyümeyi yavaşlatlığı, düvelerde pubertayı geciktirdiği ve yetişkin hayvanlarda da östrusu uzatarak fertilitenin üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğu belirtilmiştir (8). Fasciolosis ile enfekte anöstruslu ve döl tutmayan ineklerin enfekte olmayan hayvanlara göre önemli derecede düşük kan hemoglobin seviyesine sahip oldukları görülmüş, enfekte hayvanlardaki total serum protein seviyesi de normalden düşük bulunmuştur (8). Bu sonuçlara göre merada olayan hayvanlarda görülen anöstrus ve döl tutmama gibi infertilite problemlerinin en önemli nedenlerinden birinin de *F.hepatica* olabileceği ileri sürülmüştür (8).

## Kaynaklar

- Alaçam E. İneklerde infertilite sorunu. Alaçam E, ed. Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite. Medisan, Ankara 1999; 267-290.
- Armour J. The epidemiology and control of bovine fascioliasis. Vet Rec 1975; 96: 198-201.
- Behm CA, Sangster NC. Pathology, Pathophysiology and Clinical Aspects. Dalton JP, eds. Fasciolosis. Cabi Publishing, Wallingford, Oxon UK, 1999, p.185-224.
- Coşkuner MR. Paraziter hastalıklardan kaybımız. Türk Vet Hek Dern Derg 1971; 41(7): 51-56.
- Dargie JD. The impact on production and mechanism of patogenesis of trematode infections in cattle and sheep. Int J Parasitol 1987; 17: 453-463.
- Doğanay A, Bıyıkoglu G. Zoonoz özelliği gösteren trematodlar. Etlik Vet Mikrob Derg 1994; 7 (5): 163-180.

Bu çalışmada hem döl tutmama problemi olan, hem de kontrol grubundaki ineklerden elde edilen bütün serum örneklerinde yüksek oranda seropozitiflik belirlenmiş, döl tutmama sorununun başka sebeplere bağlı olabileceği kanaatine varılmıştır.

Oakley ve ark. (13), fasciolosise bağlı olarak düvelerde gebe kalma oranının önemli derecede düşüğünü bildirmiştir. Araştırmacılar (13), karaciger kelebekleri ile deneysel enfekte düvelerde iki kez yapılan suni tohumlama ile gebe kalma oranının %44 olduğunu, bu oranın enfekte olmayanlarda %80'e ulaştığını bildirmiştir, buzağılama oranının da sırasıyla %40 ve %87 olduğunu saptamışlardır.

Öte yandan sığırlarda fasiolisit ilaçlarla yılda en az bir kez yapılan tedavinin buzağılama oranının %5 oranında artırdığı bildirilmiştir (17).

Bu çalışmada, döl tutmayan hayvanlar ile kontrol grubu arasında *F.hepatica* seropozitifliği açısından önemli bir fark saptanmamış; her ne kadar kontrol grubunda da yüksek seropozitiflik elde edilse de döl tutmayan hayvanlardaki yüksek seropozitifliğin önemsenmesi gerektiği ve hem verim kayıplarının önüne geçilmesi hem de meraların kontaminasyonunun önlenmesi açısından sığırların yılda en az bir kez fasiolisit bir ilaçla sağlıltmasının faydalı olacağı, ayrıca konunun daha net olarak ortaya konulabilmesi için özellikle deneysel araştırmalar başta olmak üzere değişik çalışmaların yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

7. Hope Cawdery MJ, Strickland KL, Conway A, Crowe PJ. Production effects of liver fluke in cattle. I. The effects of infection on live weight gain, feed intake and food conversion efficiency in beef cattle. *Brit Vet J* 1977; 133: 145-159.
8. Kumar S, Sharma MC. Infertility in rural cows in relation to fascioliasis. *Ind J Anim Sci* 1991; 61(8): 838-840.
9. Lopez-Diaz MC, Carro MC, Cadarnigo C, Diez-Banos P, Mezo M. Puberty and serum concentrations of ovarian steroids during prepuberal period in fressian heifers artificially infected with *Fasciola hepatica*. *Theriogenology*, 1998; 50(4): 587-593.
10. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with pholin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
11. Marin MS. Epizootiología de la fasciolosis bovina en Asturias. Identificación y expresión de un antígeno unitario. Tesis doctoral. Facultad de Biología, Universidad de Oviedo, 1992.
12. Masake RA, Wescott RB, Spencer GR, Long BZ. The pathogenesis of primary and secondary infection with *Fasciola hepatica* in mice. *Vet Pathol* 1978; 15: 763-769.
13. Oakley GA, Owen B, Knapp NHH. Production effects of subclinical liver fluke infection in growing dairy heifers. *Vet Rec* 1979; 104: 503-507.
14. Sanchez-Andrade R, Paz-Silva A, Suarez J, Panadero R, Diez-Banos P, Morrondo P. Use of a sandwich enzyme linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Vet Parasitol* 2000; 93: 39-46.
15. Santiago N, Hillyer GV, Garcia-Rosa M, Morales MH. Identification of functional *Fasciola hepatica* antigens in experimental infections in rabbits. *Int J Parasitol* 1986; 14: 197-206.
16. Shaheem HI, Kamal KA, Farid Z, Mansour N, Boctor FN, Woody J. Dot enzyme linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) for the rapid diagnosis of human fascioliasis. *J Parasitol* 1989; 75(4): 549-552.
17. Ziger K, Simunic B, Sabolic M. Experience of the Varazdin veterinary station in the control of fascioliasis in cattle. *Praxis Vet* 1985; 33(1-2): 107-110.