

ISSN 1016-3573



**VETERİNER KONTROL MERKEZ  
ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ**  
Etlik - ANKARA



# **ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ**

**JOURNAL OF ETLİK VETERINARY MICROBIOLOGY**  
ANKARA – TURKEY

**Cilt/Volume 29 ♦ Sayı/Number 2 ♦ 2018**



---

**Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi**  
**Cilt/Volume 29 ♦ Sayı/Number 2 ♦ 2018**  
**Journal of Etlik Veterinary Microbiology**  
Yılda iki kez yayımlanır / Published two times per year  
ISSN 1016-3573

---

**Sahibi**

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Adına  
Dr. Cevdet Yaralı  
Enstitü Müdür V.

**Yayın Kurulu / Publication Board**

**Sorumlu Yazı İşleri Müdürü / Managing Editor**

Dr. A. Burak Güngör

**Editör / Editor in Chief**

Dr. Tahsin Onur Kevenk

**Bilimsel Kurul / Editorial Board**

Dr. Erhan Akçay

Dr. Asiye Dakman

Dr. Ali Erkurt

Dr. Filiz Şen

**Adres / Address**

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü

Ahmet Şefik Kolaylı Cad. No 21/21-A

06020 Etlik - Ankara / TÜRKİYE

Tel. : +90 312 326 00 90 (8 hat)

Faks : +90 312 321 17 55

Web : <http://vetkontrol.tarim.gov.tr/merkez>

E-posta : [etlikvetmikrobiyolderg@gmail.com](mailto:etlikvetmikrobiyolderg@gmail.com)

**Hakem Listesi / Referee List\***

Doç.Dr. Seyda CENGİZ	Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Dr. Nüvit COŞKUN	Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji AD.
Doç.Dr. Özgür ÇADIRCI	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fak. Besin Hijyeni ve Teknoloji AD.
Prof.Dr. T. Haluk ÇELİK	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknoloji AD.
Doç.Dr. Alper ÇİFTÇİ	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Doç.Dr. Yavuz Kürşad DAŞ	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fak. Farmakoloji Toksikoloji AD.
Doç.Dr. Gökçen DİNÇ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD.
Doç.Dr. Önder DÜZLÜ	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD.
Prof.Dr. Muammer GÖNCÜOĞLU	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknoloji AD.
Prof. Dr. Göknur Terzi GÜLEL	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fak. Besin Hijyeni ve Teknoloji AD.
Prof.Dr. Timur GÜLHAN	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Doç.Dr. Elçin GÜNAYDIN	Hitit Üniversitesi Alaca Avni Çelik Meslek Yüksekokulu
Dr. İlke Karayel HACIOĞLU	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji AD.
Dr. Gökhan İNAT	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fak. Besin Hijyeni ve Teknoloji AD.
Dr. Özgür KANAT	Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji AD
Doç.Dr. Hamit Kaan MÜŞTAK	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji A D
Doç.Dr. Ertan Emek ONUK	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fak. Su Ürünleri ve Hastalıkları AD.
Doç.Dr. Gökhan OTO	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji AD.
Dr. Belgi Diren SİĞİRCİ	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Dr. Emrah ŞİMŞEK	Erciyes Üniversitesi Su Ürünleri ve Hastalıkları AD.
Dr. Zeynep Akkutay YOLDAR	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji AD.

*\* İsimler soyada göre alfabetik dizilmiştir ve bu sayıda görev alanlar yazılmıştır.*

ULAKBİM Yaşam Bilimleri ve Türkiye Atıf Dizini veritabanları kapsamında bulunan “çift hakemli” bir dergidir.

Copyright © Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2018, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

Basım Tarihi / Publishing Date: Aralık / December 2018, Baskı adedi / Circulation: 500

Tasarım ve Baskı / Printing



Medisan Yayinevi Ltd.Şti.

Çankırı Cad. 45 / 347 Ulus - Ankara, Türkiye

Tel : +90 312 311 24 26 – 311 00 57 medisanyayinevi@gmail.com

## İçindekiler / Contents

### Araştırma Makalesi / Research Article

#### **Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde Hayvanlardan İzole Edilen Stafilocok Türlerinin Metisilin Dirençliliği Üzerine Retrospektif Bir Çalışma**

A Retrospective Study about Methicillin Resistance of *Staphylococcus* Species Isolated from Animals at Turkish Republic of Northern Cyprus

Hüban Göçmen, Halit Şükür, Hazel Tamakan, Ömer Memduh Esenal.....87

#### ***Lactococcus garvieae* İzolatlarının Antimikrobiyal Direnç Profillerinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Belirlenmesi**

Phenotypic and Genotypic Determination of Antimicrobial Resistance Profile for *Lactococcus garvieae* Isolates

İlker Hancı, Ertan Emek Onuk.....94

#### **The First Detection and Phylogenetic Analysis of *Bovine Astrovirus* from Diarrheic Calves in Turkey**

Türkiye'de İshalli Buzağılardan *Bovine Astrovirus*'un İlk Teşhisi ve Filogenetik Analizi

Turhan Turan, Hakan Işıdan.....104

#### **Acute Phase Proteins in *Staphylococcus aureus* Positive Milks**

*Staphylococcus aureus* Pozitif Sütlerde Akut Faz Proteinleri

Sena Çenesiz, Hande Gürler, Arzu Fındık, Gülay Çiftci, Ali Ertekin, Metin Çenesiz ..... 111

#### **Türkiye'de Kronik İshalli Kedilerde *Tritrichomonas foetus*'ün Araştırılması ve Risk Faktörlerinin Belirlenmesi**

Investigation of *Tritrichomonas foetus* in Cats with Chronic Diarrhea and Determination of Risk Factors in Turkey

Didem Pekmezci, Gökmen Zafer Pekmezci, Ümit Özcan, Duygu Dalgın, Mehmet Tütüncü ..... 116

#### **Sularda, İnsan Enfeksiyonları ile İlişkili Norovirus Genogrularının Real-Time PCR Yöntemi ile Saptanması**

Determination of Norovirus Genogroups Associated with Human Infections in Water by Real-Time PCR Method

Mehmet Demirci, Akın Yiğın, Nadire Eser, Hikmet Dinç.....121

#### **Taze Peynirlerden İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarının Genotiplendirilmesi**

Genotyping of *Escherichia coli* Strains Isolated From Fresh Cheese

Sadık Savaşan, Ergün Ömer Göksoy .....127

<b>Türkiye’de Sık Rastlanan <i>Salmonella</i> Enteritidis Serovarlarına Spesifik Bakteriyofajların İzolasyonu</b> Isolation of Bacteriophages Specific to <i>Salmonella</i> Enteritidis Serovars Common in Turkey	
Zafer Ata .....	136
<b>Gökkuşığı Alabalığı Kökenli <i>Listonella anguillarum</i> İzolatlarının Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyonu</b> Phenotypic and Genotypic Characterization of <i>Listonella anguillarum</i> Isolates from Rainbow Trout	
Ertan Emek Onuk, Soner Altun, Muhammed Duman, İzzet Burçin Satıcıoğlu, H. Kaan Müştak .....	143
<b>Subklinik Mastitis’in Anadolu Mandalarının Süt Kompozisyonundaki Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkisi</b> The Effect of Subclinical Mastitis on Some Biochemical Parameters in Milk Composition of Anatolian Water Buffalos	
Hande Gürler, Gülay Çiftci, Seçkin Salar, Ayhan Baştan .....	151
<b>Derleme / Review Article</b>	
<b>Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> ve Önemi</b> Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> and Importance	
Barişhan Doğan, Mücahit Palaz, Müjgan İzgür .....	157
<b>Rekombinant DNA Teknolojisinin Veteriner Aşılarında Kullanımı</b> The Use of Recombinant DNA Technologies in Veterinary Vaccines	
Merve Gizem Sezener, Alper Çiftci, Arzu Fındık .....	162
<b>Yenidoğan Buzağı İshallerinin Önemli Viral Etkenlerinden Caliciviruslar</b> Caliciviruses as Important Viral Agents of Newborn Calf Diarrhea	
İlke Karayel Hacıoğlu, Feray Alkan .....	167
<b>Ekotoksikoloji Alanında Balık Hücre Hatlarının Kullanımı</b> Use of Fish Cell Lines in Ecotoxicological Researches	
Aylin Pehlivan, Enes Atmaca, Abdurrahman Aksoy .....	175
<b>Biyosensörler ve SELEX (Systematic Evolution of Ligands By Exponential Enrichment)</b> Biosensors and SELEX (Systematic Evolution of Ligands By Exponential Enrichment)	
Seyyide Sarıçam, Hamit Kaan Müştak .....	181

## Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayım Koşulları

1. Dergi, T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün hakemli, bilimsel yayın organı olup, yılda iki defa yayımlanır. Derginin kısaltılmış adı "Etlik Vet Mikrobiyol Derg" dir.

2. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'nde veteriner hekimlik alanında yapılan, başka bir yerde yayımlanmamış olan orijinal bilimsel araştırmalar, güncel derleme, gözlem, kısa bilimsel çalışmalar ve enstitüden haberler yayımlanır. Derleme şeklindeki yazılar; orijinal olması, en son yenilikleri içermesi, klasik bilgilerin tekrarı olmaması durumunda kabul edilir. Derlemeyi hazırlayan yazarın, o konuda ulusal ya da uluslararası düzeyde orijinal yayın ve araştırmalar yapmış olması koşulu aranır.

3. Türkçe ve İngilizce olarak hazırlanacak metinler 12 punto Times New Roman yazı karakterinde, düz metin olarak, çift aralıklı ve kenarlarda 30 mm boşluk bırakılarak, A4 formundaki beyaz kağıda yazılmalıdır. Yazıların tamamı, şekil ve tablolar dahil olmak üzere orijinal bilimsel araştırmalarda 16, derlemelerde 10, gözlemlerde 6 ve kısa bilimsel çalışmalarda 4 sayfayı geçmemelidir.

4. Microsoft Word formatındaki metin ile en az 300 dpi çözünürlükteki JPEG formatındaki resim/lerin tamamı [etikvetmikrobiyolderg@gmail.com](mailto:etikvetmikrobiyolderg@gmail.com) e-posta adresine gönderilmelidir.

5. Türkçe orijinal çalışmalar konu başlığı, yazar/yazarların adları, adresleri, Türkçe özet ve anahtar sözcükler, İngilizce başlık, İngilizce özet ve anahtar sözcükler, giriş, materyal ve metot, bulgular, tartışma ve sonuç, teşekkür ve kaynaklar sırası ile hazırlanmalıdır. İngilizce orijinal çalışmalar konu başlığı, yazar/yazarların adları, adresleri, İngilizce özet ve anahtar sözcükler, Türkçe başlık, Türkçe özet ve anahtar sözcükler, giriş, materyal ve metot, bulgular, tartışma ve sonuç, teşekkür ve kaynaklar şeklinde hazırlanmalıdır. Kısa bilimsel çalışmaların ve derlemelerin başlık ve özet bölümleri orijinal çalışma formatında, bundan sonraki bölümleri ise, derlemelerde; giriş, metin ve kaynaklar şeklinde, kısa bilimsel çalışmalarda ise bölümlendirme yapılmadan hazırlanmalıdır.

6. Orijinal çalışmalar ve gözlemler aşağıdaki sıraya göre düzenlenerek yazılmalıdır.

**Başlık**, kısa, konu hakkında bilgi verici olmalı ve küçük harflerle yazılmalıdır.

**Yazar(lar)ın**, ad(lar)ı küçük, soyad(lar)ı büyük harflerle yazılmalı ve unvan belirtilmemelidir. **ORCID** numaraları yazılmalıdır.

**Özet**, Türkçe ve İngilizce olarak, tek paragraf halinde ve en fazla 500 sözcük olmalıdır.

**Anahtar kelimeler**, Türkiye Bilim Terimleri'nden seçilmeli, alfabetik sıraya göre yazılmalı ve 5 sözcüğü geçmemelidir.

**Giriş**, konu ile ilgili kısa literatür bilgisi içermeli, son paragrafında çalışmanın amacı vurgulanmalı ve iki sayfayı geçmemelidir.

**Materyal ve Metot**, ayrıntıya girmeden, anlaşılır biçimde yazılmalıdır. Başlıklar kalın, alt başlıklar italik yazı tipiyle belirtilmelidir.

**Bulgular** bölümünde veriler, tekrarlama yapmadan açık bir şekilde belirtilmelidir. Tablo başlıkları tablonun üstünde, şekil başlıkları ise şeklin altında belirtilmelidir.

**Tartışma ve Sonuç** bölümünde, araştırmanın sonucunda elde edilen bulgular, diğer araştırmacıların bulguları ile karşılaştırılmalı ve literatüre olan katkısı kısaca belirtilmelidir.

**Teşekkür** bölümü, gerekli görülüyorsa kaynaklardan hemen önce belirtilmelidir.

**Kaynaklar** bölümünde, kaynaklar listesi alfabetik ve kronolojik olarak sıralanmalı ve numaralanmalıdır. Metin içerisindeki kaynak, yazar soyadı yazılıp sıra numarası ile; cümle sonunda ise sadece sıra numarası ile **köşeli parantez** içerisinde yazılmalıdır. Cümle sonunda birden çok kaynak belirtilecek ise kaynak numaraları kü-

çükten büyüğe doğru sıralanmalıdır. Metin içerisinde ikiden çok yazarlı kaynak kullanımlarında ilk yazarın soyadı yazılmalı diğer yazarlar ise "ve ark." (İngilizce metinlerde "et al.") kısaltması ile belirtilmelidir. Dergi adlarının kısaltılmasında "Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation" son baskısı esas alınmalıdır. Kaynaklar listesinde yazar(lar)ın aynı yıla ait birden fazla yayını varsa, yayın tarihinin yanına "a" ve "b" şeklinde belirtilmelidir.

Kaynak yazımı ve sıralaması aşağıdaki gibi yapılmalıdır;

### Sürelili Yayın:

Dubey JP, Lindsay DS, Anderson ML, Davis SW, Shen SK, (1992). *Induced transplacental transmission of N. caninum in cattle*. J Am Vet Med Ass. 201, 709-713.

### Yazarlı Kitap:

Fleiss JL, (1981). *Statistical methods for rates and proportions*. Second edition. New York: John Wiley and Sons, p.103.

### Editörlü Kitap:

Balows A, Hausler WJ, Herrmann KI, eds., (1990). *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth edition. Washington DC: IRL Press, p.37.

### Editörlü Kitapta Bölüm:

Bahk J, Marth EH, (1990). *Listeriosis and Listeria monocytogenes*. Cliver DD. eds. Foodborne Disease. Academic press Inc, San Diego. p.248-256.

### Kongre Bildirileri:

Çetindağ M, (1994). *Pronoprymna ventricosa, a new digenic trematode from the Alosa fallax in Turkey*. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII), October, 10-14, İzmir-Turkey.

### Tezler:

Aksoy E, (1997). *Sığır Vebası hastalığının histolojik ve immüno-peroksidaz yöntemle tanısı üzerine çalışmalar*. Doktora Tezi, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

### Anonim:

Anonim, (2009). *Contagious equine metritis*. Erişim adresi: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdf>, Erişim tarihi: 17.10.2009.

Peter AT (2009). *Abortions in dairy cows*. Erişim adresi: <http://www.wcds.afns.ualberta.ca.htm>, Erişim tarihi: 14.11.2009.

**Yazışma adresi**, çok yazarlı çalışmalarda yazışma adresi olarak yazarlardan sadece birinin adı/soyadı, adresi ve e-posta adresi çalışmanın sonunda belirtilmelidir.

7. Latince cins ve tür isimleri italik yazı tipi ile yazılmalıdır. Tüm ölçüler SI (Système Internationale)'ye göre verilmelidir.

8. Dergide yayımlanmak üzere gönderilen makaleler tüm yazarlar tarafından imzalanan "Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi" ve başvuruya ilişkin bir dilekçe ile birlikte gönderilmelidir. Yayımlanması uygun görülen çalışmalar, istendiğinde Yayım Komitesi'nin basıma ilişkin kararı, yazar(lar)ına bildirilir.

9. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'nde yayımlanacak olan, hayvan deneylerine dayalı bilimsel çalışmalarda "Etik Kurul Onayı Alınmıştır" ifadesi aranır.

10. Gönderilen yazıların basım düzeltmeleri orijinal metne göre yapıldığından, yazıların her türlü sorumluluğu yazarlara aittir.

11. Ürünlerin ticari adları ile karşılaştırılmaları yönelik araştırmalar derginin ilgi kapsamı dışındadır.

12. Araştırmaya konu olan maddelerin ve ürünlerin ticari adları kullanılmamalıdır.

13. Şayet varsa araştırmanın desteklendiği kurum adı ve proje numarası belirtilmelidir.

14. Dergiye gönderilen yazılar geliş tarihine göre yayımlanır.

15. Yayımlanmayan yazılar, yazarına iade edilmez.

## Journal of Etlik Veterinary Microbiology Publication Conditions

1. The Journal is a refereed, scientific publication of Republic of Turkey Ministry of Food, Agriculture and Livestock, Directorate of Etlik Veterinary Control Central Research Institute and is published two issues in a year. The abbreviation of the journal is "J Etlik Vet Microbiol".

2. In the Journal of Etlik Veterinary Microbiology, original research articles, actual reviews, case reports, short communications on the issue of veterinary medicine whose one part or whole have not been published in any other place before, and news from the institute are published. The review articles will be accepted only if they are original, actual and not repeating the classical knowledge. The author of the review is asked to possess original publications or researches on the subject at national or international levels.

3. Manuscripts that will be prepared in Turkish and English should be typed as a full text, on A4 paper with 12 pt, in Times New Roman typing character, double-spaced and with 30 mm space in both sides of the paper. Manuscripts including figures and tables should not exceed 16 pages for original research articles, 10 pages for reviews, 6 pages for case reports and 4 pages for short communications.

4. Manuscript written in Microsoft Word format and figures in JPEG format at minimum 300 dpi resolution should be submitted to [etlikvetmikrobiyolderg@gmail.com](mailto:etlikvetmikrobiyolderg@gmail.com)

5. Original research articles and case reports should include in following rank: title, name(s) of the author(s), their addresses, abstract and key words in English, title, abstract and key words in Turkish, introduction, material and method, findings, discussion and conclusion, acknowledgements and references. In short communications and reviews, divisions except summaries should be omitted.

6. Original research articles and case reports should be arranged and composed as in the following.

**Title** should be brief, explanatory and written in small caps. Explanation(s) about the study should be written as footnotes.

**Author(s)** should be mentioned by their names and surnames; their surnames should be written in capital letters and author(s) title should not be mentioned. **ORCID** numbers should be written.

**Summary** should be in Turkish and English, single paragraph and composed of at most about 500 words.

**Key words** must be selected from Medical Subject Headings, should be written in alphabetical order and should not exceed 5 words.

**Introduction** not exceeding two pages should include a short review of the literature related with the subject and in the end paragraph; the aim of the study should be mentioned.

**Material and Method** should be written in an essential and comprehensible manner without getting into details. Subtopics should be mentioned first in bold and after in italic type.

**Findings** should be shortly explained and data should not be repeated within the text. Legends should be indicated at the top of each table, whereas should be indicated at the bottom of each figure and print. Vertical lines are not allowed in tables.

**Discussion and Conclusion** must include the evaluation and comparison of results with other researchers' findings. The study's contributions to the existing literature should also be explained briefly.

**Acknowledgements** must be indicated before references if necessary.

**References** should be listed alphabetically and chronologically by numbers. In the body of text, reference must be shown by author's surname and list number or only by list number within **square parenthesis**. If there is more than one reference that refers to the same issue, these should be arranged by smallest to biggest reference list

numbers at the end of sentence. If the reference is more than two authors, the surname of the first author should be written and other authors should be mentioned with the abbreviation of "et al.". For the abbreviation of journals, the latest edition of the "Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation" should be taken as basis. If the author(s) have more than one publication within the same year, besides the publication date, it should be mentioned as "a" and "b" in the list of references.

The writing of the references and their alignment should be as in the following examples.

### For articles:

Dubey JP, Lindsay DS, Anderson ML, Davis SW, Shen SK, (1992). *Induced transplacental transmission of N. caninum in cattle*. J Am Vet Med Ass. 201, 709-713.

### For books:

Fleiss JL, (1981). *Statistical methods for rates and proportions*. Second edition. New York: John Willey and Sons, p.103.

### For edited books:

Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, eds., (1990). *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth edition. Washington DC: IRL Press, p.37.

### For chapter in edited books:

Bahk J, Marth EH, (1990). *Listeriosis and Listeria monocytogenes*. Cliver DD. eds. Foodborne Disease. Academic press Inc, San Diego. p.248-256.

### For congress papers:

Çetindağ M, (1994). *Pronoprymna ventricosa, a new digenic trematode from the Alosa fallax in Turkey*. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII), October, 10-14, Izmir-Turkey.

### For dissertations:

Aksoy E, (1997). *Sığır Vebası hastalığının histolojik ve İmmunoperoksidaz yöntemiyle tanısı üzerine çalışmalar*. PhD Thesis, Ankara University Institute of Health Sciences, Ankara.

**Corresponding address**, in multiple-author studies, as a correspondence address, only one of the authors' name/surname, address and e-mail should be mentioned at the end.

7. Genus and species names in Latin should be written in italic. All measures should be given according to the SI (Système Internationale) units.

8. The articles that are sent to be published in the journal should be sent with a covering letter and "Publication Rights Transfer Agreement" signed by all of the authors. The selected articles for the publication, and if asked for, the decision of the editorial committee concerning the publication, are declared to the article's author/authors.

9. The wording of "Ethical Commission Permission is obtained" should appear in scientific studies based on animal experiments, which will be published in the Journal of Etlik Veterinary Microbiology.

10. As the edition of the sent articles are done in accordance with the original text, all responsibility of the articles bear on the authors.

11. Researches that aim at comparisons of the products with their commercial names are out of the journal's theme scope.

12. The trademarks of materials and products that are subject of the research should not be mentioned.

13. If the research is supported by a foundation, name of the foundation and project number must be mentioned.

14. The articles that are sent to the journal are published in line with their coming date.

15. Unpublished papers are not returned to their author.







# Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde Hayvanlardan İzole Edilen Stafilocok Türlerinin Metisilin Dirençliliği Üzerine Retrospektif Bir Çalışma

Hüban Göçmen<sup>1</sup>, Halit Şükür<sup>1</sup>, Hazel Tamakan<sup>1</sup>, Ömer Memduh Esendal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Yakın Doğu Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Lefkoşa, KKTC

Geliş Tarihi / Received: 02.10.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 30.10.2018

**Özet:** İnsanlarda ve hayvanlarda normal floranın bir parçası olarak kabul edilen stafilocokların bazı türleri, hayvanların ve insanların vücut bölgelerinde (örneğin; deri, kulak, eklem) çok çeşitli piyogenik infeksiyonlara neden olabilmektedir. Özellikle metisilin dirençliliği ile halk sağlığı açısından tehdit oluşturan stafilocok türlerinin başında *Staphylococcus aureus* gelmektedir. Bunu takiben *S. pseudintermedius* ve son zamanlarda da koagülaz negatif stafilocoklar sayılabilmektedir.

Bu çalışmamızın amacı; Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde Yakın Doğu Üniversitesi Hayvan Hastanesine çeşitli şikayetlerle getirilen hayvanlardan izole edilen stafilocok türleri arasında metisilin dirençliliğini araştırmak ve zoonotik potansiyeli yüksek olan bu türlerin varlığını ortaya koymaktır. Hayvan hastanesine çeşitli şikayetlerle getirilen hayvanlardan 67 adet örnek toplanmış ve 80 adet stafilocok türü izole edilmiştir. Hayvanlara ait bu örneklerden koagülaz pozitif stafilocok türlerinden 22 adet *S. aureus* (%27,5) ve koagülaz negatif stafilocok türlerinden ise 13 adet *S. chromogenes* (%16,25) izole edilmiştir. Bu stafilocok türlerinin 22 adedi metisiline dirençli bulunmuştur. Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsüne (CLSI) göre yorumlanan mikrodilüsyon antibiyogram sonuçlarında çoklu antibiyotik dirençliliklerine de rastlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Evcil hayvanlar, Metisilin dirençliliği, Stafilocok türleri.

## A Retrospective Study about Methicillin Resistance of *Staphylococcus* Species Isolated from Animals at Turkish Republic of Northern Cyprus

**Abstract:** Some species of staphylococci, considered to be part of the normal flora in humans and animals, can cause a wide variety of pyogenic infections in the body parts of animals and humans. In particular, main agent with regard to threatening public health is methicillin resistant *S.aureus* between *Staphylococcus* species then *S.pseudintermedius* and more recently, coagulase negative staphylococci can be counted.

The purpose of our study was investigate to methicillin resistance of *Staphylococcus* species isolated from the animals brought to animal hospital of Near East University in the Turkish Republic of Northern Cyprus and is demonstrate to presence of these species with high zoonotic potential. At animal hospital, 67 samples were collected from the animals which had various symptoms and 80 *Staphylococcus* species were isolated. The most isolated agents were 22 *S.aureus* (27,5%) among coagulase-positive staphylococci and 13 *S.chromogenes* (16,25%) among coagulase-negative staphylococci from the samples belonging to animals. It was obtained to methicillin-resistance at 22 of *Staphylococcus* species. Multiple drug resistance was also encountered in results of microdilution antibiotic susceptibility testing evaluated according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).

**Key words:** Domestic animals, Methicillin resistance, Staphylococci.

## Giriş

Stafilocoklar; fakültatif anaerob, Gram pozitif, katalaz pozitif, *Micrococcaceae* ailesinde bulunan bakterilerdir. Stafilocoklar; çeşitli memelilerde ve kuşlarda derinin ve müköz membraların ayrıca sindirim ve solunum yolunun normal bakteriyel florasının bir bölümünü oluşturmaktadır. Bunun yanında, stafilocokların bazı türleri hayvanların ve insanların vücut bölgelerinde (örneğin; deri, kulaklar

ve eklemlerde) çok çeşitli piyogenik infeksiyonlara neden olabilmektedir [24,25].

Veteriner hekimliğinde; başlıca koagülaz pozitif stafilocok türlerinden *S.aureus* ve *S.pseudintermedius* ayrıca koagülaz negatif stafilocok türlerinden *S.chromogenes* ve *S.epidermidis* önemli hastalıklara neden olmaktadır. Koagülaz pozitif, oportunistik bir patojen olan *Staphylococcus aureus*; ineklerde, keçilerde, koyunlarda ve atlarda mastitise; koyunlarda ve keçilerde dermatitise; domuzlarda ve

atlarda botriyomikozise ve kedi ve köpeklerde suppuratif infeksiyonlara neden olabilmektedir. *S. hyicus* ise domuzlarda eksudatif epidermitis ve artrit hastalığının etkenidir [25].

Koagülaz pozitif *Staphylococcus intermedius* grubunda (SIG); *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* ve *S. delphini* türleri bulunmaktadır. Özellikle *S. pseudintermedius*, köpeklerde piyodermanın başlıca etkenidir ve bu grubun üyeleri endometritis, sistitis ve otitis eksterna gibi suppuratif infeksiyonları meydana getirebilmektedir. Kedilerde de çeşitli piyojenik vakalara neden olmaktadır.

Koagülaz negatif stafilokoklar ise insanlarda ve hayvanlarda oportünistik infeksiyonlara yol açarken hayvanlarda en çok *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans* ve *S. lugdunensis* izole edilmektedir. İnsan sağlığında ise en çok *S. hominis*, *S. capitis* ve *S. cohnii* izole edilmektedir [18,30].

Son zamanlarda metisilin dirençli stafilokokların artışı halk sağlığı açısından bir tehdit oluşturmaktadır. Bununla birlikte insanlarda ve hayvanlarda çoklu antibiyotik direncine sahip stafilokokların izole edilmesine dair birçok çalışma mevcuttur [4,7,22]. Özellikle metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), metisilin dirençli *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) ve metisilin dirençli koagülaz negatif *Staphylococcus* (MRCNS) türleri önemli infeksiyonlara yol açarken hayvanlar ve insanlar arasındaki taşıyıcılığı da önemli bir risk haline almıştır [1,25,26].

Metisilin direnci, modifiye penisilin bağlayıcı protein (PBP2a) üretimini kodlayan *mecA* geni ile ilişkili bir durumdur. Genelde  $\beta$ -laktam antibiyotikleri bakteri hücre duvarı yapımını önlemek için, stafilokokların PBP'lerine bağlanır. Metisilin dirençli stafilokokların (MRS) modifiye olmuş PBP'i (PBP2a),  $\beta$ -laktamlar için düşük bir affiniteye sahiptir ve bu nedenle hücre duvarı yapımı bu antibiyotikler tarafından engellenememektedir. Bu gen, 'stafilokokal kromozomal kaset' (SCC*mec*) olarak adlandırılan bir hareketli element üzerinde bakterinin kromozomunda bulunur [34].

Stafilokoklarda metisilin direncinin saptanması için fenotipik yöntemler kullanılmaktadır. Genellikle metisilin yerine hassas ve daha dayanıklı oldukları için oksasilin veya sefoksitin antibiyotikleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Metisilin dirençli sta-

filokokların konvansiyonel antibiyotik duyarlılık testlerinin yanı sıra genotipik yöntemlerle özellikle PCR ile *mecA* geninin teşhisi, metisilin dirençli stafilokokların saptanması için altın standart olarak kabul edilmektedir [3,7,35].

Bu çalışmamızın amacı; Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde Yakın Doğu Üniversitesi Hayvan Hastanesine çeşitli şikayetlerle getirilen hayvanlardan izole edilen stafilokok türleri arasında metisilin dirençliliğini araştırmak ve zoonotik potansiyeli yüksek olan bu türlerin varlığını ortaya koymaktır.

## Materyal ve Metot

### Hayvan Materyali

Bu çalışmada; Yakın Doğu Üniversitesi Hayvan Hastanesine ve Yakın Doğu Üniversitesi Veteriner Fakültesi Uygulama Çiftliği'nden çeşitli şikayetler ile getirilen 34 adet köpek, 11 adet kedi, 10 adet at, 7 adet inek, 1 adet koyun, 2 adet keçi, 1 adet oğlak ve 1 adet kanaryadan oluşan toplamda 67 adet hayvana ait numuneler incelendi. Bu hayvan türlerine ait 29 adet deri svabı, 4 adet göz svabı, 8 adet süt örneği, 2 adet vaginal svap, 5 adet yara svabı, 9 adet kulak svabı, 2 adet deri kazıntısı, 1 adet irin içeriği, 2 adet idrar örneği, 1 adet piyoderma içeriği, 1 adet fistül svabı, 1 adet nazal svap ve 2 adet nekropsi materyali olmak üzere toplamda 67 adet numunenin bakteriyolojik izolasyon ve identifikasyonu yapıldı.

Numune alma kurallarına uygun olarak aseptik koşullarda MRSA (Copan-493CE03), likit Amies (Copan-4E014S.A) ve Stuart (Copan-141C) içeren svaplarla numuneler toplandı. Deri svapları; deri infeksiyonu bulunan bölgelere, steril ve bu amaca uygun seçilen svaplar sürülerek ve kulak svapları ise; otitis eksternalı hayvanların dış kulak yoluna sürülerek toplandı. Süt örnekleri steril tüplere alınıp, ardından santrifüj edildi. İdrar örnekleri ise aynı şekilde aseptik bir ortamda sistosentez metodu ile toplandı. Toplanan numuneler Yakın Doğu Üniversitesi Veteriner Hekimliği Fakültesi Merkez Araştırma ve Mikrobiyoloji Laboratuvarına soğuk zincir altında ulaştırıldı ve bakteriyolojik analizlerine aynı gün başlandı.

### Bakteriyolojik İzolasyon ve İdentifikasyon

Laboratuvara ulaştırılan örneklerin, %7 koyun kanlı agara (Biomerieux, 43041), MacConkey aga-

ra (Merck, 105465) ve koagülaz pozitif stafilokok türlerine spesifik olan Egg Yolk Tellurite (Merck, 103785.050) Supplement katılmış Baird Parker agara (Merck, 105406), MRSA agara (Himedia, M1974) ekimleri gerçekleştirildi. Pozitif kontrol olarak; Edinburg Üniversitesi Roslin Enstitüsü’nden *Staphylococcus pseudintermedius* ED99 ve Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’ndan tedarik edilen *S. aureus* ATCC 700699 suşları kullanılmıştır.

Ekimleri gerçekleştirilen besiyerleri, bakterilerin optimal üreme süreleri dikkate alınarak aerobik ortamda 37°C’de inkübatörde inkübasyona bırakıldı ve izolasyonu gerçekleşen bakteri kolonileri değerlendirildi.

İzolasyonu gerçekleşen saf bakteri kolonilerine Gram boyama (Biomerieux,55542) yöntemi uygulandı ve Gram özellikleri belirlendi. Gram pozitif kok şekilli mikroskopik morfoloji gösteren bakterilere katalaz (Biomerieux,55561) ve koagülaz (Merck,113306) testleri uygulandı. VITEK 2 Compact (Biomerieux, France) otomatize sistem cihazı ve API Staph (Biomerieux, France) ile identifikasyonları gerçekleştirildi.

### Antibiyotik Duyarlılık Testi

İdentifiye edilen stafilokok türlerinin metisilin dirençliliğini ortaya koymak amacıyla mikrodilüsyon yöntemi ile MİK (minimal inhibitör konsantrasyon) değerleri tespit edildi ve Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsüne (CLSI, M02-A12 ve M07-A10, 2017) göre yorumlandı. İzolatlarda VITEK 2 Compact otomatize sistem cihazı ile AST-GP kartları kullanılarak mikrodilüsyon yöntemi ile toplamda 17 adet antibiyotiğe bakıldı ve duyarlılık/dirençlilik profilleri belirlendi. Metisilin dirençliliğinde rol oynayan Sefoksitin Tarama ve Oksasilin, AST kartlarında ayrıca belirtilmekte ve cihaz uyarı vermektedir.

### Bulgular

Hayvan türleri, bu hayvanlara ait numune türleri, izole edilen stafilokok türleri ve bu türlerin metisilin dirençliliği ile ilgili bilgiler ve bulgular Tablo-1’de belirtilmiştir.

**Tablo-1:** Hayvan örneklerinden izole edilen stafilokok türleri ve metisilin dirençli stafilokok izolatları

Numune Türü	Hayvan Türleri ve İzole Edilen Stafilokok Türleri	Metisilin Dirençli Stafilokoklar	
Deri svabı (n=29)	Köpek (n=20)	<i>S. pseudintermedius</i> (n=9), MRSP (n=1) <i>S. epidermidis</i> (n=1), MRCNS (n=1) <i>S. aureus</i> (n=1) <i>S. intermedius</i> (n=2), MRSI (n=2) <i>S. chromogenes</i> (n=3), MRCNS (n=3)	MRCNS (n=12) MRSA (n=2) MRSI (n=2) MRSP (n=1)
	Kedi (n=1)	<i>S. chromogenes</i> (n=1)	
	At (n=8)	<i>S. aureus</i> (n=3), MRSA (n=2) <i>S. capitis</i> (n=2), MRCNS (n=2) <i>S. haemolyticus</i> (n=1), MRCNS (n=1) <i>S. chromogenes</i> (n=4), MRCNS (n=4) <i>S. xylosus</i> (n=1), MRCNS (n=1) <i>S. hyicus</i> (n=1)	
Göz svabı (n=4)	Kedi (n=2)	Koagülaz Pozitif <i>Staphylococcus</i> spp. (n=1) <i>S. chromogenes</i> (n=1)	
	Köpek (n=1)	<i>S. aureus</i> (n=1)	
	İnek (n=1)	Koagülaz Pozitif <i>Staphylococcus</i> spp. (n=1)	

Numune Türü	Hayvan Türleri ve İzole Edilen Stafilocok Türleri		Metisilin Dirençli Stafilocoklar
Süt (n=8)	İnek (n=6)	<i>S. epidermidis</i> (n=2), MRCNS (n=1) <i>Staphylococcus</i> spp. (n=1) <i>S. aureus</i> (n=1) <i>S. chromogenes</i> (n=2), MRCNS (n=1) <i>S. simulans</i> (n=1) <i>S. capitis</i> (n=1), MRCNS (n=1)	MRCNS (n=3) MRSA (n=1)
	Koyun (n=1)	<i>S. aureus</i> (n=1), MRSA(n=1)	
	Keçi (n=1)	<i>S. aureus</i> (n=1)	
Vaginal svap (n=2)	Köpek (n=1)	<i>S. pseudintermedius</i> (n=1)	
	Keçi (n=1)	<i>S. aureus</i> (n=1)	
Yara svabı (n=5)	Köpek (n=3)	<i>S. aureus</i> (n=2) <i>S. pseudintermedius</i> (n=1)	
	Kedi (n=2)	<i>S. aureus</i> (n=2) <i>S. caprae</i> (n=1)	
Kulak svabı (n=9)	Köpek (n=5)	<i>S. pseudintermedius</i> (n=1) <i>S. aureus</i> (n=3) <i>S. haemolyticus</i> (n=1) <i>S. simulans</i> (n=1) <i>S. capitis</i> (n=1)	
	Kedi (n=4)	<i>S. chromogenes</i> (n=2) <i>S. simulans</i> (n=1) Koagülaz Pozitif <i>Staphylococcus</i> spp. (n=2) Koagülaz Negatif <i>Staphylococcus</i> spp. (n=1) <i>S. aureus</i> (n=1)	
Deri kazıntısı (n=2)	At (n=2)	<i>Staphylococcus</i> spp. (n=1) <i>S. capitis</i> (n=1) <i>S. hominis</i> (n=1)	
İrin içeriği (n=1)	Köpek (n=1)	<i>S. aureus</i> (n=1)	
İdrar sıvısı (n=2)	Kedi (n=1)	<i>S. aureus</i> (n=1)	
	Köpek (n=1)	<i>S. aureus</i> (n=1)	
Piyoderma içerik (n=1)	Köpek (n=1)	<i>S. aureus</i> (n=1)	
Fistül svabı (n=1)	Köpek (n=1)	<i>S. aureus</i> (n=1)	
Nazal svap (n=1)	Kedi (n=1)	<i>S. simulans</i> (n=1), MRCNS (n=1)	MRCNS (n=1)
Nekropsi materyali (n=2)	Kanarya (n=1)	<i>S. auricularis</i> (n=1)	
	Oğlak (n=1)	<i>S. xylosus</i> (n=1)	
Toplam Numune türü = 67	Toplam hayvan türü=67	Toplam izolat sayısı= 80	MRCNS (n=16) MRSA (n=3) MRSI (n=2) MRSP (n=1) Toplam Metisilin Dirençli Stafilocok izolat sayısı =22

## Tartışma ve Sonuç

Hayvanlarda metisilin dirençli *S. aureus* 1975 yılından itibaren bildirilmektedir [5]. Devriese ve ark. [5], 20 adet inekden toplanan süt örneklerinde 68 adet MRSA suşunun izole edildiği ve bu suşların tek bir insan kaynağından bulaştığını ileri sürmüşlerdir. İnsanlardan izole edilen *S. aureus* suşlarının çiftlik hayvanlarına taşınması, 1963 yılında Moeller ve ark.[19] tarafından da bildirilmiştir. Aynı zamanda 47 adet koyundan toplanan süt örneklerinde yapılan bir çalışmada da %29.8'inde *mecA* pozitif *S. aureus* izole edilmiştir [21]. Koyun ve keçi sütlerinde MRSA izolasyonu ve taşıyıcılığı ile ilgili çalışmalar inek sütüne göre daha az sayıda rapor edilmiştir [2, 8, 31], çalışmamızda ise çiftliklerden getirilen süt örneklerinde, koyun sütünden izole edilen 1 adet MRSA izolatu bulunmaktadı.

Diğer bir taraftan özellikle atlardan izole edilen ilk MRSA, Hartmann ve ark.[14] tarafından post-operatif bir yaradan elde ettikleri bildirilmiştir. Bununla birlikte diğer bir çalışmada deri infeksiyonları bulunan atların 512 adet örneğinden 75 adet *S. aureus* izole edilmiş ve bunların ikisinde *mecA* geni taşıyıcılığı bulunarak MRSA olarak konfirme edilmiştir [3]. Atlardaki sporadik infeksiyonlara neden olan MRSA'ların insanlardan direkt olarak taşındığını ileri süren çalışmalar mevcuttur [28,29]. Laboratuvarımıza ulaştırılan 8 adet at deri svabından 3 adet *S. aureus* izole edilmiştir ve bunların 2 adedi MRSA olarak konfirme edilmiştir. Atlar veteriner fakültesi hayvan hastanesine getirilmeden, at çiftliğinde toplanan örnekler laboratuvara gönderilmiştir. Bu örneklerden izole edilen *S. aureus* suşlarının insanlar ve diğer hayvanlar için potansiyel bir kaynak olup olmadığıyla ilgili genotipik çalışmaların planlanması doğru bir yaklaşım olacaktır.

Aynı zamanda sağlıklı atlardan izole edilen koagülaz negatif *Staphylococcus* (CNS) türlerinde de *mecA* geni tespit edilmiş ve Japonya'da uygulanan bu çalışmada %29,5 oranında *mecA* pozitif izolatlar elde edilmiştir [35]. Bizim çalışmamızda yukarıda bahsettiğimiz MRSA izolasyonu yapılan atların birinde, 2 adet MRCNS izolatu da bulunmuştur. Bu türler *S. xylosus* ve *S. capitis* olarak izole edilmiştir. Ayrıca atlardan izole ettiğimiz diğer MRCNS türleri *S. chromogenes* ve *S. haemolyticus*'dur. Bu sonucumuz ise Duijkeren ve ark.'nın [7] hayvan-

larda metisilin dirençli *Staphylococcus* türlerinin araştırılması sırasında atlarda 4 adet *mecA*-pozitif *S. haemolyticus* suşunun elde etmesi ve bu suşların çoklu antibiyotik direnci bulunması ile uyumlu bulunmuştur. Çalışmamızdaki atlardan izole edilen *S. haemolyticus* suşunun oksasilin, sefoksitin, penisilin, ampisilin/sulbaktam ve sefaleksine karşı dirençli bulunurken; gentamisin ve klindamisin'e karşı duyarlı bulunmuştur.

Son yıllarda pek çok ülkede mastitise neden olan bakteriyel etkenler arasında koagülaz negatif stafilokokların (CNS) yer alması ve bakteriyel etkenlerin antibiyotiklere karşı gösterdikleri çoklu direnç sebebiyle sütçü işletmelerinde ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir [11,23,32]. Hosseinzadeh ve Saei [15], İran'ın Doğu ve Batı Azerbaycan bölgelerinde bulunan yedi sütçü inek sürüsüne ait 158 süt örneğini bakteriyolojik ve moleküler (PCR-RFLP) yöntemlerle inceledikleri bir çalışmada 113 (% 71.5) örnekten birçok stafilokok türü izole etmişlerdir. 113 adet izolattan 5'ini (% 4.4) *S. aureus*, 108'ini (% 95.6) ise CNS olarak tanımlanmışlardır. Araştırmacılar elde ettikleri 108 CNS türünün 44'ünü (% 40.7) *S. haemolyticus*, 17'sini (% 15.7) *S. chromogenes*, 11'er adedini (% 10.2) *S. epidermidis*, *S. arneri* ve *S. cohnii*, 6'sını (% 5.5) *S. simulans*, 4'ünü (% 3.7) *S. hominis*, 3'ünü (% 2.7) *S. capitis* ve 1'ini (% 0.9) de *S. xylosus* olarak tanımlamışlardır. Klinik mastitis olgularından ise sadece *S. haemolyticus*, *S. chromogenes* ve *S. warneri* izole edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise mastitis şikayetiyle laboratuvarımıza gelen toplamda 6 adet inek sütü örneğinden, 6'sı CNS olarak saptanırken, uygulanan antibiyogram testi sonucunda 3'ünde MRCNS tespit edilmiştir. Toplam izolat sayısına göre sütteki CNS oranı %7,5 iken; toplam metisilin dirençli stafilokok izolat sayısına göre MRCNS oranı %13,6 olarak bulunmuştur. Mastitis olgularında inek sütlerinden izole edilen MRCNS oranı %13,6 iken, koyun keçi sütlerinde ise MRCNS izolasyonu gerçekleşmemiş ancak MRSA oranı %4,5 olarak bulunmuştur.

2005 yılında yeni bir stafilokok türü olan *Staphylococcus pseudintermedius* tanımlanmıştır [6]. Daha önce fenotipik özelliklerine göre *S. intermedius* olarak tanımlanan izolatlar daha sonra moleküler teknikler kullanılarak yeniden sınıflandırılmıştır [27]. *S. pseudintermedius* sağlıklı köpeklerin

%90'ından izole edilebilir ve deri infeksiyonlarının (piyoderma, dermatitis vb.) altta yatan nedenlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır [9,13,26]. Kawakami ve ark. [17], köpek piyodermasına neden olan en önemli patojenin *S. pseudintermedius*'un olduğunu ileri sürmüşlerdir [17]. Çin ve Japonya'da piyodermalı köpekler üzerine yapılan iki çalışmada MRSP prevalansı sırasıyla %48 ve %66 olarak bulunmuştur [10,17]. Retrospektif çalışmamızda ise köpeklerin deri, yara, kulak ve vaginal svaplarından 12 adet *S. pseudintermedius* ve 2 adet *S. intermedius* izole edilmiş ve bunların 1 adedi MRSP ve 2 adedi MRSI olarak izole edilmiştir. MRSP infeksiyonlarının köpeklerde kedilere göre daha yaygın olduğunu içeren bildirimler mevcuttur [16,20]. Çalışmamızda bulunan kedilerden toplanan örneklerde de *S. aureus* ve ayrıca koagülaz pozitif stafilokoklar (CPS) izole edilmiştir ancak tiplendirilemeyen CPS'ler laboratuvarımızda sarfların azaldığı dönemlere denk gelmiş ve daha sonra tiplendirilmek üzere saklanmıştır. Kedilere ait *S. aureus* izolatlarımıza uygulanan mikrodilüsyon antibiyogram sonucunda metisilin dirençliliğine rastlanmamıştır.

Hollanda'da yapılan bir çalışmada, hayvanlarla teması olmayan insanlardan gelen burun svaplarının sadece %4'ü MRSP pozitif iken, MRSP ile infekte köpekle teması olanların %36'sı ve kediyile teması olanların %31'i MRSP pozitif bulunmuştur [12]. Bu da, zoonotik öneme sahip bu mikroorganizmanın konakçısı olan kedi ve köpeklerin bulaşmadaki rolünü ortaya koymuştur ve uyguladığımız çalışmada metisilin dirençliliğinde ki artış araştırma konusu olarak ilgimizi çekmiştir.

Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde Yakın Doğu Üniversitesi Hayvan Hastanesine çeşitli şikayetlerle getirilen hayvanlardan 67 adet örnek toplanmış ve 80 adet stafilokok türü izole edilmiştir. Bu stafilokok türlerinin 22 adedi metisiline dirençli bulunmuştur. CLSI standartlarına göre yorumlanan antibiyogram sonuçlarında çoklu antibiyotik dirençliliklerine de rastlanmış ve bu yönde uygulanacak çalışmalara ihtiyaç duyulmuştur.

Sonuç olarak; hem insanların hem de hayvanların fırsatçı patojeni olan stafilokok türlerinde, artan antibiyotik dirençliliklerinin ve bu türlerin taşınmasında rezervuar görevi gören hayvanların belirlenmesi her iki popülasyon içinde çok önemlidir. Antibiyotiklere direnç kazanmış bakterilerin neden

olduğu infeksiyonlarda; duyarlı antibiyotik seçimi ve buna yönelik olarak doğru tedavi protokollerinin uygulanması aynı zamanda hastaların tedaviye cevap vermeleri, hastanede kalma süreleri ve tedavi giderlerinin azaltılmasına yönelik çalışmaların artması ülkemiz açısından önem arz etmektedir. Zoonotik karakterdeki MRSA gibi bakteriler için ciddi sağlık tedbirlerinin alınması ve taşıyıcılığı ile ilgili mücadele programlarının başlatılması gerekliliği tekrar ortaya çıkmıştır.

## Kaynaklar

1. Beck KM, Waisglass SE, Dick H LN, Weese JS, (2012). *Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius (MRSP) from skin and carriage sites of dogs after treatment of their methicillin-resistant or methicillin-sensitive staphylococcal pyoderma*. Vet Dermatol. 23, 369–375.
2. Bochev I, Russenova N, (2005). *Resistance of Staphylococcus spp. strains isolated from goats with subclinical mastitis*. Bulg J Vet Med. 8, 2, 109-118.
3. Chiers K, Decostere A, Devriese LA, Haesebrouck F, (2003). *Bacteriological and mycological findings, and in vitro antibiotic sensitivity of pathogenic staphylococci in equine skin infections*. Vet Rec. 138–40.
4. Davis JA, Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB, Brousse JH, Gustafson J, Kucher M, (2014). *Carriage of methicillin-resistant staphylococci by healthy companion animals in the US*. Letters in Applied Microbiology. 59, 1-8.
5. Devriese LA, Hommeze J, (1975). *Epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in dairy herds*. Res Vet Sci. 1, 23–7.
6. Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M. et al, (2005). *Staphylococcus pseudintermedius sp. nov., a coagulase-positive species from animals*. Int J Syst Evol Microbiol. 55, 1569–73.
7. Duijkeren VE, Box A T A, Heck M E O C, Wannet W J B, Fluit A C, (2004). *Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals*. Vet Microbiol. 103, 91-97.
8. El-Deeb W, Fayed M, Elmoslemay A, Kandeel M, Zidan K, (2018). *Methicillin resistant Staphylococcus aureus among goat farms in Eastern province, Saudi Arabia: Prevalence and risk factors*. Prev Med Vet. 156, 84-90.
9. Fazakerley J, Nuttall T, Sales D et al, (2009). *Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs*. Vet Dermatol. 20, 179–184.
10. Feng Y, Tian W, Lin D, Luo Q, Zhou Y, Yang T, Deng Y, Liu Y H, Liu J H, (2012). *Prevalence and characterization of methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius in pets from South China*. Vet Microbiol. 160, 517-24.
11. Gentilini E, Denamiel G, Betancor A, Reuelto M, Rodriguez M, De Torrest RA, (2002). *Antimicrobial susceptibility of coagulase negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina*. J Dairy Sci. 85, 1913-1917.



12. Guardabassi L, Loeber M, Jacobson A, (2004). *Transmission of multiple antimicrobial-resistant Staphylococcus intermedius between dogs affected by deep pyoderma and their owners*. Vet Microbiol. 98, 23–27.
13. Hanselman B A, Kruth S A, Rousseau J et al., (2009). *Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets*. Can Vet J. 50, 954–958.
14. Hartmann FA, Trostle SS, Klohnen AA, (1997). *Isolation of methicillin resistant Staphylococcus aureus from a post-operative wound infection in a horse*. J Am Vet Med Assoc. 211, 1558–61.
15. Hosseinzadeh S, Saei HD, (2014). *Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the north west of Iran: Emerging of coagulase-negative staphylococci*. Int J Vet Sci Med. 2, 27-34
16. Kadlec K, Schwarz S, Perreten V et al., (2010). *Molecular analysis of methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius of feline origin from different European countries and North America*. J Antimicrob Chemother. 65, 1826–8.
17. Kawakami T, Shibata S, Murayama N, Nagata M, Nishifuji K, Iwasaki T, Fukata T, (2010). *Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in Staphylococcus pseudintermedius and Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans isolated from dogs with pyoderma in Japan*. Journal of Veterinary Medical Science. 72, 1615–1619.
18. Lina G, Etienne J, Vandenesch F, (2000). *Biology and pathogenicity of staphylococci other than Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis*. pp: 450-462. In Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI (EDS), Gram Positive Pathogens. ASM Press, Washington DC.
19. Moeller RW, Smith IM, Shemaker AC, Tjalma RA, (1963). *Transfer of hospital staphylococci from man to farm animals*. J Am Vet Med Assoc. 142, 613–7.
20. Morris DO, Rook KA, Shofer FS et al., (2006). *Screening of Staphylococcus aureus, Staphylococcus intermedius, and Staphylococcus schleiferi isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003–04)*. Vet Dermatol. 17, 332–7.
21. Obaidat M, Bani Salman Alaa E, Roess Amira A, (2017). *High prevalence and antimicrobial resistance of mecA Staphylococcus aureus in dairy cattle, sheep, and goat bulk tank milk in Jordan*. Trop Anim Health Prod. 50, 2, 405-412.
22. Pantosti A, (2012). *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus associated with animals and its relevance to human health*. Frontiers in Microbiology. 3, 127.
23. Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T, (2004). *Bovine mastitis in Finland 2001-prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance*. J Dairy Sci. 87, 2433- 2441.
24. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR, (1994). *Staphylococcus species*. In Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing. 118-126.
25. Rich M, (2005). *Staphylococci in animals: prevalence, identification and antimicrobial susceptibility, with an emphasis on methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. British Journal of Biomedical Science. 62,2, 98-105.
26. Sareyyüpoğlu B, Müştak HK, Cantekin Z, Diker KS, (2014). *Methicillin Resistance in Staphylococcus pseudintermedius Isolated from Shelter Dogs in Turkey*. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 20, 3, 435-438.
27. Sasaki T, Kikuchi K, Tanaka Y et al., (2007). *Reclassification of phenotypically identified Staphylococcus intermedius strains*. J Clin Microbiol. 45, 2770–8.
28. Seguin JC, Walker RD, Caron JP, Kloos WE, George CG, Hollis RJ, Jones RN, Pfaller MA, (1999). *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission*. J Clin Microbiol. 37, 1459–1463.
29. Shimizu A, Kawano J, Yamamoto C, Kakutani O, Anzai T, Kamada M, (1997). *Genetic analysis of equine methicillin-resistant Staphylococcus aureus by pulsed-field gel electrophoresis*. J Vet Med Sci. 59, 935–937.
30. Shuttleworth RR, Behme RJ, McNabb A, Colby WD, (1997). *Human isolates of Staphylococcus caprae: Association with bone and joint infections*. J Clin Microbiol. 35, 2537-2541.
31. Spohr M, Rau J, Friedrich A, Klittich G, Fetsch A, Guerra B, Hammerl JA, Tenhagen BA (2011). *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in three dairy herds in southwest Germany*. Zoonoses Public Health. 58, 4, 252-61.
32. Tenhagen BA, Koster G, Wallmann J, Heuwieser W, (2006). *Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany*. J Dairy Sc. 89, 2542-2551.
33. Viridis S, Scarano C, Cossu F, Spanu V, Spanu C, De Santis E P L, (2010). *Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus and coagulase negative staphylococci isolated from goats with subclinical mastitis*. SAGE-Hindawi Access to Research, Veterinary Medicine International.
34. Weese JS, Duijkeren E, (2010). *Methicillin resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudintermedius in veterinary medicine*. Vet Microbiol. 140, 3-4, 418–429.
35. Yasuda R, Kawano J, Onda H, Takagi M, Shimizu A, Anzai T, (2000). *Methicillin resistant coagulase negative staphylococci isolated from healthy horses in Japan*. Am J Vet Res. 61, 1451–1455.

## ***Lactococcus garvieae* İzolatlarının Antimikrobiyal Direnç Profillerinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Belirlenmesi**

İlker Hancı<sup>1</sup>, Ertan Emek Onuk<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Sinop İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Sinop

<sup>2</sup> Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları AD, Samsun

Geliş Tarihi / Received: 11.04.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 08.06.2018

**Özet:** Antimikrobiyel ajanların su ürünleri yetiştiriciliğindeki yoğun ve bilinçsiz kullanımı sucul ortamda antibiyotik dirençli bakterilerin ve antibiyotik direnç genlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Bu gibi durumlarda su ve sediment antibiyotik direnç genleri için rezervuar durumuna dönüşebilir ve bu genler horizontal gen transferi ile insan ve balık patojenleri arasında yayılabilirler. Bu çalışmada Türkiye'nin değişik bölgelerinden izole edilmiş 25 *L. garvieae* izolatının 14 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılıkları Kirby Bauer disk difüzyon yöntemiyle belirlendi. İzolatların sahip oldukları çeşitli antibiyotik direnç genlerinin varlığı spesifik primer çiftlerinin kullanıldığı PCR metodu ile belirlendi. Ayrıca izolatlar arasındaki olası klonal ilişkiler RAPD-PCR metodu ile ortaya konuldu. İzolatların tamamının en az 4 farklı antibiyotiğe karşı dirençli olduğu, bir izolatın ise 9 farklı antibiyotiğe karşı direnç ile en yüksek direnç profiline sahip olduğu belirlendi. İzolatlardan birinin (%4) *suII* direnç genine, altısının (%24) *suIII* direnç genine ve bir izolatın (%4) *tetD* direnç genine sahip olduğu belirlendi. İzolatların ERIC2 primeri ile 3 farklı genotipe ayrıldığı ve izolatların büyük bir bölümünün (16 izolat) baskın tip olan LG2 genotipine dahil olduğu belirlendi. Çalışmada çoklu ilaç direncinin yüksek oranda saptanması balık hastalıklarının tedavisinde uygun antimikrobiyel ajanların seçilmesinin önemini ortaya koymaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Antibiyotik, antibiyotik direnç geni, genotiplendirme, *L. garvieae*

### **Phenotypic and Genotypic Determination of Antimicrobial Resistance Profile for *Lactococcus garvieae* Isolates**

**Abstract:** The intense and unconscious use of antimicrobial agents in aquaculture results in the occurrence of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes (ARGs). In such cases, water and sediment may become a reservoir for ARGs and these genes can be transferred horizontally among fish and human pathogens. In the current study, antimicrobial activity of 25 *L. garvieae* strains isolated from different regions of Turkey was determined by Kirby Bauer disk diffusion method against the 14 different antibiotics. Presence of various antibiotic resistance genes in the isolates was determined by PCR method with specific primers. Additionally, possible clonal relationships between isolates were demonstrated by the RAPD-PCR method. All isolates have resistant to at least 4 different antibiotics, also one isolate had the highest resistance profile with resistance to 9 different antibiotics. It was determined that one of the isolates (4%) has *SuII* resistance gene, six (24%) of isolates have the *suIII* resistance gene and one isolate (4%) has *tetD* resistance gene. It was determined that the isolates were divided into 3 different genotypes by the ERIC2 primer and large amount of the isolates (16 isolates) have involved dominant type LG2 genotype. Detection of high rate multi-drug resistance in the study, suggested that selection of appropriate antimicrobial agents is important for treatment of fish diseases.

**Key words:** Antibiotic, antibiotic resistance gene, genotyping, *L. garvieae*

### **Giriş**

*Lactococcus garvieae* (*L. garvieae*) enfeksiyonlarının tedavisinde en etkin yol patojene karşı antibiyogram yaparak en etkili antibiyotiği tespit ederek uygulamaktır [14]. Ancak balık hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin kullanımına son zamanlarda çeşitli ülkeler tarafından kısıtlamalar getirilmiştir. ABD'de balıklarda sulfamerazin, oksitetrasiklin dihidrat, sulfadimetoksin-ormetoprim

ve florfenikol'ün yasal kullanımına izin verilirken [4], İngiltere'de sadece üç adet antibiyotik (florfenikol, oksitetrasiklin ve amoksisilin) su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanım için lisans almıştır [18]. Ülkemiz su ürünleri yetiştiriciliğinde çok çeşitli antibakteriyellerin kullanıldığı bildirilmiş olmasına rağmen, Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü verilerine göre balıklarda kullanılacak 40 adet ruhsatlı antibakteriyel ürün bulunmakta ve bu ürünlerin ise beş

farklı etken madde, florfenikol, oksitetrasiklin HCl, enrofloksasin, sülfadiazin-trimetoprim ve amoksisilin trihidrat içerdiği görülmektedir [9].

Genel olarak *L. garvieae* enfeksiyonlarının tedavisinde eritromisin, oksitetrasiklin, amoksisilin ve düşük düzeyde doksisilin en sık olarak kullanılan antibiyotiklerdir [28]. Ancak streptokokkal balık patojenlerinde antibiyotik kullanımına bağlı olarak antibiyotiklere karşı direnç geliştiği bildirilmiştir [2, 3]. Bir izolatta birden fazla kemoterapotik ajana karşı direncin geliştiği çoklu direnç sık olarak karşımıza çıkmaktadır. Bakteriye populasyonlardaki antibiyotik direnç genlerinin yayılımı horizontal gen transferinin çeşitli mekanizmaları yoluyla gerçekleşmektedir. Streptokokkal balık patojenlerinde en yaygın gen transfer mekanizması plazmid ilişkili transferdir. Akuvatik Streptokok türlerinde antibiyotik direnciyle ilgili ilk rapor Japonya’da kültüre edilen sarıkuyruk balıklardan yapılmıştır. Çalışmada makrolid, linkomisin ve tetrasikline karşı orta düzeyde direnç oluştuğu ve direnç genlerinin yapısal olarak ekspresse olduğu ve transfer edilemez olduğu ortaya konulmuştur. Yine aynı çalışmada makrolid, linkomisin, tetrasiklinler ve kloramfenikole karşı yüksek düzeyde direnç oluştuğu ve ilişkili direnç genlerinin transfer edilebilir ve indüklenebilir olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar antibiyotik direnç determinantlarının direnç (R) plazmidlerinde ya da tranposonlarda lokalize olduğunu tahmin etmişlerdir [2]. Bu bulgular, eritromisin, oksitetrasiklin ve linkomisin dirençli *L. garvieae* izolatlarından izole edilen R plazmidlerinin karakterizasyonuna neden olmuş ve *ermB* ve *tet(S)* direnç genlerinin varlığını ortaya çıkarmıştır [11]. 170 adet *L. garvieae* izolatının antibiyotik duyarlılık testi sonucu izolatların neredeyse yarısının aynı anda eritromisin, linkomisin ve oksitetrasikline dirençli olduğu ve tüm dirençli izolatların *ermB* ve *tet(S)* direnç genlerine sahip oldukları ortaya konulmuştur [13]. İran’da yapılan çalışmada 49 *L. garvieae* izolatının %65,3’ü enrofloksasin’e, %42,8’i eritromisin’e, %40,8’i kloramfenikol ve trimetoprim+sulfametoksazol ve %38,7’sinin tetrasiklin’e karşı dirençli olduğu bulunmuş ve test edilen 49 izolatın tamamını en az bir tetrasiklin direnç geni taşıdığı saptanmıştır [22]. Ülkemizde *L. garvieae* izolatlarında antibiyotik direnç genlerinin varlığının belirlendiği bir çalışmada izolatların en yaygın olarak tetrasiklin (*tetB*) direnç geni taşıdığı ortaya konulmuştur [26].

Bu çalışma ile Türkiye’nin değişik bölgelerinden izole edilmiş olan *L. garvieae* izolatlarının antimikrobiyal aktiviteleri ve izolatların sahip oldukları bazı antibiyotik direnç genleri belirlenmiş ve izolatlar arasındaki genetik ilişkiler Random Amplified Polimorfik DNA-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD-PCR) metodu ile ortaya konulmuştur.

## Materyal ve Metot

**Bakteriyel izolatlar:** Çalışmada Türkiye’nin değişik bölgelerinden izole edilmiş olan 25 adet Gökkuşluğu alabalığı kökenli *L. garvieae* saha izolatu ve *L. garvieae* ATCC 43921 referans suşu kullanıldı (Tablo 1). İzolatlar Trypticase soy broth’a (Merck, Almanya) pasajlandı ve 25 °C’de 24 saat inkübe edilerek canlandırıldı.

***L. garvieae* Spesifik PCR:** İzolatların DNA ekstraksiyonları prensibi spin kolon ile filtrasyon esasına dayanan ticari DNA ekstraksiyon kiti (Invitrogen, Kanada) kullanılarak yapıldı. Kit içeriğine ek olarak Gram pozitif bakteriler için 0,06 g Tris-HCl, 0,15 g EDTA, 240 ml Triton X-100, 0,4 g lizozim’den oluşan 20 ml lizozim lizis buffer hazırlandı. *L. garvieae* izolatları genetik olarak tür spesifik pLG-1 (5’-CATAACAATGAGAATCGC-3’) ve pLG-2 (5’-GCACCCTCGCGGGTTG-3’) primer setinin kullanıldığı PCR metodu ile konfirme edildi [30]. *L. garvieae* spesifik 1100 bp’lik son amplifikasyon ürününün görüldüğü izolatlar *L. garvieae* olarak değerlendirildi. PCR çalışmasında pozitif kontrol olarak *L. garvieae* ATCC 43921 suşu kullanıldı.

**Disk Difüzyon Testi:** İzolatların antibiyotik profillerinin belirlenmesinde Kirby Bauer disk difüzyon metodu kullanıldı. İzolatların amoksisilin (10 µg), ampisilin (10 µg), enrofloksasin (5 µg), eritromisin (15 µg), florfenikol (30 µg), flumekuin (30 µg), gentamisin (10 µg), kanamisin (30 µg), neomisin (30 µg), oksitetrasiklin (30 µg), oksolinik asit (2 µg), sefoperazon (75 µg), trimetoprim (5 µg) ve trimetoprim+sulfametoksazol (25 µg) (Bioanalyse, Türkiye) olmak üzere 14 farklı antibiyotiğe karşı direnç profilleri belirlendi. Bu amaçla her bir bakteri Brain Heart Infusion agarda 25 °C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılarak subkültüre edildi. Elde edilen bakteri subkültürleri McFarland 0.5 standardına göre ayarlandı ve süspansiyonlarının her birinden 0,1 ml alınarak Müeller-Hinton agara steril

svap yardımıyla ekimleri yapıldı. Daha sonra ekim yapılan petrilere antibiyotik diskleri yerleştirilerek 25 °C'de 24-48 saat inkube edildi. İnkubasyon sonrası diskler etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçüldü ve sonuçlar referans değerlerle karşılaştırılarak değerlendirme yapıldı [5].

**Antimikrobiyal Direnç Genlerinin Belirlenmesi:** Çalışmada kullanılan *L. garvieae* izolatla-

rında eritromisin (*ermB*, *ermF*), florfenikol (*floR*), sulfanamid (*sulI*, *sulII* ve *sulIII*), tetrasiklin (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE* ve *tetG*) ve trimetoprim (*dhfr1*) antibiyotik direnç genlerinin varlığı PCR metodu ile araştırıldı. Çalışmada kullanılan oligonükleotid primer dizileri ve bu dizilere ait beklenen PCR son ürün boyutları Tablo 2'de verildi.

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan *L. garvieae* saha izolatları, izolasyon yerleri ve tarihi

No	İzolatlar	İzolasyon Yeri		İzolasyon Yılı
1	Çob S	Muğla	Akdeniz	2001
2	Alk S	Antalya	Akdeniz	2002
3	Haykas 12B	Isparta	Akdeniz	2012
4	Anakas 12B	Isparta	Akdeniz	2012
5	Kep B	Antalya	Akdeniz	2001
6	Yal B	Isparta	Akdeniz	2012
7	Çan B	Isparta	Akdeniz	2012
8	Göz B	Muğla	Akdeniz	2001
9	Çift B	Eskişehir	İç Anadolu	2012
10	Esk B	Eskişehir	İç Anadolu	2017
11	Sam ED	Samsun	Karadeniz	2010
12	Sam EK	Samsun	Karadeniz	2010
13	Or YDD	Ordu	Karadeniz	2014
14	Or YDB	Ordu	Karadeniz	2014
15	Or YDE	Ordu	Karadeniz	2014
16	Or YDF	Ordu	Karadeniz	2014
17	SK 68D	Aydın	Ege	2011
18	SK 45K	Aydın	Ege	2011
19	SK 31K	Aydın	Ege	2011
20	SK 19K	Aydın	Ege	2011
21	SK 67K2	Aydın	Ege	2011
22	SK 66B	Aydın	Ege	2011
23	SK 53K	Aydın	Ege	2011
24	SK 65B	Aydın	Ege	2011
25	37K	Aydın	Ege	2011

**Tablo 2.** Antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesinde kullanılan primer setleri

Primerler	Primer Dizileri	Hedef Gen	PCR Ürün Boyutu	Kaynak
<i>ermB</i> -F <i>ermB</i> -R	GAAAAGGTAAGCAACCAAATA AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	<i>ermB</i>	639	[24]
<i>ermF</i> -F <i>ermF</i> -R	CGGGTCAGCACTTTACTATTG GGACCTACCTCATAGACAAG	<i>ermF</i>	466	[24]
<i>floR</i> -F <i>floR</i> -R	TATCTCCCTGTCGTTCCAG AGAACTCGCCGATCAATG	<i>floR</i>	399	[27]
<i>SuI</i> -F <i>SuI</i> -R	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC TGAAGTTCGCGCGCAAGGCTCG	<i>suI</i>	163	[20]
<i>SuII</i> -F <i>SuII</i> -R	TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG	<i>suII</i>	191	[20]
<i>SuIII</i> -F <i>SuIII</i> -R	TCCGTTACGCGAATTGGTGCAG TTCGTTACGCGCTTACACCAGC	<i>suIII</i>	128	[20]
<i>tetA</i> -F <i>tetA</i> -R	GCTACATCCTGCTTGCCTTC CATAGATCGCCGTGAAGAGG	<i>tetA</i>	210	[17]
<i>tetB</i> -F <i>tetB</i> -R	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG GTAATGGGCCAATAACACCG	<i>tetB</i>	659	[17]
<i>tetC</i> -F <i>tetC</i> -F	CTTGAGAGCCTTCAACCCAG ATGGTCGTCATCTACCTGCC	<i>tetC</i>	418	[17]
<i>tetD</i> -F <i>tetD</i> -R	AAACCATTACGGCATTCTGC GACCGGATACACCATCCATC	<i>tetD</i>	787	[17]
<i>tetE</i> -F <i>tetE</i> -R	AAACCACATCCTCCATACGC AAATAGGCCACAACCGTCAG	<i>tetE</i>	278	[17]
<i>tetG</i> -F <i>tetG</i> -R	GCTCGGTGGTATCTCTGCTC AGCAACAGAATCGGGAACAC	<i>tetG</i>	468	[17]
<i>dhfr1</i> -F <i>dhfr1</i> -R	AAGAATGGAGTTATCGGGAATG GGGTAAAACCTGGCCTAAAATTG	<i>dhfr1</i>	391	[27]

Direnç genlerinden *ermB*, *floR*, *suI*, *suII*, *tetA*, *tetB* ve *tetC*'ye ait pozitif DNA örnekleri Dr. Mustafa Türe (Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Trabzon) ve Dr. Muhammed Duman'dan (Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa) temin edildi.

Eritromisin direnç genlerinin belirlenmesinde Roberts ve ark. [24]'ün bildirdiği PCR yöntemi modifiye ve optimize edilerek kullanıldı. *ermB* ve *ermF* direnç genlerinin belirlenmesinde tekli PCR denemeleri gerçekleştirildi. PCR amplifikasyonu için 25 µl PCR reaksiyon karışımı oluşturuldu. Bu karışım DEPC-treated water, 1xPCR Buffer, 1,5 mM of MgCl<sub>2</sub>, her bir dNTP'den 0,12 mM, 1,5 U Taq polymerase (Fermentas), her bir primer'den 1 pmol ve 3 µl template DNA'dan oluşturuldu. Oluş-

turulan bu karışım 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 30 sn denatürasyon, 50°C'de 30 sn primer bağlanma, 72°C'de 45 sn uzama olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 10 dk son uzama koşullarında amplifiye edildi.

Florfenikol direnç geninin (*floR*) belirlenmesinde Van ve ark. [27]'nin bildirdiği PCR yöntemi modifiye ve optimize edilerek kullanıldı. PCR amplifikasyonunda PCR water, 1xPCR Buffer, 1,5 mM of MgCl<sub>2</sub>, her bir dNTP'den 0,12 mM, 1,5 U Taq polymerase (Fermentas), her bir primer'den 1 pmol ve 3 µl template DNA içeren 25 µl PCR reaksiyon karışımı oluşturuldu. Oluşturulan bu karışım 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 30 sn denatürasyon, 50,5°C'de 30 sn primer bağlanma, 72°C'de 45 sn uzama olmak üzere 35 siklus ve

72°C'de 10 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

Sulfonamid direnç genlerinin belirlenmesinde Pei ve ark. [20]'nin bildirdiği PCR yöntemi modifiye ve optimize edilerek kullanıldı. *suII*, *suIII* ve *suVIII* direnç genlerinin belirlenmesinde tekli PCR denemeleri gerçekleştirildi. PCR amplifikasyonunda DEPC-treated water, 1xPCR Buffer, 1,25 mM of MgCl<sub>2</sub>, her bir dNTP'den 0,12 mM, 1,75 U Taq polimerase (Fermentas), her bir primer'den 1 pmol ve 3 µl template DNA içeren 25 µl PCR reaksiyon karışımı oluşturuldu. Oluşturulan bu karışım 95°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 95°C'de 15 sn denatürasyon, *suII* için 55,9°C'de, *suIII* için 60,8°C'de ve *suVIII* için 60°C'de 30 sn primer bağlanma, 72°C'de 30 sn uzama olmak üzere 40 siklus ve 72°C'de 7 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

Tetrasiklin direnç genlerinin belirlenmesinde Ng ve ark. [17]'nin bildirdiği PCR yöntemi modifiye ve optimize edilerek kullanıldı. Bu amaçla iki farklı Multipleks PCR denemesi gerçekleştirildi. Birinci denemede *tetB*, *tetC* ve *tetD* genlerinin, ikinci denemede ise *tetA*, *tetE* ve *tetG* genlerinin varlığı belirlendi. PCR amplifikasyonunda DEPC-treated water, 1xPCR Buffer, 2,0 mM of MgCl<sub>2</sub>, her bir dNTP'den 0,3 mM, 1,5 U Taq polimerase (Fermentas), her bir primer'den 1 pmol (1. denemede *tetB*, *tetC* ve *tetD* primerleri, 2. denemede *tetA*, *tetE* ve *tetG* primerleri kullanıldı) ve 3 µl template DNA içeren 50 µl PCR reaksiyon karışımı oluşturuldu. Oluşturulan bu karışım 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 1 dk denatürasyon, 55°C'de 1 dk primer bağlanma, 72°C'de 1,5 dk uzama olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 10 dk final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

Trimetoprim direnç geninin (*dhfrI*) belirlenmesinde Van ve ark. [27]'nin bildirdiği PCR yöntemi modifiye ve optimize edilerek kullanıldı. PCR amplifikasyonunda DEPC-treated water, 1xPCR Buffer, 1,25 mM of MgCl<sub>2</sub>, her bir dNTP'den 0,12 mM, 1,75 U Taq polimerase (Fermentas), her bir primer'den 1 pmol ve 3 µl template DNA içeren 25 µl PCR reaksiyon karışımı oluşturuldu. Oluşturulan bu karışım 95°C'de 15 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 30 sn denatürasyon, 50°C'de 30 sn primer bağlanma, 72°C'de 1 dk uzama olmak üzere 30 sik-

lus ve 72°C'de 7 dk final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

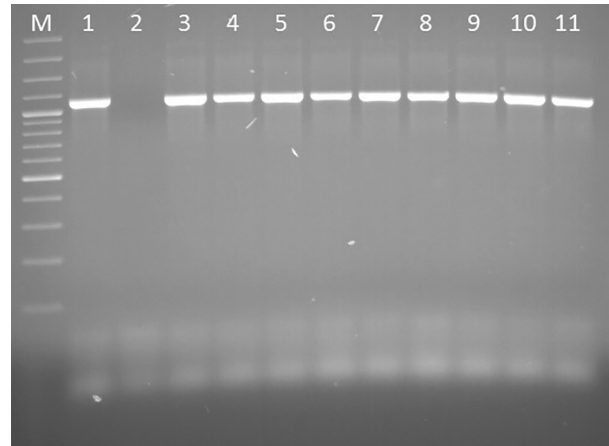
Tüm PCR analizleri sonrası oluşan son amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesinde etidium bromid (2 mg/ml) içeren %1,5-2'lik agaroz jel kullanıldı. Jel elektroforezi sonrası oluşan ürünler UV transilluminatör ile görüntülendi.

#### İzolatlar Arası Klonal İlişkinin Belirlenmesi:

İzolatlar arasındaki klonal ilişkinin ortaya konması amacıyla rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA-polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PCR) metodu kullanıldı. Bu metotta random primer olarak "Enterobacterial repetitive intergenic consensus" dizilerine özgü ERIC-2 primeri (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') kullanıldı [29]. Oluşan RAPD paternlerinin dendogramları UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) ile, CHEF-DR® III, Quantity One® yazılımı (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) kullanılarak çizildi. RAPD analizinin tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla rastgele 7 izolat seçildi ve analiz arka arkaya 3 kez tekrarlandı. İzolatlar arasındaki genetik yakınlık % 70 benzerlik katsayısına göre hesaplandı.

#### Bulgular

***L. garvieae* Spesifik PCR:** Çalışmada kullanılan izolatlar *L. garvieae* tür spesifik PCR uygulamasıyla moleküler olarak konfirme edildi. *L. garvieae* spesifik PCR sonucunda tüm izolatların 1100 bp amplifikasyon ürünü verdiği saptandı (Şekil 1).



**Şekil 1.** *L. garvieae* spesifik PCR (1100 bp). M; Marker (100 bp Plus DNA Marker), 1; *L. garvieae* ATCC 49156, 2; Negatif Kontrol (Distile su), 3-11; *L. garvieae* saha izolatları

**Disk Difüzyon Testi:** *L. garvieae* saha izolatlarının çalışmada kullanılan 14 farklı antibiyotiğe karşı değişik düzeyde antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları belirlendi. İzolatların tamamının en az 4 farklı antibiyotiğe karşı dirençli olduğu, bir izolatın (Yal B izolatı) ise 9 farklı antibiyotiğe karşı direnç ile en yüksek direnç profiline sahip olduğu belirlendi. İzolatların tamamının flumekuin, gentamisin, neomisin ve oksolonik asit'e karşı dirençli amoksisilin, florfenikol ve sefoperazon'a karşı ise duyarlı olduğu saptandı. En düşük direnç oranının ise %4 ile oksitetrasiklin ve %12 ile enrofloksasin'e karşı şekillendiği görüldü (Tablo 3).

**Tablo 3.** Çalışmada kullanılan *L. garvieae* izolatların antimikrobiyal profilleri

Antibiyotik	<i>L. garvieae</i> (n=25)		
	n (%)		
	S	I	R
Amoksisilin	25 (100)	-	-
Ampisilin	5 (20)	20 (80)	-
Enrofloksasin	3 (12)	19 (76)	3 (12)
Eritromisin	22 (88)	3 (12)	-
Florfenikol	25 (100)	-	-
Flumequin	-	-	25 (100)
Gentamisin	-	-	25 (100)
Kanamisin	-	14 (66)	11 (44)
Neomisin	-	-	25(100)
Oksitetrasiklin	15(60)	9 (36)	1 (4)
Oksolinik asit	-	-	25 (100)
Sefaperazon	25 (100)	-	-
Trimetoprim	5 (20)	2 (8)	18 (72)
Trimetoprim-sulfametoksazol	-	12 (48)	13 (52)

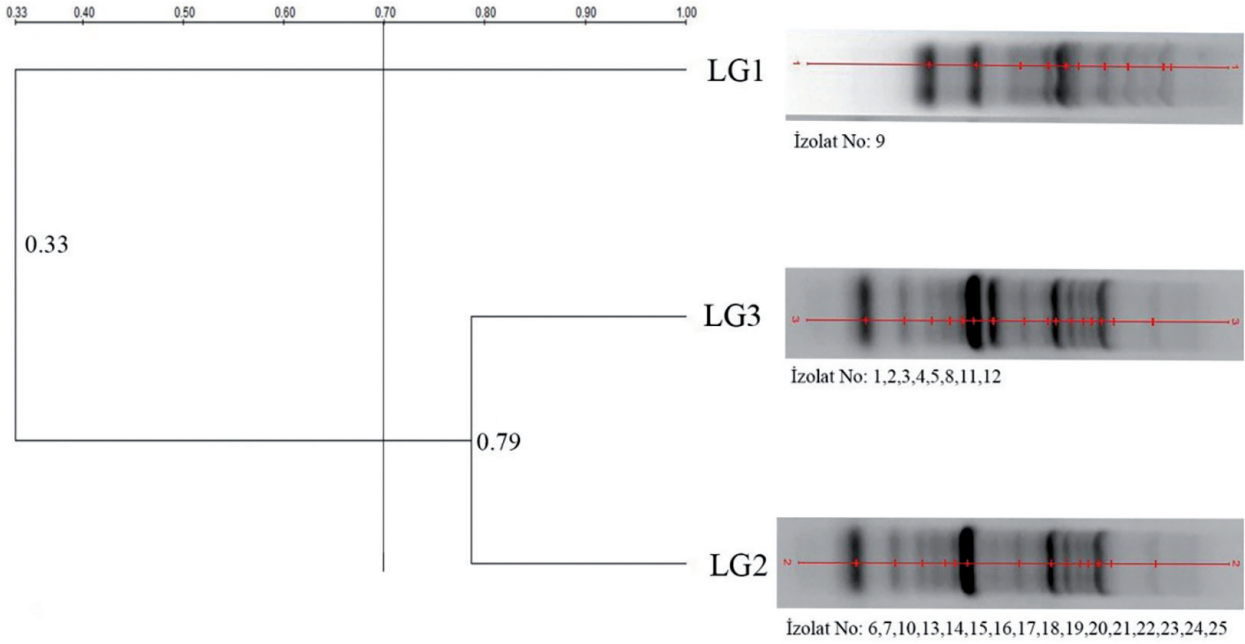
S: duyarlı, I: Orta derece duyarlı, R: Dirençli

**Antimikrobiyal Direnç Genlerinin Belirlenmesi:** Çalışma kapsamında incelenen *L. garvieae* saha izolatları arasından bir izolatın (%4) *suII* direnç genine, altı izolatın (%24) *suIII* direnç genine ve bir izolatın (%4) *tetD* direnç genine sahip olduğu belirlendi. İzolatlar arasında *ermB*, *ermF*, *floR*, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetE* *tetG* ve *dhfr1* direnç genlerinin varlığı saptanamadı. Sadece bir izolatın (Anakas 12B) birden fazla direnç genine sahip olduğu belirlendi (Tablo 4). İzolatların izole edildikleri yerler ile sahip oldukları antibiyotik direnç genleri arasında anlamlı bir ilişki saptanamadı.

**Tablo 4.** *L. garvieae* izolatlarında saptanan antibiyotik direnç genleri

İzolatlar	<i>suII</i>	<i>suIII</i>	<i>tetD</i>
Anakas 12B	+	+	-
Kep B	-	+	-
Çift B	-	-	+
Esk B	-	+	-
Or YDE	-	+	-
SK 66B	-	+	-
37K	-	+	-

**İzolatlar Arası Klonal İlişki:** İzolatlar arası genetik ilişkinin belirlenmesi amacıyla seçilen ERIC-2 primeri ile farklı coğrafik bölgelerden izole edilmiş olan 25 *L. garvieae* saha izolatının üretken bant paternleri verdiği gözlemlendi. ERIC-2 primeri ile üç farklı genotip saptandı ve izolatlar %70 benzerlik katsayısına göre bir küme (LG2 ve LG3 nolu genotip) ve bir "unique" tip (LG1 nolu genotip) içerisinde sınıflandırıldı. Baskın genotip olan LG2'ye izolatların 16'sının (%64) dahil olduğu, unique tip'e ise sadece bir izolatın dahil olduğu, diğer genotip'e ise 8 izolatın (%32) saptandı (Şekil 2). Testin tekrarlanabilirliği %100 olarak bulundu.



Şekil 2. ERIC2 primeri ile *L. garvieae* izolatlarında belirlenen genotipler

## Tartışma ve Sonuç

*L. garvieae*, balıklarda hiperakut, hemorajik sepsisemisi ile seyreden laktokokkozis hastalığının etiyolojik ajanıdır. Etken aynı zamanda önemli bir zoonotik patojen olarak ele alınmaktadır. Ticari öneme sahip birçok tatlı ve tuzlu su balık türlerinde laktokokkozis sonucu meydana gelen önemli ekonomik kayıplar su ürünleri yetiştiriciliğine zarar vermektedir [16]. Bununla birlikte *L. garvieae* enfeksiyonlarında tedavi kemoterapotik ajanlar ile yapılabilmektedir. Ancak tedavide kullanılan antibiyotiklerin kalıntı, antimikrobiyal direnç gelişimi ve maliyet gibi faktörler göz önüne alınarak yapılması gerektiği bunun içinde uygun antibiyotik seçimi için etkenin duyarlı olduğu antibiyotik belirlenerek uygulanmasının büyük önem taşıdığı bildirilmektedir [14].

Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalar ile değişik bölge ve illerden izole edilmiş olan *L. garvieae* izolatların sahip olduğu antimikrobiyel aktiviteler göz önüne serilmiştir. Kubilay ve ark., [14] 2001-2003 yılları arasında Antalya, Isparta, Konya, Denizli ve Muğla illerinden izole edilmiş yedi *L. garvieae* izolatının kanamisin, sefuroksim, linkomisin, penisilin, norfloksasin, siprofloksasin, ceftriaxone,

klindamisin, vankomisin, okzasilin, streptomisin, trimetoprim+sulfametoksazol, gentamisin, apramisin, tylosin, colistin, sulfamethizol, flumekuün ve oksolinik asit'e dirençli olduklarını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda benzer şekilde flumekuün, gentamisin ve oksolinik asit'e karşı %100 oranında direnç saptanmıştır. Kav ve Erganiş [12] 2002-2004 yılları arasında Konya ilinde gökkuşuğu alabalığı işletmelerinden elde ettikleri izolatların tamamında metisilin, okzasilin, kloksasilin, spiramisin, klindamisin, linkomisin, gentamisin, neomisin, basitrasin ve trimetoprim+sulfametoksazol'e karşı direnç saptamışlardır. Yapılmış olan çalışmada elde edilen sonuçlara göre *L. garvieae* enfeksiyonlarının tedavisinde  $\beta$ -laktam gurubu antibiyotiklerin tercih edilebileceği bildirilmiştir. Altun ve ark., [1] disk difüzyon yöntemi ile Türkiyenin değişik illerinden izole edilen 10 gökkuşuğu alabalığı kökenli *L. garvieae* izolatının tamamının gentamisin, neomisin, linkomisin ve trimetoprim+sulfametoksazol'e karşı dirençli olduklarını belirlemişlerdir. Oksitetrasiklin ve eritromisin'e karşı ise sırasıyla %80 ve %90 oranında yüksek düzeyde direnç saptanmıştır. Akdeniz bölgesinde 2012 yılında rastlanılan salgından izole edilen suşların benzer şekilde oksitetrasiklin, neomisin ve trimetoprim+sulfametoksazol'e karşı di-



rençli olduğu bildirilmiştir [6]. Türe ve Boran [26] çalışmalarında kullandıkları 29 *L. garvieae* izolatı arasından 20 izolatın çoklu antibiyotik direncine sahip olduklarını bildirmişler ve en yüksek direnç oranının %86,3 ile trimetoprim+sulfametoksazol'e karşı şekillendiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada Türe ve Boran [26]'nın bildirdiği gibi izolatlarda yüksek düzeyde (%100) çoklu antibiyotik direnci saptanmıştır. Yapılan çalışmalardan farklı olarak trimetoprim+sulfametoksazol'e karşı ise daha düşük düzeyde (%52) direncin şekillendiği belirlenmiştir. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda [6, 26] çalışmamıza benzer şekilde florfenikol'e karşı bir direncin şekillenmediği görülmüş olup *L. garvieae* enfeksiyonların sağaltımında bu antibiyotiğin kullanılabilir olduğu değerlendirilmiştir.

Duyarlı bakteriler antibiyotiğin hücre membranı tarafından dışlanması, antibiyotiğin hücre içi modifikasyonu ve/veya deaktive edilmesi, hücresel hedefe duyarlılığının azaltılması, antibiyotiğin hücreden dışarıya atılması ve hücre içi ayrıştırma gibi çoklu ve kompleks mekanizmalar yoluyla antibiyotiklere karşı dirençli hale gelebilirler [25]. Bu mekanizmalar mutasyon ve seleksiyon yoluyla ya da diğer bakterilerden direnç kodlayan genetik bilgilerin kazanılması ile evrimleşebilir. Direnç kodlayan genetik bilgilerin aktarımı horizontal gen transferi (HGT) aracılığıyla gerçekleşebilir. HGT içerisinde konjugasyon (bakteriyel plazmidler ve konjugatif transpozonlar yoluyla), transformasyon (serbest DNA'nın çevreden alınmasıyla) ve transdüksiyon (bakteriyofajlarla) gibi büyük bir ölçüde antibiyotiğe dirençli bakterilerin geliştirilmesinden sorumlu mekanizmalar bulunmaktadır [15]. Antibiyotik direnç genlerinin patojenler arasında aktarılmasında özellikle, akuvatik ortamların önem taşıdığı ve bu ortamların rezervuar olarak görev yaptıkları bildirilmektedir [10]. Dolayısıyla balık patojenlerinde görülen antibiyotik direncinin ve izolatların sahip oldukları direnç genlerinin belirlenmesi hem hayvan sağlığı hem de insan sağlığı açısından önem taşımaktadır. Ülkemizde ve dünyada *L. garvieae* izolatlarının sahip oldukları antibiyotik direnç genlerinin ortaya konulduğu sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Türe ve Boran [26] 28 *L. garvieae* saha izolatında 12 farklı antibiyotik direnç geninin varlığını inceledikleri çalışmalarında izolatlar en yaygın olarak *tetB* (20/28) ve *ereB* (19/28) di-

renç genlerinin taşıdıklarını saptamışlardır. Araştırdıkları diğer direnç genlerinden 13 izolatın *floR*, 12 izolatın *suIII* ve *blaTEM* ( $\beta$ -lactam direnç geni), 3 izolatın *suII*, 2 izolatın *tetS*, *dhfrI* ve *aadA* (gentamisin direnç geni) taşıdığını, izolatların hiçbirinin *ereA*, *blaPSE* ( $\beta$ -lactam direnç geni) ve *ampC* ( $\beta$ -lactam direnç geni) taşımadığını ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte izolatların tamamının en az 2 antibiyotik direnç geni taşıdığını bildirmişlerdir. 25 adet *L. garvieae* saha izolatının incelendiği bu çalışmada ise Türe ve Boran [26]'nın aksine izolatların düşük düzeyde antibiyotik direnç geni taşıdığı belirlenmiştir. Çalışmamızda bir izolatın (%4) *suII* direnç genine, altı izolatın (%24) *suIII* direnç genine ve bir izolatın (%4) *tetD* direnç genine sahip olduğu belirlendi. İzolatlar arasında *ermB*, *ermF*, *floR*, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetE* *tetG* ve *dhfr1* direnç genlerinin varlığı saptanamamıştır. Çalışmamızla benzer şekilde Duman [7] 137 *L. garvieae* saha izolatının incelendiği çalışmada izolatların *tetA* ve *floR* direnç genlerine sahip olmadığını belirlemiştir. Ancak yine aynı çalışmada her iki çalışmada ortak olarak araştırılan genlerden *ermB*'nin dört izolat da var olduğu bildirilmiştir. Bunun dışında izolatların dokuzunda *ermA*, yedisinde *tetM* ve dördünde *tetS* direnç genine sahip olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda *suII* ve *suIII* direnç genine sahip olduğu belirlenen 4, 10 ve 25 nolu izolatın fenotipik olarak trimetoprim+sulfametoksazol'e karşı dirençli, 15 ve 22 nolu izolatın ise orta düzeyde duyarlı oldukları belirlenmiştir.

İran'da yapılan bir çalışmada 49 *L. garvieae* izolatında yüksek düzeyde (%89,4) *tetA* geninin varlığına rastlanılmıştır [22]. Aynı çalışmada çalışmamızda bulduğumuz tek tetrasiklin direnç geni olan *tetD* ise %15,3 oranında saptanmıştır. Yine İran'da yapılan bir başka çalışmada ise 24 *L. garvieae* izolatı incelenmiş ve izolatların dokuzunun *ermB*, onunun ise *tetS* direnç genine sahip oldukları belirlenmiştir [21]. Çalışmamızda ise *ermB* direnç geni saptanamamıştır. Sonuçlar farklı coğrafik bölgelerden izole edilen izolatların farklı direnç genlerine sahip olduklarını göstermektedir. Bu farklılıkların işletmelerde hastalıkların tedavisinde bölgesel olarak kullanılan antibiyotik farklılıklarından ve/veya izolatların bölgeler arası yumurta ve balık nakilleri ile yayılmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bakteriyel izolatlar arasında genetik ilişkilerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan metotlardan birisi RAPD-PCR metodu [1, 19]. Araştırmacılar bu metotta random primer olarak farklı primer dizilerinin kullanılabilirliğini değerlendirmişlerdir. Ravelo ve ark., [23] farklı coğrafik bölge ve balık türlerinden izole edilen *L. garvieae* izolatlarını P5 ile P6 primerlerinin kullanıldığı RAPD-PCR ile genotiplendirmişlerdir. Çalışmalarında kullandıkları izolatları 3 genogruba ayırmışlardır. Alabalıklardan izole edilen İspanya, Portekiz, İngiltere ve Türkiye izolatlarının 1. grupta, yine alabalıklardan izole edilen Fransa ve İtalya suşlarının 2. grupta ve sarıkuyruk balıklarından izole edilen Japon izolatları ile *L. garvieae* NCDO 2155 referans suşun ise 3 grupta kümelendiğini bildirmişlerdir. Foschino ve ark., [8] *L. garvieae* izolatları arasındaki genetik ilişkiyi belirlemede M13 ve P5 primerlerini kullanmışlardır. M13 primerinin en iyi ayırım gücüne sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bu primeri ile İtalyan balık ve çiftlik örneklerinden elde edilen toplam 81 izolatı 5 küme içerisinde 52 RAPD genotipine ayırmışlardır. Balıklardan izole edilen izolatların ise 3 farklı kümeye dağıldığı görülmüştür. Sonuçta balık ve çiftlik izolatları arasında düşük genetik ilişkinin olduğu belirlenmiştir. Altun ve ark., [1] *L. garvieae* izolatlarının ERIC2 primeri ile değişken bant paternleri verdikleri, dolayısıyla epidemiyolojik araştırmalarda bu random primerin kullanılabilir olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar *L. garveae* izolatlarını 3 farklı genotip içeren bir küme içerisinde gruplanmış ve Ravelo ve ark., [23]'ün çalışmalarına paralel olarak ülkemizden izole edilen bazı izolatların İspanya ve İngiltere izolatlarıyla yüksek oranda benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada Türkiye kökenli izolatların büyük bir bölümünün (8 izolat) predominant tip olan LG1 genotipine dahil olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda 25 *L. garvieae* saha izolatının ERIC2 primeri ile üretken bant paternleri verdiği gözlenmiş ve izolatlar üç farklı genotip içerisine yerleştirilmiştir. İzolatların 16'sının (%64) baskın genotip olan LG2 içerisine dahil olduğu, unique tip'te ise sadece bir izolatın bulunduğu belirlenmiştir. İzolatların büyük çoğunluğunun Altun ve ark., [1]'in yapmış oldukları çalışmada olduğu gibi baskın bir genotip içerisinde gruplanmış olması Türkiye kökenli *L. garvieae* izolatlarının tek bir epidemiyolojik suş ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada elde edilen veriler izolatların çoklu antibiyotik direncine sahip olduğunu ve bazı izolatların antibiyotik direnç genine sahip olduğunu göstermiştir. Antimikrobiyal direnç gelişiminin önüne geçilebilmesi için sahada balık hastalıklarının uygun olmayan şekilde tedavi edilmesinin veya ruhsatsız antibiyotik kullanımının önlenmesi için tedbirlerin alınması gerekmektedir. İşletmelerde kullanılan ilaçların mutlaka reçeteli olmasının ve bu ilaçların kayıt altına alınmasının sağlanması gerekmektedir.

### Teşekkür

Bu çalışma, PYO.VET.1904.17.013 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Aynı isimdeki Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir. "Ayrıca 5<sup>th</sup> International VETistanbul Group Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur."

### Kaynaklar

1. Altun S, Onuk EE, Çiftçi A, Büyükekiz AG, Duman M, (2013). Phenotypic, genotypic characterisation and antimicrobial susceptibility determination of *Lactococcus garvieae* strains. *Kafkas Üni Vet Fak Derg.* 19, 375-381.
2. Aoki T, Takami K, Kitao T, (1990). *Drug resistance in a nonhemolytic Streptococcus sp. isolated from cultured yellowtail Seriola quinqueradiata.* *Dis Aquat Org.* 8, 171-177.
3. Austin B, Austin AD, *Bacterial fish pathogens: Diseases of farmed and wild fish, 5th edn.* Springer/Praxis Publishing, Chichester, 2012.
4. Baydan E, Yurdakök B, Aydın FG, (2012). *Balıklarda antibiyotik kullanımı.* *Türkiye Klinikleri J Vet Sci.* 3(3), 45-52.
5. Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). The susceptibility of the isolates was determined according to Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-First Informational Supplement, Zone Diameter Standards for *Enterococcus* spp. (7). CLSI.: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first Informational Supplement, 2011.
6. Didinen BI, Yardımcı B, Onuk EE, Metin S, Yıldırım P, (2014). *Naturally Lactococcus garvieae infection in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792): New histopathological observations, phenotypic and molecular identification.* *Rev Med Vet.* 165(1-2), 12-19.
7. Duman M, (2017). *Gökkuşuğu alabalıklarında görülen motil aeromonas (Aeromonas hydrophila, A. sobria, A. caviae), Yersinia ruckeri ve Lactococcus garvieae bakterilerinin antimikrobiyal duyarlılıkları ve duyarlılıkta rol oynayan genlerin tespiti.* Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa, Doktora Tezi, sayfa: 70.

8. Foschino R, Nucera D, Volponi G, Picozzi C, Ortoffi M, Bottero MT, (2008). *Comparison of Lactococcus garvieae strains isolated in northern Italy from dairy products and fishes through molecular typing*. J Applied Microbiol. 105(3), 652-62
9. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (GTHB). Bakanlığımızdan izinli veteriner tıbbi ürünler listesi. <https://www.tarim.gov.tr/Konular/Veteriner-Hizmetleri/Veteriner-Saglik-Urunleri>. 2018. İnternet Erişimi: 15.03.2018.
10. Heuer OE, Kruse H, Grave K, Collignon P, Karunasagar I, Angulo FJ, (2009). *Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture*. Clin Infect Dis. 49, 1248-1253.
11. Hirono I, Aoki T, (2001). *Characterization of structure and genes of R Plasmid from fish-pathogenic Lactococcus garvieae*. Proc Jpn Soc Antimicrob Anim. 23, 22-24.
12. Kav K, Erganiş O, (2008) *Antibiotic susceptibility of Lactococcus garvieae in Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) farms*. Bull Vet Inst Pulawy. 52, 223-226.
13. Kawanishi M, Kojima A, Ishihara K, Esaki H, Kijima M, Takahashi T, Suzuki S, Tamura Y, (2005). *Drug resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns of Lactococcus garvieae isolates from cultured Seriola (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan*. Lett Appl Microbiol. 40, 322-328.
14. Kubilay A, Altun S, Ulukoy G, Diler O, (2005). *Lactococcus garvieae* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi. 1(1), 39-48.
15. Marti E, Variatza E, Balcazar JL, (2014). *The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance*. Trends Microbiol. 22(1), 36-41.
16. Meyburgh CM, Bragg RR, Boucher CE, (2017). *Lactococcus garvieae: an emerging bacterial pathogen of fish*. Dis Aquat Org. 123, 67-79.
17. Ng LK, Marti, I, Alfa M, Mulvey M, (2001). *Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes*. Mol Cel Prob. 15, 209-215.
18. Ngo TPH, Smith P, Bartie KL, Thompson KD, Verner-Jeffreys DW, Hoare R, Adams A, (2018). *Antimicrobial susceptibility of Flavobacterium psychrophilum isolates from the United Kingdom*. J Fish Dis. 41, 309-320.
19. Onuk EE, Çiftçi A, Fındık A, Çiftçi G, Altun S, Balta F, Özer S, Çoban AY, (2011). *Phenotypic and Molecular Characterization of Yersinia ruckeri Isolates from Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum, 1792) in Turkey*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 124(7-8), 320-328.
20. Pei R, Kim SC, Carlson KH, Pruden A, (2006). *Effect of river land scape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG)*. Water Res. 40, 2427-2435.
21. Raissy M, Moumeni M, (2016). *Detection of antibiotic resistance genes in some Lactococcus garvieae strains isolated from infected Rainbow trout*. Iran J Fish Sci. 15(1), 221-229.
22. Raissy M, Shahrani M, (2015). *Detection of tetracycline resistance genes in Lactococcus garvieae strains isolated from Rainbow trout*. World Academy of Science, Engineering ve Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food ve Biotechnological Engineering. 9(2), 126-129.
23. Ravelo C, Magarinos B, Lopez-Ramade S, Toranzo AE, Romalde JL, (2003). *Molecular fingerprinting of fish-pathogenic Lactococcus garvieae strains by Random Amplified polymorphic DNA Analysis*. J Clin Microbiol. 41(2), 751-756.
24. Roberts MC, Chung WO, Roe D, Xia M, Marquez C, Borthagaray G, Whittington WL, Holmes KK, (1999). *Erythromycin resistant Neisseria gonorrhoeae and oral commensal Neisseria spp. carry known rRNAmethylase genes*. Antimicrob Agents Chemother. 43(6), 1367-1372.
25. Taylor NGH, Verner-Jeffreys DW, Baker-Austin C, (2011). *Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance?* Trends Ecol Evol. 26(6), 278-284.
26. Türe M, Boran H, (2015). *Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance of Lactococcus sp. strains isolated from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Bull Vet Inst Pulawy. 59, 37-42.
27. Van TTH, Chin J, Chapman T, Tran LT, Coloe PJ, (2008). *Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of Escherichia coli isolations for antibiotic resistance and virulence genes*. Int J Food Microbiol. 124, 217-223.
28. Vendrell D, Balcazar JL, Ruiz-Zarzuela I, De Blas I, Girones O, Muzquiz JL, (2006). *Lactococcus garvieae in fish: a review*. Comp Immun Microbiol Infect Dis. 29, 177-198.
29. Versalovic J, Koeuth T, Lupski R, (1991). *Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes*. Nucleic Acids Res. 19(24), 6823-6831.
30. Zlotkin A, Eldar A, Ghittino C, Bercovier H, (1998). *Identification of Lactococcus garvieae by PCR*. J Clin Microbiol. 36, 983-985.

# The First Detection and Phylogenetic Analysis of *Bovine Astrovirus* from Diarrheic Calves in Turkey

Turhan Turan, Hakan Işidan

Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, 58140, Sivas, TURKEY

Geliş Tarihi / Received: 15.07.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 07.08.2018

**Abstract:** A total of 127 stool samples (rectal swab) from diarrheic calves, up to one month of age, were collected during one year period (2014-16) from three cities (Sivas, Malatya and Elazığ) located central Turkey. 432 bp partial sequence of Nsp1ab gene were amplified. The PCR amplicons were purified and sequenced and deposited to GenBank. Sequence alignment and phylogenetic analysis being based on partial nucleotide sequences of Nsp1ab gene was constructed. As a result of RT-PCR study, we found that the 3.15% of fecal samples (4/127) were positive for diarrhea calves from Turkey. The neighbor-joining tree of partial sequence of Nsp1ab gene (ORF1a) indicated that strains were substituted under three distinct lineage. None of our strains belonged to the Neuro1 lineage (lineage 3) of *Bovine astrovirus* which was isolated from bovine with neurological symptoms. On the other hand, while BAsTVHT1-TUR strain was substituted under lineage 1a, the other novel starts were lineage 2. While the identity of analyzed sequences varies from 51.1 to 100%, novel strains were calculated between 75.8 to 100 % each other. As a result, we report the first detection and phylogenetic analysis of *Bovine astrovirus* from Turkey.

**Key words:** *Bovine astrovirus*, calf, phylogenetic analysis, Turkey.

## Türkiye’de İshalli Buzağlardan *Bovine Astrovirus’un* İlk Teşhisi ve Filogenetik Analizi

**Özet:** Orta Anadolu’da yer alan üç ilden (Sivas, Malatya ve Elazığ), 2014-16 yılları arasında toplam 127 dışkı örneği toplandı. *Bovine astrovirus’un* Nsp1ab geninin 432 bp kısmı bölgeyi çoğaltıldı, dizi analizi yapıldı ve GenBank’a yüklendi. Sekans hizalaması ve filogenetik analizler yapılarak moleküler karakterizasyonu gerçekleştirildi. RT-PCR çalışmasının sonucuna göre örneklerin %3,15’i (4/127) pozitif olarak tespit edildi. Kısmi Nsp1ab gen (ORF1a) bölgesinin neighbour-joining yöntemiyle filogeni ağacı oluşturuldu. Buna göre izolatlarımızın hiçbiri sinirsel belirti gösteren sığırlardan izole edilen Neuro1 hattında (hat 3) yer almazken BAsTV-HT1-TUR suşumuz hat 1a altında ve diğer suşlarımız ise hat 2 altında konumlandı. Analiz edilen sekansların benzerliği %51,1’den %100’e varan oranlarda gerçekleşirken yeni suşların kendi arasındaki benzerlik oranının %75,8’den %100’e vardığı ortaya konuldu. Sonuç olarak, *Bovine astrovirusun* Türkiye’de ilk teşhisi ve filogenetik analizi rapor edilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** *Bovine astrovirus*, buzağı, filogenetik analiz, Türkiye.

## Introduction

Neonatal diarrhea of calves is the one of the significant health problem for the cattle industry. A numerous ethnology including as bacterial and viral agents (such as *Bovine rotavirus*; BRV, *Bovine coronavirus*; BCoV, *Bovine viral diarrhea virus*; BVDV, etc.) have been shown that responsible for the diarrhea of calves [3, 8]. Additionally newly emerging viruses, such as *Bovine torovirus* (BToV), *Bovine norovirus* (BoNoV) and *Bovine nebovirus* (BoNeV); also bovine picornaviruses: bovine enterovirus, Aichivirus B and hunnivirus A) were also reported as an enteric agent isolated from calves [3, 8, 17, 18].

The family *Astroviridae* consists of small (28–30 nm), non-enveloped, single-stranded positive-sense RNA viruses of approximately 7 kb in length. They have been classified into two genera, namely Mamastroviruses (MAstVs) and Avastroviruses (AAstVs), are known to infect mammalian and avian species, respectively [4]. Mamastroviruses have a broad host range including humans, mink, sheep, pigs, rats, marine mammals, dogs, cheetahs, roe deer, cattle and bats [2, 9, 10, 13, 19, 23, 25].

Astroviruses are generally associated with either mild or severe enteric disease symptoms such as diarrhea and vomiting in a number of mammalian species [12]. The first reports in animals were from lambs and calves suffering from diarrhea [24, 27].

Subsequently, a bovine enteric virus antigenically related to the UK strain of BoAstV was isolated in Florida from a calf with diarrhea [28]. *Bovine astrovirus* was considered to be avirulent, as experimentally infected gnotobiotic calves remained clinically normal, although pathological studies on infected calves were not performed. Although calves experimentally infected with this astrovirus did not develop clinical disease, the virus caused cytopathology of the M cells of the dome epithelium covering the Peyer's patches [28].

It was originally concluded that in natural conditions, BoAstV does not seem to be directly associated with a severe diarrheic disease in calves [5, 25, 27, 28] and few controversial data are available on the prevalence of this infection. An astrovirus was isolated from diarrheic yaks from Tibet and also a diarrheic European roe deer (*Capreolus capreolus*), both are genetically related to BoAstV, suggesting that this virus could cross the species barrier to infect both cattle and roe deer or yaks [7, 25]. On the other hand, although astroviruses were mainly found in relation to gastroenteritis in animals and humans so far, recently detected astrovirus infections were also related to encephalitis. [11, 15, 20, 21].

The existence of *Bovine astrovirus* is not yet reported from Turkey. The aim of the study is to observe bovine astroviruses from fecal samples of diarrheic calves in Turkey. In addition that, sequence and phylogenetic analysis of novel strains is also aimed.

## Materials and Methods

**Samples and RNA isolation:** A total of 127 stool samples (rectal swab) from diarrheic calves, up to one month of age, were collected during one year period (2014-16) from three cities (Sivas, Malatya, and Elazığ) located central Turkey. During the sampling period collected stool samples transported to the laboratory quickly as possible and stored in minus 80°C deep freeze until they are submitted to the RNA isolation.

Fecal samples were 1/10 diluted in 1M phosphate buffered saline and centrifuged 5 minutes at 5000 rpm to remove large cellular debris. After the centrifugation, supernatants were submitted to the nucleic acid extraction procedure according to the

manufacturer's informations of GF-1 Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Vivantis Technologies, Malaysia). Eluted nucleic acids were stored in -80°C deep-freeze until use.

**Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR):** The cDNA synthesis was carried out in a 25µl final volume containing 4µl of RNA extract, 10mM deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 2,5µl 10x RT buffer (50mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 75mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub> and 10mM DTT), 50ng of the random hexamer, 40 U RNasin, 200 U M-MuLV Reverse-Transcriptase RNase H (Vivantis, Germany). The reverse transcription was performed at 37°C for 1 h. Obtained cDNA samples were amplified with redesigned primer set of DPF/DPR which was designed by Tse et al. [25] previously.

**Table 1.** Primers used in the study.

Primer Name	Sequences (5'-3')	References
DPF	GAYTGGACBCGHTWTGATGG	Tse et al. [25]
DPFr	GAYTGGACH <b>MGNTWYGAYGG</b> *	This study
DPR	KYTTRACCCACATNCCAA	Tse et al. [25]

\*Redesigned nucleotides indicated as bold lettering.

The PCR was conducted in a 50µl final volume using 5µl of the RT reaction mixture as a template. The PCR mixture contained 5µl 10x PCR buffer, 10 mM dNTP, 10 pmol/µl of each sense/antisense primer, and 5 U of Taq DNA polymerase (Vivantis, Germany). The PCR was conducted under the following conditions: 1 cycle at 95°C for 2 min and 40 cycles of 94°C for 40 s, (primer melting temperature -5°C) for 30 s, and 72°C for 40 s, followed by a final elongation step of 72°C for 10 min. PCR products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gels stained with ethidium bromide.

**Sequencing and phylogenetic analysis:** The PCR amplicons were purified with a Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI) and sequenced using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) on an automated sequencer (ABI 3100; Applied Biosystems, Foster City, CA). All of the sequenced products were used to obtain phylogenetic data. Partial sequences of nonstructural protein gene

were compared with other *Bovine astrovirus* sequence datas which are online provided by National Center for Biotechnology Information (NCBI). Sequence alignment and phylogenetic analysis based on partial nucleotide sequences of 423 bp Nsp1ab gene was constructed with the use of a software, Unipro UGENE, version 1.21 [16].

## Results

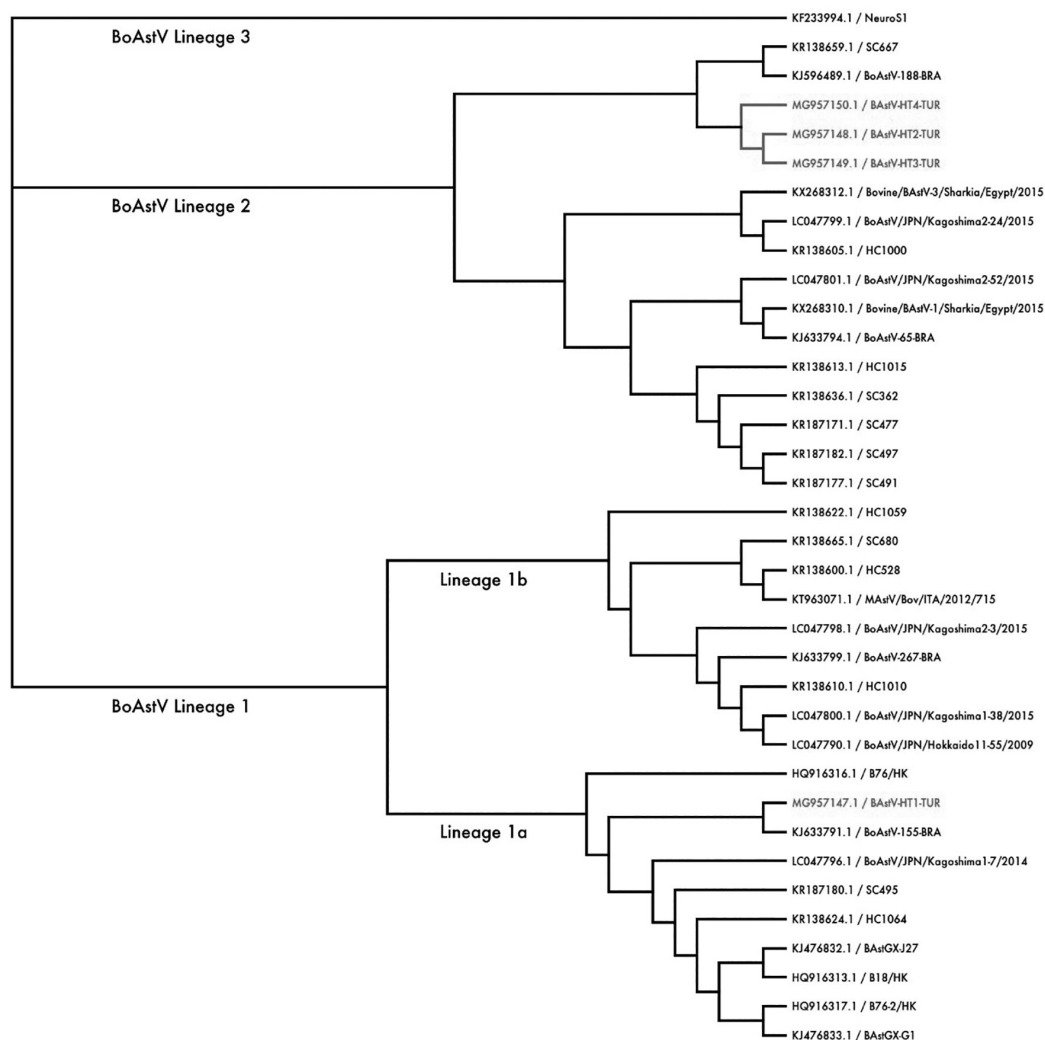
According to molecular detection study based on nonstructural protein gene (Nsp1ab) of *Bovine astrovirus* using DPF/DPR primer set, which was re-

designed for this study, four fecal samples (4/127, 3.15%) found to be positive. Partial sequences corresponding nonstructural protein gene were compared with other *Bovine astrovirus* sequence data which were online provided by National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Table 2) by sequence alignment and phylogenetic analysis. While isolate BAstV/HT-1 was substituted under lineage 1a, BAstV/HT-2, 3 and 4 were substituted under lineage 2. None of novel BoAstV strains found to be related between the NeuroS1 which is a strain that isolated from a bovine with neurological symptoms.

**Table 2.** List of *Bovine astrovirus* sequences used in the molecular studies.

	GenBank Accession No	Strain/Isolate Name	Host	Year of Isolation	Country	Reference
1	KF233994.1	NeuroS1	Bovine	2011	USA	(20)
2	KJ596489.1	BoAstV-188-BRA	Bovine	2012	Brazil	(25)
3	KJ633790.1	BoAstV-43-BRA	Bovine	2007	Brazil	(25)
4	KJ633791.1	BoAstV-155-BRA	Bovine	2009	Brazil	(25)
5	KJ633794.1	BoAstV-65-BRA	Bovine	2007	Brazil	(25)
6	KJ633799.1	BoAstV-267-BRA	Bovine	2010	Brazil	(25)
7	KR187171.1	SC477	Bovine	2012	UK	(24)
8	KR187177.1	SC491	Bovine	2012	UK	(24)
9	KR187180.1	SC495	Bovine	2012	UK	(24)
10	KR187182.1	SC497	Bovine	2012	UK	(24)
11	KR138600.1	HC528	Bovine	2013	UK	(24)
12	KR138605.1	HC1000	Bovine	2013	UK	(24)
13	KR138610.1	HC1010	Bovine	2013	UK	(24)
14	KR138613.1	HC1015	Bovine	2013	UK	(24)
15	KR138622.1	HC1059	Bovine	2013	UK	(24)
16	KR138624.1	HC1064	Bovine	2013	UK	(24)
17	KR138636.1	SC362	Bovine	2012	UK	(24)
18	KR138659.1	SC667	Bovine	2013	UK	(24)
19	KR138665.1	SC680	Bovine	2013	UK	(24)
20	KJ476832.1	BAstGX-J27	Bovine	2013	China	(25)
21	KJ476833.1	BAstGX-G1	Bovine	2013	China	(25)
22	HQ916313.1	B18/HK	Bovine	2010	China	(10)
23	HQ916316.1	B76/HK	Bovine	2010	China	(10)
24	HQ916317.1	B76-2/HK	Bovine	2010	China	(10)
25	LC047790.1	BoAstV/JPN/Hokkaido11-55/2016	Bovine	2009	Japan	(15)
26	LC047796.1	BoAstV/JPN/Kagoshima1-7/2018	Bovine	2014	Japan	(15)
27	LC047798.1	BoAstV/JPN/Kagoshima2-3/2015	Bovine	2015	Japan	(15)

	GenBank Accession No	Strain/Isolate Name	Host	Year of Isolation	Country	Reference
28	LC047799.1	BoAstV/JPN/Kagoshima2-24/2015	Bovine	2015	Japan	(15)
29	LC047800.1	BoAstV/JPN/Kagoshima1-38/2017	Bovine	2015	Japan	(15)
30	LC047801.1	BoAstV/JPN/Kagoshima2-52/2015	Bovine	2015	Japan	(15)
31	KX268310.1	Bovine/BAstV-1/Sharkia/Egypt/2015	Bovine	2015	Egypt	(14)
32	KX268312.1	Bovine/BAstV-3/Sharkia/Egypt/2015	Bovine	2015	Egypt	(14)
33	KT963071.1	MAstV/Bov/ITA/2012/715	Bovine	2012	Italy	Unpublished
34	MG957147.1	BAstV-HT1-TUR	Bovine	2016	Turkey	(This study)
35	MG957148.1	BAstV-HT2-TUR	Bovine	2016	Turkey	(This study)
36	MG957149.1	BAstV-HT3-TUR	Bovine	2016	Turkey	(This study)
37	MG957150.1	BAstV-HT4-TUR	Bovine	2016	Turkey	(This study)



\*Novel strains were illustrated as red color.

**Figure 1.** A phylogenetic bootstrap consensus tree of the partial Nsp1ab gene region of the *Bovine astrovirus* strains was made using the neighbor-joining method by using Unipro UGENE, version 1.21. [16].

Table 3. Sequence similarity chart of the Bovine astrovirus strains used in the study.

1	MG957147.1 / BAstV-H11-TUR	76.8	76.8	75.8	90.4	82.9	81.4	83.3	82.1	79.5	82.7	84.1	77.4	70.9	69.3	72.7	72.2	71.4	71.3	72.7	73.2	77.3	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	79.5	78.2	77.8	79.1	78.0	75.9	76.4	55.2	76.3	75.8		
2	MG957148.1 / BAstV-H12-TUR	76.8	100.0	99.1	74.0	75.4	73.9	74.4	73.8	74.9	76.8	76.4	74.6	68.5	68.7	69.7	70.5	71.1	74.1	70.4	74.5	70.5	88.2	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	89.5	87.7	89.5	88.9	86.7	86.6	55.8	85.4	85.4
3	MG957149.1 / BAstV-H13-TUR	76.8	100.0	99.1	74.0	75.4	73.9	74.4	73.8	74.9	76.8	76.4	74.6	68.5	68.7	69.7	70.5	71.1	74.1	70.4	74.5	70.5	88.2	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	89.5	87.7	89.5	88.9	86.7	86.6	55.8	85.4	85.4
4	MG957150.1 / BAstV-H14-TUR	75.8	99.1	99.1	73.4	74.9	73.5	73.9	73.3	74.9	76.8	76.4	74.6	68.5	68.4	69.2	70.5	71.1	74.1	70.4	74.5	70.5	88.2	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	89.5	87.2	89.5	88.4	86.7	86.1	55.8	84.8	85.1	
5	KJ633791.1 / BoAstV-155-BRA	90.4	74.0	74.0	73.4	82.0	80.5	83.4	81.4	78.7	81.6	82.7	77.8	68.9	69.6	70.7	68.7	71.0	70.4	69.8	72.6	72.6	77.1	79.9	79.9	79.9	79.9	79.9	79.9	78.2	79.9	76.6	81.0	75.4	74.3	73.1	53.9	72.9	74.2	
6	KJ476832.1 / BAstGX-127	82.9	75.4	75.4	74.9	82.0	92.5	88.3	88.4	83.4	84.1	87.3	75.5	69.6	69.0	71.0	69.5	72.2	70.9	71.7	72.3	73.6	75.9	77.3	77.3	77.3	77.3	77.3	77.3	76.8	77.7	76.6	79.1	74.8	74.5	73.0	54.5	72.0	73.6	
7	HQ916313.1 / B18/HK	81.4	73.9	73.9	73.5	80.5	92.5	88.6	87.7	84.7	85.9	88.6	76.1	70.3	69.6	72.2	72.7	73.1	70.0	69.8	72.7	71.8	76.8	78.2	78.2	78.2	78.2	78.2	78.2	78.2	79.5	75.1	74.5	72.2	55.8	73.2	72.8			
8	HQ916317.1 / B76-2/HK	83.3	74.4	74.4	73.9	83.4	88.3	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	
9	KJ476833.1 / BAstGX-G1	82.1	73.8	73.8	73.3	81.4	88.4	87.7	90.8	85.3	83.2	86.4	77.8	69.8	69.6	72.0	69.5	72.7	70.0	71.3	70.5	72.7	76.8	79.1	79.1	79.1	79.1	79.1	79.1	77.7	79.1	77.1	80.5	76.8	74.4	74.2	55.2	73.8	74.7	
10	LC047796.1 / BoAstV/JPN/Kagoshima1-7/2014	79.5	74.9	74.9	74.9	78.7	83.4	84.7	84.5	85.3	83.2	82.7	80.3	69.1	67.8	70.3	70.0	72.2	68.2	70.5	70.0	70.0	75.5	76.8	76.8	76.8	76.8	76.8	76.8	76.8	76.8	75.4	77.3	74.3	75.6	72.7	58.2	74.7	74.7	
11	KRI187180.1 / SC495	82.7	76.8	76.8	76.8	81.6	84.1	85.9	84.1	83.2	83.2	84.5	76.8	68.6	72.0	70.5	70.9	71.4	70.5	70.0	71.8	72.3	74.1	75.9	75.9	75.9	75.9	75.9	75.9	75.5	74.5	75.5	77.7	77.7	75.5	74.1	52.5	76.3	75.3	
12	KRI187180.1 / HC1064	84.1	76.4	76.4	76.4	82.7	87.3	88.6	86.4	82.7	84.5	84.5	76.4	68.2	68.5	71.4	71.8	71.8	70.9	71.8	72.3	70.5	76.8	77.3	77.3	77.3	77.3	77.3	77.3	76.8	78.2	80.9	78.6	78.2	78.2	75.0	54.3	77.4	77.3	
13	HQ916316.1 / B76/HK	77.4	74.6	74.6	74.6	77.8	75.5	76.1	76.1	77.8	80.3	76.8	76.4	72.2	71.8	72.4	72.7	73.3	70.9	73.1	72.7	69.1	71.8	75.9	75.9	75.9	75.9	75.9	75.9	74.5	75.9	77.5	75.8	77.0	75.8	57.1	74.1	75.6		
14	LC047800.1 / BoAstV/JPN/Kagoshima1-38/2015	70.9	68.5	68.5	68.5	68.9	69.6	70.3	69.1	69.8	69.1	68.6	68.2	72.2	89.0	90.7	89.5	87.5	84.1	84.0	83.6	69.5	73.6	69.1	69.1	69.1	69.1	69.1	69.1	68.6	69.5	72.6	70.0	70.3	68.0	67.9	57.3	68.2	70.5	
15	KJ633799.1 / BoAstV-267-BRA	69.3	68.7	68.7	68.4	69.6	69.0	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	
16	LC047790.1 / BoAstV/JPN/Hokkaido11-55/2009	72.7	69.7	69.7	69.2	70.7	71.0	72.2	71.0	72.0	70.3	70.5	71.4	72.4	90.7	89.0	90.5	90.7	85.9	86.5	86.4	70.9	75.0	71.4	71.4	71.4	71.4	71.4	71.4	71.4	70.9	71.4	73.5	71.4	70.0	69.4	71.2	57.1	68.2	72.2
17	KRI187180.1 / HC1010	72.7	70.5	70.5	70.5	68.7	69.5	72.7	69.1	69.5	70.0	70.9	71.8	72.7	89.5	88.7	90.5	90.5	89.1	86.8	85.9	88.2	71.8	74.5	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	69.1	73.2	70.0	71.4	70.5	71.8	51.1	70.6	72.7	
18	LC047798.1 / BoAstV/JPN/Kagoshima2-3/2015	72.2	71.1	71.1	71.1	71.0	72.2	73.1	74.7	72.7	72.2	71.4	71.8	73.3	87.5	89.3	90.7	89.1	88.2	86.3	85.5	81.8	78.2	73.6	73.6	73.6	73.6	73.6	73.6	73.6	74.1	74.5	73.1	75.5	70.8	71.0	69.7	57.6	68.8	71.1
19	KRI187180.1 / HC528	71.4	74.1	74.1	74.1	70.4	70.9	70.0	68.2	70.5	70.9	70.9	84.1	86.3	85.9	86.8	88.2	88.2	85.9	86.3	91.8	91.8	90.0	73.2	78.2	70.9	70.9	70.9	70.9	71.8	75.5	74.5	75.0	73.6	70.9	52.9	73.4	75.3		
20	KT963071.1 / MAstV/Bov/ITA/2012/715	71.3	70.4	70.4	70.4	69.8	71.7	69.8	71.2	71.3	70.5	70.0	71.8	73.1	84.0	84.7	86.5	85.9	86.3	91.8	91.8	90.5	69.5	75.9	71.8	71.8	71.8	71.8	71.8	71.8	72.7	71.9	73.6	71.5	70.1	68.4	58.9	69.3	70.5	
21	KRI187180.1 / SC680	72.7	74.5	74.5	74.5	72.6	72.3	72.7	70.0	70.5	70.0	71.8	72.3	72.7	83.6	83.3	86.4	88.2	85.5	85.5	90.0	90.5	70.9	79.1	72.7	72.7	72.7	72.7	72.7	72.7	71.8	75.9	73.6	76.8	75.0	73.2	51.1	74.0	76.3	
22	KRI187180.1 / HC1059	73.2	70.5	70.5	70.5	72.6	73.6	71.8	71.8	72.7	70.0	72.3	70.5	69.1	69.5	70.8	70.9	71.8	71.8	73.2	69.5	70.9	68.6	70.9	68.6	70.9	70.9	70.9	70.9	70.9	71.4	69.5	72.7	73.6	70.9	69.1	52.5	71.8	70.7	
23	KRI187180.1 / SC667	77.3	88.2	88.2	88.2	77.1	75.9	76.8	75.5	76.8	75.5	74.1	76.8	71.8	73.6	78.0	75.0	74.5	78.2	78.2	75.9	79.1	68.6	70.9	68.6	70.9	70.9	70.9	70.9	71.4	69.5	72.7	73.6	70.9	69.1	52.5	71.8	70.7		
24	KRI187182.1 / SC497	80.0	88.6	88.6	88.6	79.9	77.3	78.2	79.1	79.1	76.8	75.9	77.3	75.9	69.1	75.0	71.4	70.0	73.6	70.9	71.8	72.7	70.9	87.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.6	93.6	90.9	93.2	91.8	90.9	89.1	57.8	91.0	87.4
25	KRI187177.1 / SC491	80.0	88.6	88.6	88.6	79.9	77.3	78.2	79.1	79.1	76.8	75.9	77.3	75.9	69.1	75.0	71.4	70.0	73.6	70.9	71.8	72.7	70.9	87.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.6	93.6	90.9	93.2	91.8	90.9	89.1	57.8	91.0	87.4
26	KRI187171.1 / SC477	80.0	88.6	88.6	88.6	79.9	77.3	78.2	79.1	79.1	76.8	75.9	77.3	75.9	69.1	75.0	71.4	70.0	73.6	70.9	71.8	72.7	70.9	87.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.6	93.6	90.9	93.2	91.8	90.9	89.1	57.8	91.0	87.4
27	KRI187171.1 / SC362	79.5	88.6	88.6	88.6	78.2	76.8	78.2	78.6	77.7	76.4	75.5	76.8	74.5	68.6	75.6	70.9	70.0	74.1	70.9	71.8	71.4	87.7	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
28	KRI187180.1 / HC1015	78.2	89.5	89.5	89.5	79.9	77.7	79.5	78.2	79.1	78.2	74.5	78.2	75.9	69.5	74.4	71.4	69.1	74.5	71.8	72.7	71.8	69.5	87.3	93.6	93.6	93.6	93.6	93.6	93.6	93.6	93.6	93.6	93.6	93.6	93.6	93.6	93.6	93.6	93.6
29	LC047799.1 / BoAstV/JPN/Kagoshima2-24/2015	77.8	87.7	87.7	87.7	87.2	76.6	76.6	76.8	77.5	77.1	75.4	75.5	80.9	77.5	72.6	72.4	73.5	73.2	73.1	75.5	71.9	75.9	72.7	86.8	90.9	90.9	90.9	90.9	90.5	91.8	94.5	91.8	94.1	91.2	94.1	88.9	87.6	55.3	87.5



## Discussion

The study reveals the first detection and phylogenetic analysis of BoAstV from diarrheic calves in Turkey. These fecal samples were previously studied for the presence of *Bovine coronavirus* (BCV), *Bovine rotavirus* (BRV) and *Bovine torovirus* (BToV) (unpublished), *Bovine kobuvirus* (BKV), *Bovine enterovirus* (BEV), *Bovine hungarovirus* (BHuV) (in press), *Bovine norovirus* (BNoV) and *Bovine nebovirus* (BNeV) [26]. On the purpose of both detection and genetic characterization it was selected that 90 kDa non-structural protein, nsp1a, that contains a conserved protease motifs similar to other viral 3C-like proteases. Because of the diverse genetics of astroviruses, it is difficult to design precise detection tool by molecular basis. Multiple alignments of the BoAstV sequences, gathered from GenBank, indicated that it is necessity to check the detection primers by in-silico PCR method before using in a study. Thereby, we redesigned the forward primer of DPF as DPFr reported by Tse et. al., [25]. As a result of RT-PCR study, we found that the 3.15% of fecal samples (4/127) were positive for diarrhea calves from Turkey.

There are several reports on bovine astroviruses from healthy and diarrheic calves and the prevalences vary between 10 to 74 percent according to research papers worldwide. BoAstV were reported as 74% (85/115) from both healthy and diarrheic calves from Scotland [22]. Alfred and coworkers were reported the BoAstV as 46.10% from diarrheic calves of 3 different cattle farm in China in 2013 [1]. In another study reports the detection of BoAstV were 32% from diarrheic calves from 2 cattle farm in Egypt in 2015 [14]. On the other hand, paper published by Nagai et al., [15] reports the astrovirus positivity at 10.27% from calves with and without diarrhea in Japan between 2009 and 2015.

The neighbor-joining tree of the partial Nsp1ab gene (ORF1a) of bovine astroviruses indicated that strains were substituted under three distinct lineage. None of our strains belonged to the Neuro1 lineage (lineage 3) of bovine astroviruses which were isolated from bovine with neurological symptoms. On the other hand, while BAstV-HT1-TUR strain were classified under lineage 1a, the other novel starts were lineage 2 (Figure 1). Similar trees were

illustrated by researchers previously based on both partially or complete sequences of BoAstV [1, 6, 14]. While the identity of analyzed sequences varies from 51.1 to 100%, novel strains were calculated between 75.8 to 100 % (Table 3).

As a result, to state the contribution of BoAstV on calf diarrhea more epidemiological study is needed. Also, definitive determination of bovine AstV as an enteric pathogen, either singly or in combination with another pathogen such as bovine rotavirus group A, would require viral isolation and experimental infections under natural conditions. We report the first detection and phylogenetic analysis of *Bovine astrovirus* from Turkey.

## References

1. Alfred N, Liu H, Li ML, Hong SF, Tang HB, Wei ZZ, Chen Y, Li FK, Zhong YZ, Huang WJ, (2015). Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of diverse bovine astroviruses associated with diarrhea in cattle and water buffalo calves in China. *J Vet Med Sci*, 77, 643–651. DOI:10.1292/jvms.14-0252
2. Atkins A, Wellehan JF Jr, Childress AL, Archer LL, Fraser WA, Citino SB, (2009). Characterization of an outbreak of astroviral diarrhea in a group of cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Vet Microbiol*, 136, 160–165, 2009. DOI:10.1016/j.vetmic.2008.10.035
3. Bartels CJM, Holzhauser M, Jorritsma R, et al (2010) Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Prev Vet Med* 93:162–169. doi: 10.1016/j.prevetmed.2009.09.020
4. Benedictis PD, Schultz-Cherry S, Burnham A, Cattoli G, (2011). Astrovirus infections in humans and animals – Molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect Genet Evol*, 11, 1529–1544. DOI:10.1016/j.meegid.2011.07.024
5. Bridger JC, Hall GA, Brown JF, (1984). Characterization of a calici-like virus (Newbury agent) found in association with astrovirus in bovine diarrhea. *Infect Immun*, 43, 133–138.
6. Candido M, Alencar ALF, Almeida-Queiroz SR, Buzinaro MG, Munin FS, de Godoy SHS, Livonesi MC, Fernandes AM, de Sousa RLM, (2015). Molecular detection and phylogenetic analysis of bovine astrovirus in Brazil. *Arch Virol*, 160, 1519–1525. DOI: 10.1007/s00705-015-2400-8
7. Chen X, Zhang B, Yue H, Wang Y, Zhou F, Zhang Q, Tang C, (2015). A novel astrovirus species in the gut of yaks with diarrhoea in the Qinghai–Tibetan Plateau, 2013. *J Gen Virol*, 96, 3672–3680. DOI:10.1099/jgv.0.000303

8. Cho Y il, Yoon KJ (2014) An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J Vet Sci* 15:1–17. doi: 10.4142/jvs.2014.15.1.1
9. Chu DK, Chin AW, Smith GJ, Chan KH, Guan Y, Peiris JS, Poon LL, (2010). Detection of novel astroviruses in urban brown rats and previously known astroviruses in humans. *J Gen Virol*, 91, 2457–2462. DOI:10.1099/vir.0.022764-0
10. Jonassen CM, Jonassen TO, Saif YM, Snodgrass DR, Ushijima H, Shimizu M, Grinde B, (2001). Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. *J Gen Virol*, 82, 1061–1067. DOI:10.1099/0022-1317-82-5-1061
11. Li L, Diab S, Mc Graw S, Barr B, Traslavina R, Higgins R, Talbot T, Blanchard P, Rimoldi G, Fahsbender E, Page B, Phan TG, Wang C, Deng X, Pesavento P, Delwart E, (2013). Divergent astrovirus associated with neurologic disease in cattle. *Emerging Infect Dis*, 19, 1385-1392. DOI: 10.3201/eid1909.130682
12. Mendez E, Arias CF, (2007). Astroviruses. Knipe DM, Howley PM eds. *Fields virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, p.981-1000.
13. Monroe SS, (2005). Astroviridae. Carter MJ, Herrmann J, Mitchel JK Sanchez-Fauquier A eds. *Virus taxonomy*. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. P.859-864.
14. Mohamed FF, Mansour FMG, El-Araby IE, Mor SK, Goyal SM, (2017). Molecular detection of enteric viruses from diarrheic calves in Egypt. *Arch Virol*, 162, 129–137. DOI: 10.1007/s00705-016-3088-0
15. Nagai M, Omatsu T, Aoki H, Otomaru K, Uto T, Koizumi M, Minami-Fukuda F, Takai H, Murakami T, Masuda T, Yamasato H, Shiokawa M, Tsuchiaka S, Naoi Y, Sano K, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Furuya T, Shirai J, Mizutani T, (2015). Full genome analysis of bovine astrovirus from fecal samples of cattle in Japan: identification of possible interspecies transmission of bovine astrovirus. *Arch Virol*, 160, 2491–2501. DOI: 10.1007/s00705-015-2543-7
16. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, and UGENE Team: Unipro UGENE, (2012). A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28, 1166–1167. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091
17. Pham NTK, Khamrin P, Nguyen TA, et al (2007) Isolation and Molecular Characterization of Aichi Viruses from Fecal Specimens Collected in Japan, Bangladesh, Thailand, and Vietnam. *J Clin Microbiol* 45:2287–2288. doi: 10.1128/JCM.00525-07
18. Reuter G, Boros Á, Pankovics P (2011) Kobuviruses - a comprehensive review. *Rev Med Virol* 21:32–41. doi: 10.1002/rmv.677
19. Rivera R, Nollens HH, Venn-Watson S, Gulland FM, Wellehan JF Jr, (2010). Characterization of phylogenetically diverse astroviruses of marine mammals. *J Gen Virol*, 91, 166–173. DOI:10.1099/vir.0.015222-0
20. Schlotta K, Schulze C, Bilk S, Hanke D, Hoepfer D, Beer M, Hoffmann B, (2016). Detection of a Novel Bovine Astrovirus in a Cow with Encephalitis. *Transbound Emerg Dis*, 63, 253–259. DOI:10.1111/tbed.12493
21. Selimovic-Hamza S, Bouzalas IG, Vandevelde M, Oevermann A, and Seuberlich T, (2016). Detection of astrovirus in historical cases of european sporadic Bovine encephalitis, switzerland 1958–1976. *Front Vet Sci*, 3, 91. DOI:10.3389/fvets.2016.00091
22. Sharp CP, Gregory WF, Mason C, deC Bronsvooort BM, Beard PM, (2015). High prevalence and diversity of bovine astroviruses in the faeces of healthy and diarrhoeic calves in South West Scotland. *Vet Microbiol*, 178, 70–76. DOI:10.1016/j.vetmic.2015.05.002
23. Smits SL, Van LM, Kuiken T, Hammer AS, Simon JH, Osterhaus AD, (2010). Identification and characterization of deer astroviruses. *J Gen Virol*, 91, 2719–2722. DOI: 10.1099/vir.0.024067-0
24. Snodgrass DR, Gray EW, (1977). Detection and transmission of 30 nm virus particles (astroviruses) in faeces of lambs with diarrhoea. *Arch Virol*, 55, 287–291.
25. Tse H, Chan WM, Tsoi HW, Fan RY, Lau CC, Lau SK, Woo PC, Yuen KY, (2011). Rediscovery and genomic characterization of bovine astroviruses. *J Gen Virol* 92, 1888–1898. DOI:10.1099/vir.0.030817-0
26. Turan T, Işidan H, Atasoy MO, İrehan B, (2018). Detection and molecular analysis of bovine enteric norovirus and nebovirus in Turkey. *J Vet Res* 62, 129-135. DOI:10.2478/jvetres-2018-0021
27. Woode GN, Bridger JC, (1978). Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *J Med Microbiol*, 11, 441– 452. DOI: 10.1099/00222615-11-4-441
28. Woode GN, Pohlenz JF, Gourley NE, Fagerland JA, (1984). Astrovirus and Breda virus infections of dome cell epithelium of bovine ileum. *J Clin Microbiol*, 19: 623–630. DOI: 0095-1137/84/050623-08\$02.00/0

## Acute Phase Proteins in *Staphylococcus aureus* Positive Milks

Sena Çenesiz<sup>1</sup>, Hande Gürler<sup>2</sup>, Arzu Fındık<sup>3</sup>, Gülay Çiftci<sup>1</sup>, Ali Ertekin<sup>1</sup>, Metin Çenesiz<sup>4</sup>

Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Departments of <sup>1</sup>Biochemistry, <sup>2</sup>Obstetrics, Gynaecology, <sup>3</sup>Microbiology and <sup>4</sup>Physiology, Samsun, TURKEY

Geliş Tarihi / Received: 04.09.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 13.10.2018

**Abstract:** In this study, acute phase proteins including haptoglobin, serum amyloid A, fibrinogen, albumin and total protein levels were investigated in cows with *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) positive subclinical mastitis. Healthy Jersey cows in lactation constituted the animal materials of the study. CMT test were applied to detect subclinical mastitis. In 21 milk samples collected from cows with subclinical mastitis, *S. aureus* was identified by PCR after bacteriologic isolation. These milk samples formed the study group. Healthy milks in which no bacteriological growth was observed were used as the control group. Elevations in haptoglobin (Hp) and serum amyloid A (SAA) levels in infected milk group compared to control milk group were statistically determined as  $p<0,05$ . Although an increase was observed in fibrinogen (Fb), total protein (TP) and albumin (Alb) levels, the variations were not statistically significant.

In conclusion, in infected milks, total protein elevation is an expected result due to the presence of somatic cell and bacteria. In the present study, an increase was determined in total protein level, but it had no statistical significance. However, a significant increase was determined regarding haptoglobin and serum amyloid A in infected milk samples. This suggests that haptoglobin and serum amyloid A are more sensitive indicators in subclinical mastitis and may be beneficial in clinical practice.

**Keywords:** Acute phase proteins, Cows, Subclinical mastitis and *S. aureus*

### *Staphylococcus aureus* Pozitif Sütlerde Akut Faz Proteinleri

**Özet:** Bu çalışmada, *Staphylococcus aureus* pozitif subklinik mastitisli ineklerde, haptoglobin, serum amiloid A, fibrinojen, albümin ve toplam protein düzeylerini içeren akut faz proteinlerin düzeyleri araştırılmıştır. Laktasyonda Sağlıklı Jersey inekleri çalışmanın hayvan materyallerini oluşturdu. Subklinik mastitisi belirlemek için CMT testi uygulandı. Subklinik mastitisli ineklerden toplanan 21 süt örneğinde, *S. aureus* bakteriyolojik izolasyondan sonra PCR ile tanımlandı. Bu süt örnekleri çalışma grubunu oluşturdu. Kontrol grubu olarak bakteriyolojik büyümenin gözlenmediği sağlıklı sütler kullanıldı. Enfekte olmuş süt grubunda haptoglobin (Hp) ve serum amiloid A (SAA) düzeylerindeki artışlar kontrol sütüne göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,05$ ). Fibrinojen (Fb), total protein (TP) ve albümin (Alb) düzeylerinde artış gözlenmesine rağmen, istatistiksel olarak bu artışın anlamlı olmadığı belirlendi. Bu sonuçlar, haptoglobulin ve serum amiloid A düzeyinin subklinik mastitisin belirlenmesinde daha duyarlı belirleyiciler olduğu ve klinik uygulamada yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Akut faz proteinleri, İnek, Subklinik mastitis ve *S. aureus*

## Introduction

Mastitis is an inflammatory response against physiological and metabolic changes in mammary tissues, trauma and microorganisms [4]. The disease decreases milk yield and changes milk composition [22]. Subclinical mastitis is more significant due to its prevalence and economic losses because of the decrease in milk yield compared to clinical mastitis [13]. In subclinical mastitis no visible inflammation in the tits or changes in the milk are present, but milk yield and quality decreases [27]. *Staphylococci* are the most prevalent pathogens in subclinical and clinical mastitis and *S. aureus* is in the first rank

among *Staphylococcus* spp. [19]. *S. aureus* decreases the milk yield and damages mammary tissue in milk cows, thus it prevents reaching potentially maximum milk level. In addition, this microorganism has a rapid adaptation feature against mastitis control programs and environmental changes [18].

The biochemical, hormonal, physiological and immunological responses of the organism against stimulants such as infection, burns, trauma and neoplasms in case of maintaining homeostasis is named as acute phase response (APR) [35]. Acute phase proteins are (APP) synthesized by the liver as a reaction to acute phase response. In healthy animals,

these proteins are present in insignificant levels, but they rapidly increase during inflammation and plays role as an inflammation indicator. APP which is the specific indicator of tissue damage is gradually more widely used in veterinary medicine for the diagnosis, differential diagnosis, determination of prognosis, determination of therapeutic efficiency and herd therapy control [6,8,17,31]. Albumin (Alb) is accepted as the negative acute phase protein due to its small amount of synthesis during acute phase response where haptoglobin (Hp), serum amyloid A (SAA) and fibrinogen (Fb) are the positive acute phase proteins due to their increased synthesis. Because some APP is specific to species, its diagnostic importance varies according to animal species. Hp, SAA, Fb and Alb have high sensitivity in cows and are important acute phase proteins used during the course of inflammatory diseases [16,17,26,]. Eckersall [10] have reported that APP is also synthesized in mammary glands in addition to liver. This suggests that APP may be beneficial in the identification of mastitis.

The diagnosis of mastitis is performed by the clinical, chemical, physical, cellular and bacteriological examinations of the udder and milk. Absence of changes in clinical examination at milk and udder in subclinical mastitis requires the usage of specific diagnostic methods. In this study, benefits of APP in the diagnosis, identification, determination of therapy and therapeutic efficiency of subclinical mastitis was aimed.

## Materials and Methods

### Milk samples

Materials of the study included 21 milk samples from clinically healthy *Jersey* cows in lactation, aged between 2-10 years housed in a private farm in Samsun region.

This study was approved by the Ondokuz Mayıs University Ethics Committee. Animals in which no clinical findings were observed in nipple examinations were evaluated with respect to subclinical mastitis. For this purpose, California mastitis test (CMT) and electrical conductivity measurement by a portable electrical conductivity meter were applied to milk samples obtained from each animal

just before milking. Data about electrical conductivity were recorded and approximately 20 ml of milk found CMT positive were sampled aseptically from each teat and then transferred to the laboratory under cold chain. CMT negative milks of the healthy cows were used as the control group.

### Bacterial identification

Milk samples transferred to the laboratory under cold chain were inoculated onto 5% sheep blood agar following vortexing and homogenization. Petri dishes were incubated at 37°C for 24-48 hours. After incubation period, *S. aureus* suspected colonies were identified morphologically, microscopically and biochemically [32]. PCR from culture was performed for the confirmation of the identification. Protocol done by Abd El-Razik et al. [2] was used for identification by PCR following DNA extraction. Mastitic milk samples from which were isolated *S. aureus* were included in the study to be examined for other specifications.

### Determination of acute phase proteins

All milk samples were placed in tubes and centrifuged (1550 g, 10 min, +4 °C). Milk samples were defatted before use. The separated serum samples were then stored at -80 °C until analyzed. Acute phase proteins were determined and evaluated in mastitis (*S. aureus*) positive and control animals. Milk serum concentration of Hp was measured according to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) procedure by a commercially available ELISA kit (Tridelta Development Ltd., Ireland). SAA was measured by a solid-phase sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) by a commercially available ELISA kit (Phase SAA kit, Tridelta Ltd., Ireland). Milk serum concentrations of Fb detected by a commercially available kit (Cusabio Biotech Co., Ltd., China). A Digital and Analogue Systems (Italy) ELISA microplate reader (digital and analog systems Roma, Italy) was used.

Milk serum concentrations of total protein and albumin were analyzed using a commercially available kit (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Eschenstraße 5, 82024 Taufkirchen, Germany) according to the autoanalyser manufacturer's instruction (Autolab, AMS Srl, Selective Access).

## Statistical Evaluation

One Way Anova test for two independent samples was used for statistical comparison between experiment and control groups.

## Results

Acute phase protein values of *S. aureus* positive milk samples evaluated for subclinical mastitis and the control groups were shown in Table 1 and 2.

**Table 1.** The comparison of mean  $\pm$  SD results for milk Haptoglobin (Hp), serum amyloid A (SAA), fibrinogen (Fb), Total Protein (TP) and Albumin (Alb) levels in control and *S.aureus* positive milk samples.

	Control milk	<i>S.aureus</i> (+)milk	P
Hp( $\mu$ g/ml)	0.32 $\pm$ 0.01	0.87 $\pm$ 0.59	0.001
SAA( $\mu$ g/ml)	31.81 $\pm$ 19.69	122.24 $\pm$ 81.92	0.049
Fb( $\mu$ g/ml)	6.65 $\pm$ 0.11	12.71 $\pm$ 1.97	0.066
TP(g/dl)	27.33 $\pm$ 3.09	46.83 $\pm$ 10.24	0.135
Alb(g/dl)	2.00 $\pm$ 0.46	3.24 $\pm$ 0.65	0.416

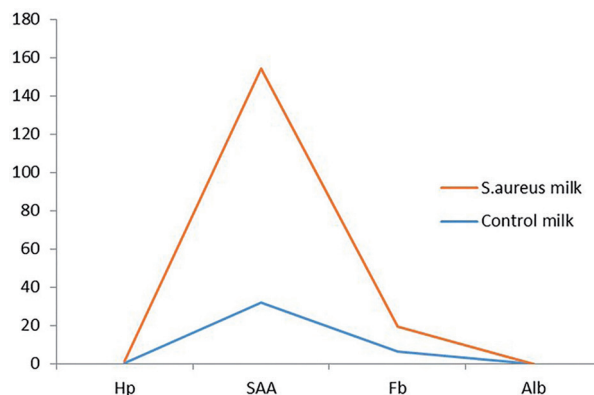
**Table 2.** Haptoglobin (Hp), serum amyloid A (SAA), fibrinogen (Fb), Total Protein (TP) and Albumin (Alb) levels in milk the correlation between values

	Hp	SAA	Fb	TP	Alb
Hp	1	0.046	0.304	0.411*	0.536**
SAA		1	0.358	0.249	0.004
Fb			1	0.685**	0.675**
TP				1	0.628**
Alb					1

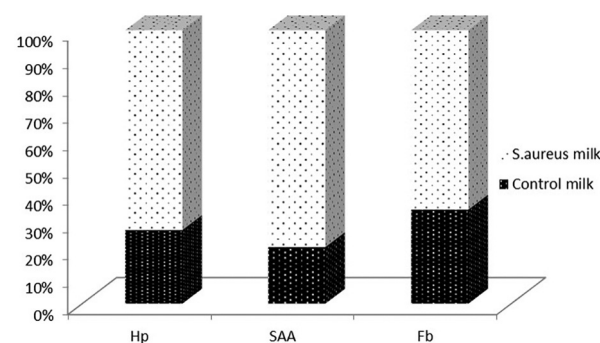
\*P<0.05 \*\*P<0.01

Acute phase protein values of the control group and *S. aureus* positive group were determined as 0.33  $\mu$ g/ml and 2.41  $\mu$ g/ml for Hp, 55.65  $\mu$ g/ml and 292.87  $\mu$ g/ml for SAA, 6.65  $\mu$ g/ml and 13  $\mu$ g/ml for Fb, 26.60 g/dl and 48 g/dl for TP, 2 g/dl and 3.30 g/dl for Alb, respectively (Figure 1 and 2).

Elevation in Hp and SAA levels in infected milk group compared to control milk group was calculated as p<0.05 statistically. Elevations in Fb, TP and Alb were not statistically significant.



**Figure 1.** Haptoglobin (Hp), serum amyloid A (SAA), fibrinogen (Fb) and Albumin (Alb) levels in control and *S.aureus* positive milk samples.



**Figure 2.** Percentage distribution of milk Haptoglobin (Hp), serum amyloid A (SAA), fibrinogen (Fb), levels among groups.

## Discussion

Mastitis as a major factor effecting milk yield causes serious economic losses. Inflammatory signs and differentiation in milk are examined in clinical mastitis. Lack of these signs and visible variations in milk and teats causes a longer period of mastitis and this yields increased economic losses [12, 13, 37]. Therefore, the development of new strategies to prevent or treat mastitis should remain a priority among animal health initiatives [12]. Efforts in research have been directed for searching a biomarker of subclinical mastitis, not only to identify affected animals but also to evaluate and to prevent alterations in milk quality [24]. More prevalent bacterial agent was reported as *S. aureus* in bovine subclinical mastitis [34]. In this study, *S. aureus* positive milks were preferred to investigate acute phase protein levels.

Haemolysins are cytotoxic agents that damage and/or destroy cells of the defense system. Alpha-haemolysin ( $\alpha$ -toxin), frequently produced by bovine *S. aureus* IMI (Intra mammary infection) isolates, is toxic to bovine mammary cells [1, 3, 5]. When tissue is affected by microorganisms, first the pro-inflammatory cytokines are secreted. Especially Interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) provides APP secretion in liver as the mediator and yields an elevation of these proteins in blood [26, 30]. Both SAA and Hp are among the major positive APPs in cattle and can increase several-fold from baseline levels after tissue injury [26, 31]. However, APPs such as SAA and Hp also were synthesized and secreted by the mammary tissue nearby liver [10, 20, 25].

Nazifi et al. [28] have determined an increase at Hp and SAA levels in cattle with clinical and subclinical mastitis compared to the control groups, but also they have reported that the increase in clinical mastitis was superior to that of subclinical mastitis. Colla et al. [7] similarly have reported an increase in Hp and Fb levels in cattle with subclinical mastitis and have stated that this may be an indicator in the early diagnosis of subclinical mastitis. Few previous studies have indicated that Hp and SAA may be used in the diagnosis of clinical mastitis in cattle [9, 15, 21, 29]. The present study revealed similar results for Hp and SAA elevation with other studies. Tabrizi et al. [36] and Colla et al. [7] have found higher fibrinogen levels in cows with both clinical and subclinical mastitis regarding to healthy milks and have suggested that this may be beneficial in the diagnosis of mastitis. However, no elevation was observed in fibrinogen levels in the present study.

Albumin is accepted as negative acute phase protein due to its less synthesis by liver during acute phase response [17]. However, albumin is synthesized in mammary tissues and in mastitic milks, 3.5 fold albumin increase was reported compared to healthy milks. Normally albumin is accepted as a negative acute phase protein, but in case of mastitis an elevation may be observed [33]. In the present study, no statistically significant increase was recorded.

Plasma proteins are mainly synthesized by the liver. Analysis of total protein concentrations and percentage of protein fractions are important in var-

ious disease states [23]. Milk protein content was higher in mastitic cow milks, probably due to the high amount of somatic cells and bacteria [14]. Besides, increase in bacteria and somatic cells nearby Alb, suggests an increase in total protein levels and parameters such as SAA and HP. In our study, an increase was observed in total protein, but was not statistically significant.

In conclusion, in mastitic milks, an increase was expected in total protein due to the increase of bacteria, somatic cell, Fb, SAA, Hp and Alb levels. In our study, increase in total protein was observed which did not have a statistical value. Similarly, an increase was expected in albumin, which is normally accepted as a negative acute phase protein due to its synthesis in the mammary tissue, but no statistically significant increase was observed. Similar situation was also valid for Fb, which was previously reported to increase. However, a statistical elevation was observed in only milk Hp and SAA among acute phase proteins. This suggests that these two parameters, Hp and SAA levels are more sensitive indicators in mastitis and in clinical practice and may have a diagnostic value for subclinical mastitis.

## References

1. Aarestrup FM, Larsen HD, Eriksen NH, Elsberg CS, Jensen NE, (1999). *Frequency of alpha- and beta-haemolysin in Staphylococcus aureus of bovine and human origin. A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression.* APMIS. 107, 425–430.
2. Abd El-razik A, Abdelrahman KA, Ahmed YF, Gomaa AM, Eldebaky HA, (2010). *Direct identification of major pathogens of the bubaline subclinical mastitis in Egypt using PCR.* J Amer Sci. 6, 652–660.
3. Akineden O, Annemuller C, Hassan AA, Lammler C, Wolter W, Zschöch M, (2001). *Toxin genes and other characteristics of Staphylococcus aureus isolates from milk of cows with mastitis.* Clin Diagn Lab Immunol. 8, 959–964.
4. Albenzio M, Taibi L, Muscio A, Sevi A, (2002). *Prevalence and etiology of subclinical mastitis in intensively managed flocks and related changes in the yield and quality of ewe milk.* Small Rumin Res. 43, 219–226.
5. Bramley AJ, Patel AH, Reilly MO, Foster R, Foster TJ, (1989). *Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of Staphylococcus aureus for the mouse mammary gland.* Infect Immun. 57, 2489–2494.
6. Ceron JJ, Eckersal PD, Martinez-subiela S, (2005). *Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspective.* Vet Clin Pathol. 34, 85-99.

7. Colla MF, Valle SF, Secchi P, Duda N, Scaloni M, Durr JW, Hilario F, González D, (2011). *Plasma haptoglobin values in cows with different somatic cell counting in milk samples*. Acta Sci Vet. 39, 944.
8. Eckersall PD, (2000). *Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals*. Rev Med Vet. 151, 577-584.
9. Eckersall PD, Young FJ, McComb C, Hogarth CJ, Safi S, Weber A, McDonald T, Nolan AM, Fitzpatrick JL, (2001). *Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis*. Vet Rec. 148, 35-41.
10. Eckersall PD, Young FJ, Nolan AM, Knight CH, McComb C, Waterston MM, Hogarth CJ, Scott EM, Fitzpatrick JL, (2006). *Acute phase proteins in bovine milk in an experimental model of Staphylococcus aureus subclinical mastitis*. J Dairy Sci. 89, 1488-1501.
11. El-deeb WM, (2013). *Clinicobiochemical investigations of gangrenous mastitis in does: immunological responses and oxidative stress biomarker*. J Zhejiang Univ Sci B. 14, 33-39.
12. Fabres-Klein MH, Klein RC, De Paula SO, Ribon AOB, (2013). *Immunorelevant proteins for the diagnosis of bovine staphylococcal mastitis*. World J Microbiol Biotechnol. 29, 1155-1160.
13. Getaneh AM, Mekonnen SA, Hogeveen H, (2017). *Stochastic bio-economic modeling of mastitis in Ethiopian dairy farms*. Prev Vet Med. 138, 94-103.
14. Gill R, Howard WH, Leslie KE, Lissemore K, (1990). *Economics of mastitis control*. J Dairy Sci. 73, 3340-3348.
15. Gronlund U, Hulten C, Eckersall PD, Hogarth C, Waller KP, (2003). *Haptoglobin and serum amyloid A in milk and serum during acute and chronic experimentally induced Staphylococcus aureus mastitis*. J Dairy Res. 70, 379-386.
16. Gruys E, Obwolo MJ, Toussaint M, (1994). *Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: A Review*. Vet Bull. 64, 1009-1018.
17. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ, (2005). *Acute phase reaction and acute phase proteins*. J Zhejiang Univ Sci B 11, 1045-1056.
18. Guidry A, Fattom A, Atul P, Oöbrien C, Shepherd S, Lohuis J, (1998). *Serotyping scheme for Staphylococcus aureus isolated from cows with mastitis*. Am J Vet Res. 59, 1537-1539.
19. Hadimli HH, Ates M, Guler L, Kav K, Oncel T, (2001). *Some virulence factors and antibiotic sensitivity of Staphylococcal strains isolated from cows with subclinical mastitis*. Vet Bil Derg. 17, 21-25.
20. Hiss S, Mielenz M, Bruckmaier RM, Sauerwein H, (2004). *Haptoglobin concentrations in blood and milk after endotoxin challenge and quantification of mammary Hp mRNA expression*. J Dairy Sci. 87, 3778-3784.
21. Hiss S, Mueller U, Neu-zahren A, Sauerwein H, (2007). *Haptoglobin and lactate dehydrogenase measurements in milk for the identification of subclinically diseased udder quarters*. Vet Med. 52, 245-252.
22. Janzen JJ, (1970). *Economic losses resulting from mastitis. A review*. J Dairy Sci. 53, 1151-1161.
23. Kaneko JJ, John W, Bruss HM, (2008). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* Gulf Academic press, sixth edition.
24. Korhonen H, Kaartinen L, (1995). *Changes in the composition of milk induced by mastitis*. In: Sandholm M., Honkanen- Buzalski T., Kaartinen L. & Pyörala S. (Eds). *The bovine udder and mastitis*. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino, 76-82.
25. McDonald LT, Larson MA, Mack DR, Weber A, (2001). *Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum*. Vet Immunol Immunopathol. 83, 203-211.
26. Murata H, Shimada N, Yoshioka M, (2004). *Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview*. Vet J. 168, 28-40.
27. Mutluer D, Hatipoğlu FŞ, Türütoğlu H, Özmen Ö, Oğuz N, Ata A, Alçi S, Köker A, Karakurum Ç, (2001). *Mastitis oluşumu, tanısı ve sağaltımı*. Süt İnekçiliğinde Mastitis Sempozyum Kitabı., 04-05 Mayıs, Akdeniz Üniversitesi, 27-38.
28. Nazifi S, Haghkhah M, Asadi Z, Ansari-lari M, Tabandeh MR, Esmailnezhad Z, Aghamiri M, (2011). *Evaluation of sialic acid and acute phase proteins (haptoglobin and serum amyloid A) in clinical and subclinical bovine mastitis*. Pakistan Vet J. 31, 55-59.
29. Nielsen BH, Jacobsen S, Andersen PH, Niewold TA, Heegaard PMH, (2004). *Acute phase protein concentrations in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions*. Vet Rec. 15, 361-365.
30. Nukina H, Sudo N, Aiba Y, Oyama N, Koga Y, Kubo C, (2001). *Restraint stress elevates the plasma interleukin-6 levels in germ-free mice*. J Neuroimmunol. 115, 46-52.
31. Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH, (2004). *Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry*. Vet Res. 35, 163-187.
32. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR, (1994). *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby: U.K.
33. Shamay A, Homans R, Fuerman Y, Levin I, Barash H, Silanikove N, Mabeesh SJ, (2005). *Expression of Albumin in Nonhepatic Tissues and its Synthesis by the Bovine Mammary Gland*. J Dairy Sci. 88, 69-76.
34. Shitandi A, Kihumbu G, (2004). *Assessment of the California mastitis test usage in small holder dairy herds and risk of violative antimicrobial residues*. J Vet Sci. 5, 5-9.
35. Steel DM, Whithead AS, (1994). *The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein*. Immunol Today. 15, 81-88.
36. Tabrizi AD, Batavani RA, Rezaei SA, Ahmadi M. (2008). *Fibrinogen and ceruloplasmin in plasma and milk from dairy cows with subclinical and clinical mastitis*. Pakistan J Biol Sci. 11, 571-576.
37. Tel OY, Keskin O, Zonturlu AK, Arserim Kaya NB, (2009). *Subclinical mastitis prevalence and determination of the antibiotics susceptibility in Sanliurfa region*. Firat Üniv Sağıl Bil Vet Derg. 23, 101-106.

## Türkiye’de Kronik İshalli Kedilerde *Tritrichomonas foetus*’ün Araştırılması ve Risk Faktörlerinin Belirlenmesi

Didem Pekmezci<sup>1</sup>, Gökmen Zafer Pekmezci<sup>2</sup>, Ümit Özcan<sup>1</sup>, Duygu Dalğın<sup>1</sup>, Mehmet Tütüncü<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

<sup>2</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Klinik Öncesi Bölümler, Samsun, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 15.05.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 26.09.2018

**Özet:** Bu çalışma ile Türkiye’de ilk kez evcil kedilerin kalın bağırsak ishallerinde *Tritrichomonas foetus*’ün etiyolojik ajan olarak rol oynayıp-oynamadığının moleküler teknikler ile araştırılıp enfeksiyonun risk faktörlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Kliniklerine kronik ishal şikâyeti ile getirilen farklı ırk, yaş, cinsiyet, beslenme ve yaşama koşullarına sahip 50 kedi ile Samsun Büyükşehir Belediyesi Güçten Düşmüş Hayvan Bakım Evi’nden 50 adet kronik ishallerine ait dışkı örnekleri bireysel olarak toplanmıştır. Toplanan 100 dışkı örneğinden genomik DNA ekstraksiyonu yapılmış ve sonrasında parazitin varlığının araştırılmasında cysteine protease 2 (CP-2) ve internal transcribed spacer (ITS) geninin invitro koşullarda amplifikasyonu için PCR metodu kullanılmıştır. Araştırma sonucunda kronik ishallerine ait olan 100 dışkı örneğinde *T. foetus* pozitifliğı saptanmamıştır. Bu araştırma ile ülkemizdeki kronik ishallerine ilk kez moleküler olarak *T. foetus*’ün varlığı araştırılmıştır.

Kronik ishallerine parazite rastlanılmamasının en önemli nedeni kedilerin yaşam alanlarının parazitin kaynağı olduğu bilinen sığırların yaşam alanlarına yakın olmaması ile açıklanabilir. Mevcut araştırmanın ortaya koyduğu sonuçlar sonraki çalışmalara ışık tutması yönünden önem arz etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Kedi, Risk faktörleri, PZR, *Tritrichomonas foetus*, Türkiye

### Investigation of *Tritrichomonas fetus* in Cats with Chronic Diarrhea and Determination of Risk Factors in Turkey

**Abstract:** It was aimed to investigate whether *T. foetus* infections play roles as the etiological agents associated with large bowel diarrhea in cats with molecular techniques for the first time in Turkey, and to determinate the risk factors within this present project. Fifty stool samples collected from the different breed, sex, ages, feeding routes and environmental conditions of cats which presented to the Veterinary Faculty, Internal Medicine Clinics suffered from chronic diarrhea. Same as 50 stool samples collected from the different breed, sex, ages, feeding routes and environmental conditions of cats stayed in the Samsun Metropolitan Municipality’s Incapacitated Orphaned Animal Care Centre. After the genomic DNA extraction of the collected 100 stool samples, PCR used for the in vitro amplification of the cysteine protease 2 (CP-2) and internal transcribed spacer (ITS) genes for the detection of the parasite. Based on the research result none of the 100 stool samples were detected as *T. foetus* positive.

Within the presented study, existence of the *T. foetus* in the cats having chronic diarrhea was investigated molecularly for the first time in Turkey. The main reason for the absence of the parasite in this study may be explained by the living environment of the cats which have any connection of the main source of parasite known as cattle. By this way outcome of the present study with specialties has importance that lead new lights to further studies.

**Key words:** Cat, Risk factors, PCR, *Tritrichomonas foetus*, Turkey

### Giriş

*Tritrichomonas foetus* sığırların yaygın olarak reproduktif hastalığına neden olan kamçılı bir protozoan parazit olarak bilinmektedir [25]. Yakın zamanda kedi hastalıklarında rol almaya başlayan yeni bir patojen olarak tanımlanmış ve kedilerde ileum, sekum ve kolonda kolonileşerek kronik kalın

barsak ishallerine neden olduğu ortaya konulmuştur [8, 32]. Enfekte olan kedilerin dışkıları kötü kokulu, sıvıdan katıya değışen kıvamda ve bazen kanla beraber mukus içerebilmektedir [8]. *Tritrichomonas foetus* Kuzey Amerika, Avrupa, Asya ve Okyanusya’da tespit edilmiş ve sonuçta pandemik olarak tanımlanmıştır [1, 3, 4, 6, 8, 12, 14, 17, 18, 20-23, 31]. Enfekte kedilerin çoğunluğunu barınak ve kedi ye-



tiştiriciliği yapan işletmeler gibi kedi yoğunluğunun fazla olduğu yerler oluşturmaktadır [11]. Çevresel stres ve immunolojik olgunluğa ulaşmamış genç kedilerin parazite maruz kalma durumları ve hassasiyetleri artmaktadır [8].

*Tritrichomonas foetus* immün sistemi baskılanmış insanlarda nadiren klinik belirtilerini göstermesi ve biyolojisi bakımından ilgi çekici bir konudur [32]. Esasen dünya genelinde birçok coğrafi bölgede sığırlar arasında çiftleşmeyle bulaşan, sığırların ürogenital sistemine yerleşerek henüz kabul edilmiş etkin bir tedavisi olmayan ve sığır tritrichomonozise neden olan bir parazittir [33]. *Tritrichomonas foetus*'ün kedilerde (kedi izolatları) kronik barsak ishallerine [8, 19] neden olduğu 2000'li yıllarda rapor edilmeye başlansa da ilk olarak 1928 yılında ishalli kedi yavrularında tespit edilmiştir [16]. *Tritrichomonas foetus*'ün Türkiye hariç birçok coğrafi bölgedeki evcil kedilerde varlığı bilinmektedir. Etken kedilerde Avrupa (Avusturya, Finlandiya, Fransa, Almanya, Yunanistan, İtalya, Norveç, Polonya, İspanya, İsviçre, İsveç ve İngiltere), Kuzey Amerika (Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD)), Avustralya/Okyanusya (Avustralya ve Yeni Zelanda) ve Asya (Japonya ve Kuzey Kore) kıtalarında rapor edilmiştir [34].

Bununla birlikte evcil kedilerin gastrointestinal kanalında bulunan kedi izolatları ile sığırların ürogenital kanalında bulunan sığır izolatlarının birbirlerinden morfolojik olarak ayırt edilemediği bilinmektedir. Ayrıca kedi ve sığır izolatlarının 11 gen lokusuna ait DNA sekans analizleri sonucunda iki izolata çok yüksek oranlarda homolog oldukları tespit edilmiştir [26-28, 30]. Kedilerde enfeksiyonun risk faktörlerinin ortaya konulmasında kedilerin yaş ve ırkları ile ishal geçmişleri, bakım ve beslenme koşulları ile evde farklı bir evcil hayvanın (köpek) varlığı gibi faktörler dikkate alınmaktadır [7, 9, 10, 12, 15, 18, 24, 34].

Ülkemizde daha önce kedilerde kronik ishale neden olduğu bilinen *T. foetus*'ün varlığı araştırılmamıştır. Bu araştırma ile Türkiye'de ilk kez evcil kedilerin kalın bağırsak ishallerinde *T. foetus*'ün etiyolojik bir ajan olarak rol oynayıp-oynamadığının moleküler olarak araştırılması ve enfeksiyonun risk faktörlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

### Dışkı örneklerinin toplanması

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Kliniklerine kronik ishal şikâyeti ile getirilen farklı ırk ve yaştaki 50 kedi ile Samsun Büyükşehir Belediyesi Güçten Düşmüş Hayvan Bakım Evi'nden 50 adet kronik ishalli kediye ait dışkı örnekleri toplanmıştır. Dışkı örnekleri tek tek dışkı toplama kaplarına konulmuş ve DNA ekstraksiyonu yapılmaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

### *Tritrichomonas foetus* izolatlarının moleküler identifikasyonu

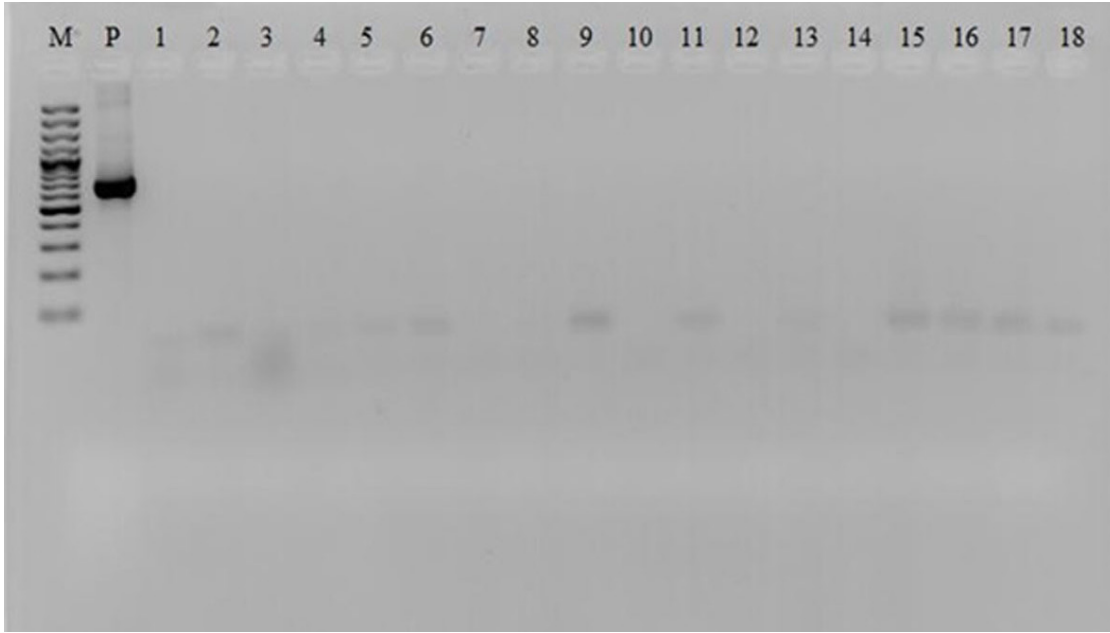
Toplanan 100 dışkı örneğinden genomik DNA (gDNA) ekstraksiyonu DNA dışkı izolasyon kiti (i-genomic Stool DNA Extraction Mini Kit, Intron Biotechnology) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Genomik DNA ekstraktları PCR analizlerinde kullanılmaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Dışkı örneklerinde *T. foetus* DNA'sının araştırılmasında cysteine protease 2 (CP-2) ve internal transcribed spacer (ITS) geninin amplifikasyonu için PCR metodu kullanılmıştır. Parazitin CP-2 gen bölgesinin çoğaltılması için S0295 (CGAAAGGTCACGGATACACA) ve S0296 (CCCCATGAGTTTCTCACGAT) ile ITS rDNA gen bölgesi için TFR3 (CGGGTC TTCCTATATGAGACAGAACC) ve TFR4 (CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTTAA-3') primerleri kullanılmıştır [28]. Araştırmada ticari bir firmaya sentez ettirilen *T. foetus*'a ait gen fragmenti PCR analizlerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Her iki gen bölgesinin PCR analizlerinde son hacim 50 µl olacak şekilde 1X PCR master mix (Thermo Scientific), 0,25 µM primer seti ve 10 µl örnek gDNA'sı konularak karışım hazırlanmıştır. Karışım thermal cycle cihazına yerleştirilmiş ve amplifikasyon koşulları 95°C'de 5 dk denetürasyon, 35 siklus olmak üzere 95 C'de 15 s, 55 C (primer Tm'sine göre ayarlanmış) 15 s, 72°C'de 30 s ve son uzama için 72 C'de 5 dk olacak şekilde ayarlanmıştır [28]. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri etidyum bromid ile boyanmış % 2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuştur. Elektroforez sonrası agaroz jel transilluminatör cihazının

üzerine konulmuş ve ultraviyole ışık altında pozitif kontrole ve örneklerle ait olan DNA bandları görülmüştür.

## Bulgular

Çalışmada toplam 100 adet kedi dışkısında parazitin CP-2 ve ITS gen bölgelerinin PCR analizlerinde *T. foetus* DNA'sı tespit edilememiştir. Sadece pozitif kontrol olarak kullanılan sentetik gen fragmanının PCR analizlerinde pozitif bant elde edilmiştir (Şekil 1).



**Şekil 1.** DNA ekstraksiyonu yapılan 1-29 no'lu dışkı örneklerinin CP-2 gen bölgesinin PCR sonuçları. M: DNA merdiveni, P: pozitif kontrol.

## Tartışma

*Tritrichomonas foetus* Türkiye hariç birçok coğrafik bölgedeki evcil kedilerde tespit edilmiştir. Etken kedilerde Avrupa (Avusturya, Finlandiya, Fransa, Almanya, Yunanistan, İtalya, Norveç, Polonya, İspanya, İsviçre, İsveç ve İngiltere), Kuzey Amerika [Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD)], Avustralya/Okyanusya (Avusturalya ve Yeni Zelanda) ve Asya (Japonya ve Kuzey Kore) kıtalarında rapor edilmiştir [34]. Bazı bölgelerde sadece vaka raporları bildirilmiş olup, diğer çalışmalar ise epidemiyolojik saha veri araştırmalarıdır. Saha veri çalışmalarını ishalleri kediler, şov kedileri, barınak kedileri ile Veteriner kliniklere getirilen kediler oluşturmaktadır. Dünya genelinde coğrafik dağılımına bakılacak olursa parazitin en çok Yeni Zelanda başta olmak üzere Avustralya ve Kuzey Amerika ülkelerinde yüksek oranlarda, Batı Avrupa ülkelerinde

de ise daha düşük oranlarda görüldüğü tespit edilmiştir [34]. Avustralya, Amerika Birleşik Devletleri ve Yeni Zelanda gibi ülkelerdeki kedilerde *T. foetus* prevalansının yüksek olmasına rağmen bu ülkelerdeki kedi barınaklarından alınan örneklerde pozitiflik oranları oldukça düşük bulunmuştur [34]. Bizim araştırmamızla benzer şekilde Avustralya'da yapılan bir araştırmada ev kedileri, kedi yetiştiriciliği ve barınak kedilerinden toplanan 134 dışkı örneğinde parazitin varlığı PCR ile araştırılmış ve kedilerde pozitiflik tespit edilememiştir [2]. Ama ABD'de gösteri kedilerinden toplanan 117 dışkı örneğinde % 31 oranında [9], İtalya'da ise 74 kedide % 32 oranında *T. foetus* pozitifliği tespit edilmiştir [14].

Kedi trichomoniazisi ile ilgili yapılan çalışmalarının çok büyük bir kısmında parazitin görülme sıklığındaki predispoze faktörlerinin arasında en önemli sebebinin kedilerin genç pedigree kedileri

olması gösterilmektedir [1, 5, 8, 29]. Bell ve ark., [1] enfekte kedilerin % 92'sinin saf ırk olduğunu ve kedilerin büyük bir çoğunluğunun 1 yaşın altında olduğunu vurgulamışlardır [1]. Saf ırklarda enfeksiyon görülme sıklığının genetik olarak ırka dayalı bir immun sistem farklılığından olmadığı ve bu durumun çok sayıda kedinin küçük alanlarda birlikte barındırılması ile parazitin bulaşma dinamikleriyle ilgili olduğu ifade edilmektedir [8, 9, 14].

Moleküler çalışmalarda kedi ve sığır izolatlarının çok yüksek oranlarda homolog oldukları ve izolatların sığırlar ve kediler arasındaki bulaşma sağladıkları ifade edilmektedir [26-28, 30]. Bu durumla ilgili olarak Bisset ve ark., [2] kedilerde pozitiflik tespit edilememesinin önemli bir nedeninin İtalya'nın genelinde sığırlarda *T. foetus* enfeksiyonlarının suni tohumlama uygulamalarının yaygınlaşmasından ötürü gerçek eliminasyonundan kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Bu noktada İtalya'daki benzer sonuçlar mevcut çalışmamız ile de örtüşmektedir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde dışkı örnekleri toplanan kedilerin sığır çiftlikleri ile herhangi bir teması yoktu. Ayrıca ülkemizde sığırlarda *T. foetus* enfeksiyonunun prevalansı ile ilgili olarak az sayıda çalışma yapılmıştır [13]. Güven ve ark., [13] Erzurum bölgesinde 246 sığırın atık fetüsünde PCR ile % 5,7 oranında *T. foetus* pozitifliği bulmuşlardır. Bu araştırma sığırlarda *T. foetus* pozitiflik oranlarının düşük olduğunu göstermektedir [13]. Kedilerdeki enfeksiyonun risk faktörleri değerlendirildiğinde ülkelerin sığır popülasyonlarındaki *T. foetus* pozitiflik oranlarının önemi olduğu anlaşılmaktadır [2].

## Sonuç

Ülkemizde ilk defa bu araştırma ile kedilerde kronik ishal etkenleri arasında *T. foetus*'ün yer alıp almadığı moleküler olarak araştırılmış ve enfeksiyonun risk faktörleri belirlenmeye çalışılmıştır. Ancak kronik ishalli kedilere ait dışkı örneğinde *T. foetus*'a rastlanılmamıştır. Kronik ishalli kedilerde parazite rastlanılmamasının en önemli nedeni kedilerin yaşam alanlarının parazitin kaynağı olduğu bilinen sığırların yaşam alanlarının yakınlarında olmaması ile açıklanabilir. Enfeksiyon sığırlar arasında venereal (cinsel temas) yolla bulaşmaktadır. Sığırlar arasında venereal yolla bulaşan hastalıkların yayılmasını önlemek için en etkili yollardan biri de

sunî tohumlama uygulamalarıdır. Ülkemizde sığırlarda sunî tohumla uygulamalarının artmasına bağlı olarak sığırlarda *T. foetus* enfeksiyon oranlarının azalması neticesinde enfeksiyonun kedilere bulaş riskinin azaldığı ya da olmadığı düşünülmektedir. Bu nedenle Türkiye'de etkenin yaygınlığının araştırılacağı sonraki çalışmalarda örnekleme sığır çiftlikleri yakınlarında serbest dolaşan ve avlanan kedilerden yapılmasının uygun olacağı kanısına varılmıştır. Kedi trichomonozisinde risk faktörlerinin ortaya konulmasında yaş ve kedi ırkları ile ishal geçmişleri, bakım ve beslenme koşulları ile evde farklı bir evcil hayvanın (köpek) varlığı gibi faktörler dikkate alınmaktadır. Araştırmanın bir sonucu olarak da enfeksiyonun risk faktörlerine yukarıda bahsi geçen nedenden ötürü sığır çiftliklerinde veya yakınlarında yaşama faktörünün de eklenmesi gerektiği düşünülmektedir.

## Teşekkür

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1901.16.004 proje numarası ile desteklenmiştir.

Çalışmamızın bir parçası olma yönünde kedilerin dışkılarını büyük bir titizlikle bize getiren tüm hasta sahiplerimize katkılarından dolayı teşekkür ederiz. Samsun Büyükşehir Belediyesi Güçten Düşmüş Hayvan Bakım Evi personeline desteklerinden ötürü ayrıca teşekkürlerimizi sunarız. Numunelerin toplanması aşamasında yer alan yüksek lisans öğrencilerimizden Veteriner Hekim Serdar YILDIRIM ve Veteriner Hekim Sercan SEVER'e katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

1. Bell ET, Gowan RA, Lingard AE, McCoy RJ, Slapeta J, Malik R, (2010). *Naturally occurring Tritrichomonas foetus infections in Australian cats: 38 cases*. J Feline Med Surg. 12, 889–898.
2. Bissett SA, Stone ML, Malik R, Norris JM, O'Brien C, Mansfield CS, Nicholls JM, Griffin A, Gookin JL, (2009). *Observed occurrence of Tritrichomonas foetus and other enteric parasites in Australian cattery and shelter cats*. J Feline Med Surg. 11, 803–807.
3. Burgener I, Frey C, Kook P and Gottstein B, (2009). *Tritrichomonas foetus: a new intestinal parasite in Swiss cats*. Schweiz Arch Tierheilkd. 151, 383–389.
4. Doi J, Hirota J, Morita A, Fukushima K, Kamijyo H, Ohta H, Yamasaki M, Takahashi T, Katakura K, Oku Y, (2012),

- Intestinal Tritrichomonas suis* (= *T. foetus*) infection in Japanese cats. J Vet Med Sci. 74, 413–417.
5. Foster DM, Gookin JL, Poore MF, Stebbins ME, Levy MG, (2004). *Outcome of cats with diarrhea and Tritrichomonas foetus infection*. J Am Vet Med Assoc. 225: 888–892, 2004.
  6. Frey CF, Schild M, Hemphill A, Stünzi P, Müller N, Gottstein B, Burgener IA, (2009). *Intestinal Tritrichomonas foetus infection in cats in Switzerland detected by in vitro cultivation and PCR*. Parasitol Res. 104, 783–788.
  7. Galián M, Heusinger A, Gentil M, Müller E, (2011). *Tritrichomonas fetus in cats*. Argos-Informativo Veterinario 134, 44-45.
  8. Gookin JL, Breitschwerdt EB, Levy MG, Gager RB, Benrud JG, (1999). *Diarrhea associated with trichomonosis in cats*. J Am Vet Med Assoc. 215, 1450–1454.
  9. Gookin JL, Stebbins ME, Hunt E, Burlone K, Fulton M, Hochel R, Talaat M, Poore M, Levy MG, (2004). *Prevalence of and risk factors for feline Tritrichomonas foetus and Giardia infection*. J Clin Microbiol. 42, 2707–2710.
  10. Gray SG, Hunter SA, Stone MR, Gookin JL. (2010). *Assessment of reproductive tract disease in cats at risk for Tritrichomonas foetus infection*. Am J Vet Res. 71: 76–81.
  11. Grellet A, Makhlof SE, Desquillbet L, Hovhannessian F, Boogaerts C, Dore, et al. (2017). *Efficacy of guar gum-based ronidazole capsules as a treatment for Tritrichomonas foetus infection in cats*. J Feline Med Surg. 19(2), 177-184.
  12. Gunn-Moore DA, McCann TM, Reed N, Simpson KE, Tennant B, (2007). *Prevalence of Tritrichomonas foetus infection in cats with diarrhoea in the UK*. J Feline Med Surg. 9, 214-218.
  13. Guven E, Bastem Z, Avcioglu H, Erdem H, (2013). *Molecular determination of Tritrichomonas spp. in aborted bovine foetuses in Eastern Anatolian Region of Turkey*. Vet Parasitol. 196(3): 278–282.
  14. Holliday M, Deni D, Gunn-Moore DA, (2009). *Tritrichomonas foetus infection in cats with diarrhoea in a rescue colony in Italy*. J Feline Med Surg. 11, 131–134.
  15. Hosein A, Kruth SA, Pearl DL, Richardson D, Maggs JC, Peach HA, Peregrine AS. (2013). *Isolation of Tritrichomonas foetus from cats sampled at a cat clinic, cat shows and a humane society in southern Ontario*. J Feline Med Surg. 15, 706–711.
  16. Kessel JF, (1928). *Trichomoniasis in kittens*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 22, 61–80, 1928.
  17. Kingsbury DD, Marks SL, Cave NJ, et al. (2010). *Identification of Tritrichomonas foetus and Giardia spp. infection in pedigree show cats in New Zealand*. N Z Vet J. 58, 6–10.
  18. Kuehner KA, Marks SL, Kass PH, Sauter-Louis C, Grahm RA, Barutzki D, Hartmann K, (2011). *Tritrichomonas foetus infection in purebred cats in Germany: prevalence of clinical signs and the role of co-infection with other enteroparasites*. J Feline Med Surg. 13, 251–258.
  19. Levy MG, Gookin JL, Poore M, Birkenheuer AJ, Dykstra MJ, Litaker RW, (2013). *Tritrichomonas foetus and not Pentatrichomonas hominis is the etiologic agent of feline trichomonal diarrhea*. J Parasitol. 89, 99–104.
  20. Lim S, Park SI, Ahn KS, et al. (2010). *First report of feline intestinal trichomoniasis caused by Tritrichomonas foetus in Korea*. Korean J Parasitol. 48, 247–251.
  21. Miro G, Hernandez L, Montoya A, et al. (2011). *First description of naturally acquired Tritrichomonas foetus infection in a Persian cattery in Spain*. Parasitol Res. 109, 1151–1154.
  22. Payne PA, Artzer M. (2009). *The biology and control of Giardia spp and Tritrichomonas foetus*. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 39, 993–1007.
  23. Profizi C, Cian A, Meloni D, Hugonnard M, Lambert V, Groud K, Gagnon AC, Viscogliosi E, Zenner L, (2013). *Prevalence of Tritrichomonas foetus infections in French catteries*. Vet Parasitol. 196, 50–55.
  24. Queen EV, Marks SL, Farver TB. (2012). *Prevalence of selected bacterial and parasitic agents in feces from diarrheic and healthy control cats from Northern California*. J Vet Intern Med. 26, 54–60.
  25. Rae DO, Chenoweth PJ, Genho PC, et al. (1999). *Prevalence of Tritrichomonas fetus in a bull population and effect on production in a large cow-calf enterprise*. J Am Vet Med Assoc. 214, 1051–1055.
  26. Reinmann K, Muller N, Kuhnert P, Campero CM, Leitsch D, Hess M, Henning K, Fort M, Muller J, Gottstein B, Frey CF. (2012). *Tritrichomonas foetus isolates from cats and cattle show minor genetic differences in unrelated loci ITS-2 and EF-1alpha*. Vet Parasitol. 185, 138-144.
  27. Šlapeta J, Craig S, McDonell D, Emery D, (2010). *Tritrichomonas foetus from domestic cats and cattle are genetically distinct*. Exp Parasitol. 126, 209–213.
  28. Šlapeta J, Muller N, Stack CM, Walker G, Lew-Tabor A, Tachezy J, Frey CF, (2012). *Comparative analysis of Tritrichomonas foetus (Riedmuller, 1928) cat genotype, T. foetus (Riedmuller, 1928) cattle genotype and Tritrichomonas suis (Davaine, 1875) at 10 DNA loci*. Int J Parasitol. 42, 1143–1149.
  29. Stockdale H, Rodning S, Givens M, Carpenter D, Lenz S, Spencer J, Dykstra C, Lindsay D, Blagburn B. (2007). *Experimental infection of cattle with a feline isolate of Tritrichomonas foetus*. J Parasitol. 93, 1429–1434.
  30. Sun Z, Stack C, Šlapeta J. (2012). *Sequence differences in the diagnostic region of the cysteine protease 8 gene of Tritrichomonas foetus parasites of cats and cattle*. Vet Parasitol. 186, 445–449.
  31. Xenoulis PG, Lopinski DJ, Read SA, Suchodolski JS, Steiner JM, (2013). *Intestinal Tritrichomonas foetus infection in cats: a retrospective study of 104 cases*. J Feline Med Surg. 15, 1098–1103.
  32. Yao C, (2012). *Opportunistic human infections caused by Tritrichomonas species: a mini-review*. Clin Microbiol Newsl. 34, 127–131.
  33. Yao C, (2013). *Diagnosis of Tritrichomonas foetus-infected bulls, an ultimate approach to eradicate bovine trichomoniasis in US cattle?* J Med Microbiol. 62, 1–9.
  34. Yao C, Köster LS, (2015). *Tritrichomonas foetus infection, a cause of chronic diarrhea in the domestic cat*. Vet Res. 46(1), 35.

## Sularda, İnsan Enfeksiyonları ile İlişkili Norovirus Genogruplarının Real-Time PCR Yöntemi ile Saptanması

Mehmet Demirci<sup>1</sup>, Akın Yiğit<sup>2</sup>, Nadire Eser<sup>3</sup>, Hikmet Dinç<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Beykent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul Türkiye.

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

<sup>3</sup>Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Kahramanmaraş, Türkiye

<sup>4</sup>Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 09.10.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 11.11.2018

**Özet:** İnsan norovirüsü (HNoV), çevresel etkenlere oldukça dirençli bir RNA virüsüdür ve akut viral gastroenteritin nedeni olan ana etkenlerden birisidir. Hızlı evrim yeteneği nedeniyle 7 genogrubu vardır ve bunlardan GI, GII ve GIV insan enfeksiyonları ile ilişkilidir. Sular HNoV için salgın aracı olarak tanımlanmaktadır. Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda, lokal kuyular ve derelerden alınan su numunelerinde özellikle insanlarda enfeksiyonları ile ilişkili HNoV genogrup (G)I, GII ve GIV varlığının gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real-time PCR) ile tanımlanarak moleküler epidemiyolojik bir veri sağlanması amaçlanmıştır.

Çalışma için lokal kuyulardan ve derelerden, Ocak 2017 – Ocak 2018 döneminde toplanan 60 adet su numunesi çalışmamıza dahil edildi. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi sonrası HNoV GI, GII ve GIV spesifik primer problemler ile LightCycler 480 sisteminde real-time PCR yöntemi ile çalışıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

Çalışmamıza dâhil edilen 60 numunede, HNoV GII'nin %10 düzeyinde saptandığı, bunu sırasıyla GI (%5) ve GIV (%1.67) varlığının takip ettiği tespit edildi. 10 numunede (%16.67) HNoV GI, GII ve GIV pozitifliği bulundu. Lokal kuyulardan 3 (%8.57) tanesinde ve derelerden alınan numunelerden de 7 (%28) tanesinde pozitiflik saptandı.

Sonuç olarak, ülkemizde ilk defa kuyu suları ve derelerden alınan sularla yaptığımız çalışmamızla, moleküler epidemiyolojik olarak HNoV varlığını saptadık. HNoV'lar arasında GII'nin ön planda tutulması gerektiğini ama GI ve GIV'ünde bulunduğunu tespit ettik. HNoV için salgınlarında sular göz önünde bulundurulmalı ve gelişen moleküler tekniklerle, sular gibi önemli enfeksiyon kaynaklarından epidemiyolojik veriler sağlanarak durum ortaya konabilir ve bu bilgiler ile bölgesel aşı geliştirme çalışmaları içinde ön veriler sağlanabileceği kanaatindeyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Su, real-time PCR, Norovirus genogrupları

### Determination of Norovirus Genogroups Associated with Human Infections in Water by Real-Time PCR Method

**Abstract:** Human norovirus (HNoV) is a RNA virus that is highly resistant to environmental conditions and is one of the main causes of acute viral gastroenteritis. It has 7 genogroups, due to ability of rapid evolution, and which genogrup (G)I, GII and GIV are associated with human infections. The waters describe HNoV as an epidemic source. Aim of this study was to provide molecular epidemiological data by using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) of HNoV GI, GII and GIV presence related to infections in water samples taken from local underground waters and creeks.

Sixty (60) water samples collected from local underground waters and creeks, between January 2017 and January 2018, were included in our study. After RNA isolation and cDNA synthesis, HNoV GI, GII and GIV specific primary and probes were used on LightCycler 480 system by real-time PCR method and the results were evaluated.

In the 60 samples included in our study, it was found that HNoV GII was detected at 10% level, followed by GI (5%) and GIV (1.67%) respectively. HNoV GI, GII and GIV positivity were found in 10 samples (16.67%). 3 (8.57%) of the local underground waters and 7 (28%) of the creeks water samples were found positive.

As a result, we determined the presence of HNoV by molecular epidemiology in our country for the first time in our study with water taken from underground waters and creeks. We found that GII should be in the forefront of HNoVs, but it was found in GI and GIV. For HNoV, water should be considered in outbreaks, and epidemiological data can be obtained from important sources of infection, such as water, by developing molecular techniques, and we believe that data in this study can be important epidemiologically and can be used for regional vaccine development studies.

**Key words:** Water, real-time PCR, Norovirus genogroups

## Giriş

İnsan norovirüsü (HNoV), Caliciviridae ailesi içinde bulunan pozitif polariteli bir RNA virüsüdür ve akut viral gastroenteritin nedeni olan ana etkenlerden birisidir [12]. Çevresel etkenlere oldukça dirençli olan HNoV, dünya çapında sporadik ve epidemik bakteriyel olmayan (viral) gastroenteritlere neden olur (15). HNoV esas olarak fekal-oral yoldan yayılır. Bulaşması, doğrudan (kişiden kişiye geçişle), dolaylı (kontamine ürünlere temas yoluyla) ve kontamine yiyecek veya suların sindirimi yoluyla olabilir [17]. Hızlı moleküler evrim yeteneği nedeniyle, virüsün yeni genotipleri ve varyantları sıklıkla bildirilmektedir. Hatta nükleik asitinde bu hızlı değişim yeteneği nedeniyle fantastik bir canavara (“şekil değiştiren”) benzetilmektedir. Şu ana kadar viral protein genomu (VP1) aminoasit dizisinin incelenmesi ile 7 genogrup ([G]I – GVII) ve 40’ın üzerinde norovirus genotipi tanımlanmıştır [19]. Bunlardan üçü GI, GII ve GIV insanlarda hastalığa neden olabilir [1]. GII genogrup, klinik vakalarda GI’den daha sık saptanırken, GIV’ün daha nadir vakalarda tespit edildiği bildirilmiştir [10]. GII.4 dünya çapında en yaygın olan genotiptir ve 1990’ların ortasından beri moleküler tanı tekniklerinin, aktif sürveyans için kullanımının başlamasından beri, pek çok küresel salgınla ilişkilendirilmiştir [19]. Norovirus enfeksiyonları, 12-48 saat inkübasyon süresine sahiptir ve semptomlar tipik olarak bulantı, kusma, ishal, karın ağrısı ve ateşi içerir. Norovirus enfeksiyonları genellikle hafif ve orta semptomlarla kendini sınırlandırır, ancak immün sistemi baskılanmış hastalarda ve yaşlılarda ciddi enfeksiyonlar görülebilir. Semptomlar genellikle 1-3 gün sürer, ancak genç, yaşlı ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda daha uzun sürebilir [5]. İlk defa 1980 yılında küçük bir kasabada su kaynaklı norovirus salgını olduğu rapor edilmiştir [8] ve bu bilgi sonrası epidemiyolojik veriler bu etkenin suları salgın aracı olarak kullandığını tanımlamıştır. Özellikle, su kaynaklı, büyük ölçekli salgınlarda norovirus türleri saptandığında, içme sularının, insan dışkı kaynağı tarafından kontaminasyonu da düşünülmelidir [6]. HNoV’un genotipik değişkenliği nedeniyle yapılacak olan moleküler epidemiyolojik çalışmalar, salgınlarda gözlemlenebilecek durumu açıklaması açısından ve ayrıca aşı çalışmaları içinde önemli

bir veri sağlamaktadır [19]. Bunun yanında bulaşık suların kullanılması ağır metal toksikasyonu ya da bakteriyel kaynaklı gastroinstistinal enfeksiyonlar ile karışabildiği için bu virüsün durumunun ortaya konması önemli hale gelmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında, çalışmamızda, lokal kuyular ve derelerden alınan su numunelerinde özellikle insanlarda enfeksiyonlar ile ilişkili HNoV genogrup (G)I, GII ve GIV varlığının gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real-time PCR) ile tanımlanarak moleküler epidemiyolojik bir veri sağlanması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Çalışma için Mardin, Gaziantep, Şanlıurfa ve Kahramanmaraş il, ilçe ve köylerinde bulunan lokal kuyulardan ve derelerden, Ocak 2017 – Ocak 2018 döneminde 5 ml olarak steril plastik kaplara toplanan 60 adet su numunesi çalışmamıza dahil edildi. Numuneler soğuk zincir koşullarında hızlıca laboratuvara transfer edildi ve RNA izolasyonları 24 saat içinde tamamlandı. Schultz ve ark. [18], 2010 yılında tanımladıkları protokol izlenerek, su numunelerinden RNA izolasyonu için ultrafiltrasyonla numuneler işleme alındı. Ultrafiltrasyon sonrası bu numunelerin 200 mikrolitre miktarları ile, QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak üretici direktifleri doğrultusunda RNA izolasyonları gerçekleştirildi. RNA’lar, komplementer DNA (cDNA) sentezi işlemlerine kadar -80°C’de saklandı. cDNA’lar First Strand cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılarak üretici direktifleri doğrultusunda oluşturuldu. cDNA’lar real-time PCR aşamasına kadar -20°C’de saklandı. İnsanlarda enfeksiyonlarla ilişkili olan HNoV GI, GII ve GIV genogruplarını saptayabilmek için Tablo 1’de verilen spesifik primer ve probalar kullanıldı [3, 16]. RNA izolasyonlarının doğruluğunu kontrol etmek için çalışmada RNA process control kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) üretici direktifleri doğrultusunda kullanıldı.

cDNA’lar, primer ve proba birlikte, LightCycler 480 Probe Master kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) üretici direktifleri doğrultusunda kullanılarak, real-time PCR işlemleri, LightCycler 480 sisteminde gerçekleştirildi. Her bir reaksiyonda 5 ul cDNA kullanıldı ve PCR profili başlangıç akti-

vasyon aşaması olarak; 95°C'de 10 dakika, takiben 45 siklus, denaturasyon, uzama ve çoğaltma aşaması olarak sırasıyla 95°C'de 10sn, 60°C'de 30 sn ve 72°C'de 1 sn şeklinde gerçekleştirildi.

**Tablo 1:** Genogrup I, GII ve GIV saptanması için real-time PCR'da kullanılan primer dizileri

Genogrup	Primer Adı	Oligonukleotid dizisi (5' > 3')	Referans
GI	QNIF4	CGCTGGATGCGNTTCCAT	11
	NV1LCR	CCTTAGACGCCATCATCATTTAC	11
	NV1LCpr	FAM- TGGACAGGAGAYCGCRATCT-TAMRA	11
GII	QNIF2d	ATGTTTCAGRTGGATGAGRTTCTCWGA	11
	COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	11
	QNIFS	FAM- AGCACGTGGGAGGGGATCG-TAMRA	11
GIV	NIFG4F	ATGTACAAGTGGATGCGRTTC	12
	COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	12
	NIFG4P	FAM-AGCACTTGGGAGGGGATCG-TAMRA	12

## Bulgular

Çalışmamıza dahil edilen 60 numunede saptanan genogrupların dağılımı Tablo 2'de verilmiştir. 60 numuneden, 10 tanesinde (%16.67) HNoV GI, GII ve GIV pozitifliği bulundu. Lokal kuyulardan 3

(%8.57) tanesinde ve derelerden alınan numunelerden de 7 (%28) tanesinde pozitiflik saptandı. HNoV genogrupları incelendiğinde, 6 (%10) numunede GII, 3 (%5) numunede GI ve 1 (%1.67) numunede GIV olduğu saptandı.

**Tablo 2:** Genogrupların dağılımı

	Norovirüs Genogrup			
	GI	GII	GIV	Toplam
<b>Lokal Kuyular n:35</b>	1 (2.86)	2 (5.71)	0 (0)	3 (8.57)
<b>Dereler n:25</b>	2 (8.00)	4 (16.00)	1 (4.00)	7 (28.00)
Toplam: 60	3 (5.00)	6 (10.00)	1 (1.67)	10 (16.67)

Derelerden alınan sularda özellikle GII %16 olarak en yüksek düzeyde saptanırken, derelerden alınan sularda GI, GII ve GIV pozitifliği %28 oranında bulundu. Lokal kuyularda ise GI %2.86 ve GII %5.71 oranında saptanırken, GIV pozitifliği bulunmadı. GIV sadece 1 numunede derelerden alınan numuneler arasından saptandı. Derelerde, kuyulardan alınan numunelere göre daha yüksek sayıda HNoV pozitifliği saptandığı tespit edildi.

Tüm numunelerde durum incelendiğinde, Numunelerde, HNoV GII'nin %10 düzeyinde saptandığı, bunu sırasıyla GI (%5) ve GIV (%1.67) varlığının takip ettiği tespit edildi.

Pozitiflik saptanan sularda Norovirüs ve genogrupların dağılımı incelendiğinde, Ocak aylarında en yüksek pozitiflik saptandığı, bunu Şubat ayının izlediği görülmektedir (Tablo 3).

**Tablo 3:** Norovirüs ve genogruplarının mevsimsel dağılımı

Ay	Norovirüs			Toplam
	GI	GII	GIV	
Ocak 17	1	1	0	2
Şubat 17	1	1	0	2
Mart 17	0	0	0	0
Nisan 17	0	0	0	0
Mayıs 17	0	0	0	0
Haziran 17	0	0	0	0
Temmuz 17	0	0	0	0
Ağustos 17	0	0	0	0
Eylül 17	0	1	0	1
Ekim 17	0	1	0	1
Kasım 17	0	1	0	1
Aralık 17	1	0	0	1
Ocak 18	0	1	1	2
Toplam	3	6	1	10

## Tartışma ve Sonuç

Su kaynaklı virüslerin saptanması, özellikle içilebilir suyun az olduğu yerlerde halk sağlığı açısından önemlidir. Su kaynaklı enfeksiyonlarda norovirüs yaygın olarak bildirilmektedir. Doğası gereği, bu kontaminasyon sıklıkla biyolojik atıklarla ilişkilidir [4]. Çevre koşullarında uzun süre yaşama şansı olduğu için bu Norovirüslerin önemini arttırmaktadır [9]. Yenilenme yeteneği hızlı olan ve farklı pek çok genogrup, genotip ve varyantları bulunan norovirüslerin moleküler epidemiyolojik olarak sularda incelenerek durumunun bilinmesi, hem epidemiyolojik veri sunması, hem de ulusal aşı çalışmalarında da kullanılabilmesi açısından değerlidir [4].

Uluslararası çalışmalar incelendiğinde; Kuyular gibi yer altı sularında yapılan çalışmalarda, Joung ve ark, 2013 yılında, Güney Kore’de yer altı sularında sadece %0.5 oranında GII pozitifliği saptamışlardır [7]. Lee ve ark, 2013 yılında Güney Kore’de yaptıkları çalışmada yer altı sularını incelediklerinde, HNoV için %0.64 pozitiflik saptamışlar ve bu pozitif numunelerden sadece 1 tanesinde GI, 6 tanesinde GII olduğunu bildirmişlerdir [13]. Bizde çalışmamızda kuyu numunelerimizden sadece 3 tanesinde pozitiflik saptadık, verilen oranlara benzer şekilde kuyu numunelerinde dere gibi kontaminasyona daha açık numunelere göre daha düşük se-

viyede HNoV varlığı olduğu anlaşılmaktadır. Tüm çalışmalarda GII varlığının bizim çalışmamızdaki-ne benzer şekilde yüksek olduğu görülmektedir.

Yine uluslararası çalışmalarda, derelerdeki durum incelendiğinde, Aw ve ark, 2009 yılında Singapur’da derelerde yaptıkları çalışmalarında 60 numuneden 4 tanesinde (%9.3) GI, 16 tanesinde (%37.2) GII ve 23 tanesinde (%53.5) GI ve GII birlikteliği olmak üzere toplam 43 (%71.7) HNoV pozitifliği bildirmişlerdir (2). Lodder ve ark, 2005 yılında Hollanda’da yaptıkları çalışmalarında derelerde 7 pozitiflik saptamışlar ve bunların 2 tanesini GI ve 5 tanesini GII olarak tespit etmişlerdir [14]. Kim ve ark, 2016 yılında Güney Kore’de yaptıkları çalışmalarında, GI için %13.3 ve GII için %16.6 pozitiflik bildirmişlerdir [11]. Vantarakis ve ark, 2011 yılında Yunanistan’da yaptıkları çalışmalarında derelerden aldıkları su numunelerinde, %56.8 oranında HNoV bildirmişler ve bunların tamamının GII olduğunu rapor etmişlerdir [21]. Dere gibi biyolojik kontaminasyona kuyulara göre daha açık sularda HNoV kontaminasyonunun daha yüksek seviyelerde olduğu ve ülkeden ülkeye hatta bölgeden bölgeye değişiklik gösterdiği görülmektedir. Bizim çalışmamızda saptadığımız %28’lik pozitifliğin bu anlamda çalışmalarla benzerlik gösterdiğini söyleyebiliriz. Ayrıca çalışmamızdaki-ne benzer şekilde GII varlığı, diğer genogruplara göre ağırlık göstermektedir.

Ülkemizde yapılan çalışmalar incelendiğinde, sıklıkla salgınlarla ilişkili olarak dışkı numunelerinden incelemeler yapıldığı ve literatürde bizim çalışmamıza benzer şekilde sular ile yapılmış bir çalışmaya rastlamadık. Her ne kadar aynı numune üzerinden olmasada Timurkan ve ark [20], dışkı numunelerinde yaptıkları çalışmalarında, GII’yi en yüksek düzeyde saptadıklarını, 1’er numunede de GI ve GIV varlığı bulduklarını bildirmişlerdir. Bu veride, yine çalışmamız verilerine benzer şekilde GII varlığının ülkemizde diğer ülkelere de benzer şekilde yüksek olduğunu ama GI ve GIV’ünde olabileceğini bize düşündürmüştür.

Norovirüs genotiplerinin mevsimsel dağılımının incelendiği çalışmalara bakıldığında, Kim ve ark [11], Güney Kore’de sularda saptadıkları Norovirüs pozitifliklerini bizim çalışmamızdaki-ne benzer şekilde kış aylarında arttığını bildirmişlerdir. Delgado-Gardea ve ark [4] 2017 yılında Meksika’da yap-



tıkları çalışmada, sularda Ekim ayında daha yüksek konsantrasyonda Norovirüs pozitifliği saptadıklarını bildirmişlerdir. Jalava ve ark [6], 2014 yılında Finlandiya'daki salgınlar sırasında suları incelediklerinde Temmuz ayında sularda Norovirüs pozitifliği saptamışlardır. Ülkemiz ve Finlandiya arasında ısı farklılığı göz önüne alındığında, ısı farklılığının çalışmamız sonuçlarına göre fark yarattığını bize düşündürmüştür. Kauppinen ve Miettinen [9], 2017 yılında yaptıkları çalışmada bu düşüncemizi desteklemişlerdir. 3°C, 21°C ve 36°C'da sularda Norovirüs kantitatif durumunu incelediklerinde 36°C'da Norovirüs kantitatif miktarların en düşük seviyede olduğunu ve ısı artışı ile düşüş gösterdiğini bildirmişlerdir. İncelediğimiz çalışmalardaki Norovirüs'ün mevsimsel dağılımı sonuçları çalışmalarımız sonuçları ile benzer saptanmıştır.

Sonuç olarak, ülkemizde ilk defa kuyu suları ve derelerden alınan sularla yaptığımız çalışmamızla, moleküler epidemiyolojik olarak HNoV varlığının sularımızda olabileceğini, derelerde, kuyu sularına göre kirliliğin daha fazla düzeyde olabileceğini saptadık. HNoV'lar arasında GII'nin ön planda tutulması gerektiği ama GI ve GIV'ünde varlığının olduğunu gözlemledik. Halk sağlığı problemi oluşturmaması açısından, HNoV salgınlarında sular göz önünde bulundurulmalı ve yeni moleküler tekniklerle sular gibi önemli enfeksiyon kaynaklarından epidemiyolojik veriler elde edilerek durum ortaya konabilir ve bu bilgiler ile bölgesel aşı geliştirme çalışmaları içinde ön veriler sağlanabileceği kanaatindeyiz.

## Kaynaklar

- Atmar RL, (2010). *Noroviruses – State of the Art*. Food and environmental virology. 2(3), 117-126. doi:10.1007/s12560-010-9038-1.
- Aw TG, Gin KY-H, Ean Oon LL, Chen EX, Woo CH, (2009). *Prevalence and Genotypes of Human Noroviruses in Tropical Urban Surface Waters and Clinical Samples in Singapore*. Applied and Environmental Microbiology. 75(15), 4984-4992. doi:10.1128/AEM.00489-09.
- Da Silva AK, Le Saux J-C, Parnaudeau S, Pommepuy M, Elimelech M, Le Guyader FS, (2007). *Evaluation of Removal of Noroviruses during Wastewater Treatment, Using Real-Time Reverse Transcription-PCR: Different Behaviors of Genogroups I and II*. Applied and Environmental Microbiology. 73(24), 7891-7897. doi:10.1128/AEM.01428-07.
- Delgado-Gardea MCE, Tamez-Guerra P, Gomez-Flores R, Mendieta-Mendoza A, Zavala-Díaz de la Serna FJ, Contreras-Cordero JF, Erosa-de la Vega G, Pérez-Recoder MC, Sánchez-Ramírez B, González-Horta C, Infante-Ramírez R, (2017). *Prevalence of Rotavirus Genogroup A and Norovirus Genogroup II in Bassaseachic Falls National Park Surface Waters in Chihuahua, Mexico*. International Journal of Environmental Research and Public Health. 14(5), 482. doi:10.3390/ijerph14050482.
- Huang X-Y, Su J, Lu Q-C, Li SZ, Zhao JY, Li ML, Li Y, Shen X-J, Zhang B-F, Wang H-F, Mu Y-J, Wu S-Y, Du Y-H, Liu L-C, Chen W-J, Klena JD, Xu B-L, (2017). *A large outbreak of acute gastroenteritis caused by the human norovirus GII.17 strain at a university in Henan Province, China*. Infectious Diseases of Poverty. 6, 6. doi:10.1186/s40249-017-0236-z.
- Jalava K, Rintala H, Ollgren J, Maunula L, Gomez-Alvarez V, Revez J, Palander M, Antikainen J, Kauppinen A, Räsänen P, Siponen S, Nyholm O, Kyyhkynen A, Hakkarainen S, Merentie J, Pärnänen M, Loginov R, Ryu H, Kuusi M, Siitonen A, Miettinen I, Santo Domingo JW, Hänninen M-L & Pitkänen T, (2014). *Novel Microbiological and Spatial Statistical Methods to Improve Strength of Epidemiological Evidence in a Community-Wide Waterborne Outbreak*. PLoS ONE. 9(8), e104713. doi:10.1371/journal.pone.0104713.
- Joung HK, Han SH, Park S-J, Jheong WH, Ahn TS, Lee JB, Jeong Y-S, Jang KL, Lee G-C, Rhee O-J, Park J-W, Paik SY, (2013). *Nationwide Surveillance for Pathogenic Microorganisms in Groundwater near Carcass Burials Constructed in South Korea in 2010*. International Journal of Environmental Research and Public Health. 10(12), 7126-7143. doi:10.3390/ijerph10127126.
- Kaplan JE, Goodman RA, Schonberger LB, Lippy EC, Gary GW, (1982). *Gastroenteritis due to Norwalk virus: an outbreak associated with a municipal water system*. J Infect Dis. 146(2), 190-197.
- Kauppinen A, Miettinen IT, (2017). *Persistence of Norovirus GII Genome in Drinking Water and Wastewater at Different Temperatures*. Pathogens. 6(4), 48. doi:10.3390/pathogens6040048.
- Kazama S, Miura T, Masago Y, Konta Y, Tohma K, Manaka T, Liu X, Nakayama D, Tanno T, Saito M, Oshitani H, Omura T, (2017). *Environmental Surveillance of Norovirus Genogroups I and II for Sensitive Detection of Epidemic Variants*. Applied and Environmental Microbiology. 83(9), e03406-16. doi:10.1128/AEM.03406-16.
- Kim MS, Koo ES, Choi YS, Kim JY, Yoo CH, Yoon HJ, Kim T-O, Choi HB, Kim JH, Choi JD, Park K-S, Shin Y, Kim Y-M, Ko GP, Jeong YS, (2016). *Distribution of Human Norovirus in the Coastal Waters of South Korea*. PLoS ONE. 11(9), e0163800. doi:10.1371/journal.pone.0163800.
- Koo ES, Kim MS, Choi YS, Park K-S, Jeong YS. (2017). *Occurrence of novel GII.17 and GII.21 norovirus variants in the coastal environment of South Korea in 2015*. PLoS ONE. 12(2), e0172237. doi:10.1371/journal.pone.0172237.
- Lee B-R, Lee S-G, Park J-H, Kim KY, Ryu SR, Rhee OJ, Park J-W, Lee J-S, Paik S-Y, (2013). *Norovirus Contamination Levels in Ground Water Treatment Systems*

- Used for Food-Catering Facilities in South Korea. *Viruses*. 5(7), 1646-1654. doi:10.3390/v5071646.
14. Lodder WJ, de Roda Husman AM, (2005). *Presence of Noroviruses and Other Enteric Viruses in Sewage and Surface Waters in The Netherlands*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(3), 1453-1461. doi:10.1128/AEM.71.3.1453-1461.2005.
  15. Masago Y, Konta Y, Kazama S, Inaba M, Imagawa T, Tohma K, Saito M, Suzuki A, Oshitani H, Omura T, (2016). *Comparative Evaluation of Real-Time PCR Methods for Human Noroviruses in Wastewater and Human Stool*. *PLoS ONE*. 11(8), e0160825. doi:10.1371/journal.pone.0160825.
  16. Miura T, Parnaudeau S, Grodzki M, Okabe S, Atmar RL, Le Guyader FS (2013). *Environmental Detection of Genogroup I, II, and IV Noroviruses by Using a Generic Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay*. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(21), 6585-6592. doi:10.1128/AEM.02112-13.
  17. Pouillot R, Van Doren JM, Woods J, Plante D, Smith M, Goblick G, Roberts C, Locas A, Hajen W, Stobo J, (2015). *Meta-Analysis of the Reduction of Norovirus and Male-Specific Coliphage Concentrations in Wastewater Treatment Plants*. *Applied and Environmental Microbiology*. 81(14), 4669-4681. doi:10.1128/AEM.00509-15.
  18. Schultz AC, Perelle S, Di Pasquale S, Kovac K, De Medici D, Fach P, Sommer HM, Hoorfar J, (2011). *Collaborative validation of a rapid method for efficient virus concentration in bottled water*. *Int J Food Microbiol*. 1;145 Suppl 1:S158-66. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.030.
  19. Siqueira JAM, Bandeira R da S, Oliveira D de S, dos Santos LFP, Gabbay YB (2017). *Genotype diversity and molecular evolution of noroviruses: A 30-year (1982-2011) comprehensive study with children from Northern Brazil*. *PLoS ONE*. 12(6), e0178909. doi:10.1371/journal.pone.0178909.
  20. Timurkan MÖ, Aydın H, Aktaş O, (2017). *Frequency and molecular characterization of human norovirus in Erzurum, Turkey*. *Turk J Med Sci*. 12;47(3), 960-966. doi: 10.3906/sag-1509-87.
  21. Vantarakis A, Mellou K, Spala G, Kokkinos P, Alamanos Y, (2011). *A Gastroenteritis Outbreak Caused by Noroviruses in Greece*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2011;8(8), 3468-3478. doi:10.3390/ijerph8083468.

# Taze Peynirlerden İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarının Genotiplendirilmesi

Sadık Savaşan, Ergün Ömer Göksoy

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hij. ve Tek. AD, Aydın

Geliş Tarihi / Received: 12.10.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 08.11.2018

**Özet:** Bu çalışmada, Aydın ilinde üretilen taze peynirlerden izole edilen *Escherichia coli* suşlarının RAPD-PCR yöntemi ile genotiplendirilerek filogenetik yakınlıklarının ve ekolojik çeşitliliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, Aydın ili ve çevresinde farklı mandıralarda üretilip, mandıra satış noktalarında, marketlerde ve semt pazarlarında satışa sunulan toplam 100 adet taze peynir numunesi koliform bakteri sayısı ile *E. coli* varlığı yönünden incelenmiştir. Her bir numuneden 250 gram olacak şekilde steril poşetler içerisinde soğuk zincir altında laboratuvara getirilmiştir. Taze peynir örneklerinin zenginleştirilmiş ve selektif besiyerlerine ekimlerini takiben izole edilen *E. coli* şüpheli bakterilerin biyokimyasal yöntemlerle identifikasyonu yapılmıştır. İdentifikasyon sonuçları PCR ile doğrulanmıştır. İzole edilen *E. coli* suşları RAPD-PCR yöntemi ile genotiplendirilmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda 77 adet taze peynir örneğinde ortalama 4,83 log kob/g koliform bakteri saptanmış, koliform bakteri saptanan 77 adet taze peynir örneğinin 22 sinden 44 adet *E. coli* izolatu elde edilmiştir. Elde edilen 44 adet izolat PCR yöntemi ile de *E. coli* olarak doğrulanmıştır. Bu izolatların RAPD-PCR ile genotiplendirilmesi sonucu 22 farklı genotip belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Taze peynir, *E. coli*, RAPD-PCR, genotiplendirme

## Genotyping of *Escherichia coli* Strains Isolated From Fresh Cheese

**Abstract:** The aim of this study was to evaluate phylogenetic and ecological diversity of *E. coli* strains isolated from raw cheese samples produced in Aydın province, by genotyping with RAPD-PCR technique. In this research, the fresh cheese materials produced at different dairy houses were obtained from dairy markets, local markets, district markets in and near Aydın province and they were investigated for colony forming unit of coliform bacteria and *E. coli* presence. 250 gr pieces of 100 fresh cheese samples that were obtained from different markets were taken in sterile bags and were brought to Adnan Menderes University. Veterinary Faculty, Food Hygiene and Technology Department laboratories in cold chain. After the enrichment and selective media processes, the isolated bacteria were identified by bio-chemical tests and PCR. After then, isolates were genotyped by using RAPD-PCR. As a result, in our study, coliform bacteria found in 77 fresh cheese materials at the average level of 4,83 log cfu/g., 44 *E. coli* isolates were identified in 22 of the 77 coliform contaminated samples.. The obtained 44 isolates were also verified as *E. coli* by PCR. 22 different genotypes were determined by genotyping of these isolates using RAPD-PCR.

**Key Words:** Fresh cheese, *E. coli*, RAPD-PCR, genotyping

## Giriş

Geleneksel bir süt ürünü olan peynir, farklı çeşitleri ile hemen hemen bütün tüketim gruplarına hitap etmekte ve insan beslenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Peynirin günlük beslenmemizde kolay sindirilebilir özelliğinin yanı sıra, yapısında üretimde kullanılan sütteki yağ, çözünmeyen tuzları, koloidal maddelerin tümüne yakın miktarını bulundurması ve süt serumundaki çözünen tuzlar, vitaminler, serum proteinleri ve diğer besin unsurlarının da bir ölçüde peynirin yapısına girmesinden dolayı önemli olarak kabul edilmektedir. Peynir ayrıca, yüksek kalitede protein, yağ, A ve B2 vitaminleri yönünden de oldukça zengindir [30].

Peynir her ne kadar güvenli bir gıda ürünü olarak bilinse de, pek çok semptomlarla ortaya çıkan gıda zehirlenmesi vakalarına neden olduğu bildirilmektedir. Peynir kaynaklı gıda zehirlenmelerine yol açan patojenler, kirli çevre veya infekte hayvan kaynaklı bulaşmış çiğ süt, süt işletmesi florasının ya da bu floranın çiğ süt kaynaklı kirliliği, üretim aşamasında çalışanlar kaynaklı olabilmektedir [18]. Ülkemizde peynirlerin fekal kontaminasyon ve patojen mikroorganizmalarla bulaşmasını, çiğ sütün toplam bakteri sayısı fazlalığına bağlı düşük kalitesi, sağım, taşıma, depolama aşamalarında ve işletmelerde, temizlik ve hijyen kurallarına yeterince önem verilmemesi, yeterli olgunlaştırma süresi dolmadan tüketime sunulması, uygunsuz koşullarda pazarlanması gibi faktörler olumsuz yönde

etkilemekte ve bu durum tüketici sağlığı açısından önemli bir risk oluşturmaktadırlar [8,14,26,29].

Halk sağlığı için risk teşkil eden peynir kaynaklı zehirlenmelerin en önemli neden olarak *Escherichia coli* gösterilmektedir. *E. coli*, Enterobacteriaceae familyasından, sporsuz gram negatif, uçları yuvarlak çomak şeklinde, çoğunlukla hareketli, asidorezistans özelliği olmayan, insan ve pek çok sıcakkanlı hayvanın doğal barsak florasında bulunan, optimum gelişme sıcaklığı 37°C, optimum gelişme pH'sı 7,2 olan basil şekilli bir bakteridir [7,28]. *E. coli*, insan ve bazı memelilerin barsak florasında bulunması nedeniyle zararsız olarak kabul edilse de, bazı tipleri gerek barsakta gerekse barsak dışı ortamlarda insanlarda hastalıklara sebep olabilmektedir [15]. Gıdalarda saptanması, saptanma miktarı, halk sağlığı yönünden önem arz eden enteropatojenik ya da toksijenik *E. coli* bulunma ihtimali açısından, fekal kontaminasyonu gösterme açısından

indikatör bir mikroorganizma olarak kabul edilir [22]. Çok sayıda patojen *E. coli* grubu bulunmakla birlikte, enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) ve enterohemorajik *E. coli* (EHEC) olmak üzere 4 grup önem arz etmektedir. Bu gruplar farklı *E. coli* serotiplerini içermektedir. Bir başka sınıflandırma şeklinde ise bazı *E. coli* serotipleri verotoksijenik (VTEC) grubu içinde toplanır. Bu gruplar dışında Meksika'da çocuklarda hafif geçen bir diareye neden olan diffuse adhering *E. coli* (DAEC), çeşitli ülkelerde bebek ve çocuklarda kronik diareye neden olan entero-aggregative *E. coli* (EAggEC), ender rastlanan facultatively enteropathogenic *E. coli* (FEEC) grupları da mevcuttur. EAggEC serotipleri agregatif yapışma özellikleri ile diğer tüm *E. coli* serotiplerinden farklılık gösterir [13]. Patojenik *E. coli* alt grupları ile ilgili bazı özellikler ve semptomlar Tablo 1'de özetlenmiştir [11].

**Tablo 1.** Patojenik *E. coli* alt grupları ile ilgili bazı özellik ve semptomlar [11].

Özellikler/ Semptomlar	ETEC	EPEC	EHEC	EIEC
Toksin	LT/ST	-	Shiga veya Vero toksin	-
İnvaziv	-	-	-	+
İntimin	-	+	+	-
Enterohemolizin	-	-	+	-
Dışkı	Sulu	Sulu ve Kanlı	Sulu, Çok Kanlı	Mukoid, Kanlı
Ateş	Düşük	+	-	+
Fekal lökosit	-	-	-	+
İlgili Barsak	İnce Barsak	İnce Barsak	Kolon	Kolon,kısmen ince barsak
Seroloji	Çeşitli	O26, O111 ve diğerleri	O157:H7, O26,O111 ve diğerleri	Çeşitli
IDb	Yüksek	Yüksek	Düşük	Yüksek

LT=labil toksin (ısıya dirençsiz toksin), ST=stabil toksin (ısıya dirençli toksin) I<sub>d</sub><sup>b</sup>=infektif doz.

Bu araştırmada, Aydın ilindeki çeşitli mandıra ve peynir işletmelerinde üretilen, market, pazar ve mandıra satış noktalarında tüketiciye sunulan taze peynirlerde *E. coli* varlığının araştırılması ve izole edilen suşlar arasındaki ekolojik çeşitliliğin saptanması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Çalışmada, Aydın ili ve çevresinde farklı mandıralarda üretilip, mandıra satış noktalarında, marketlerde ve semt pazarlarında satışa sunulan

taze peynirler koliform bakteri sayısı ile *E. coli* varlığı yönünden incelendi. Bu amaçla çeşitli satış noktalarından toplam 100 taze peynir numunesi, her bir numunedan 250 gram olacak şekilde steril poşetler içerisinde soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarına getirildi.

***E. coli* İzolasyon ve İdentifikasyonu:** Toplanan peynir örneklerinden aseptik şartlarda alınan 10'ar gram peynir numunesi stomacher torbalarına konulup, üzerine 90 ml steril fizyolojik peptonlu su

(Oxoid LP0005, Fluka 70179) ilave edilerek Stomacherde (Bag mixer, Interscience, France) 2 dakika boyunca homojenize edildi. Elde edilen homojenizattan seri dilüsyonlar hazırlanarak Violet Red Bile Agar'a (Oxoid CM0107) çift katlı dökme plak yöntemi ile inokulasyonlar yapıldı ve takibinde 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda besiyerinde oluşan 1-2 mm çaplı koyu kırmızı koloniler sayılıp, sonuçlar log<sub>10</sub> tabanına göre koloni oluşturan birim/gram (kob/g) olarak değerlendirildi [12,24]. Koliform sayımından sonra VRB Agar'da üreyen kırmızı zonlu tipik kolonilerden 5 adet alınarak içerisinde Durham tüpü bulunan Lactose Broth'a (Oxoid CM0137) inokule edilip 44°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda gaz ve bulanıklık oluşturan tüplerden Eosine Methylene Blue Agar (EMB) (Oxoid CM0069) ve MUG supplement (Oxoid BR0071) içeren Violet Red Bile Agar'a (Oxoid CM0107) öze ile ekim yapılarak 37°C'de 24 saat bekletildi. EMB Agar'da metalik röfle ve MUG'lu VRB Agar'da uzun dalga boylu (366 nm) UV lambası ile floresan ışımaya veren kolonilere identifikasyon için İndol, Metil Red, Voges Proskauer ve Citrate (IMViC) testleri uygulandı [12,24]. Aynı peynir örneğinden izole edilen

*E. coli* suşları aynı numara ve farklı harflerle kodlandırıldı.

#### ***E. coli* izolatlarının PCR ile identifikasyonu:**

**DNA Ekstraksiyonu:** PCR'da kullanılmak üzere *E. coli* izolatlarından total DNA ekstraksiyonu kaynatma yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu amaçla şüpheli koloniler nutrient agara ekildi ve 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Koloniler öze yardımı ile toplanarak, 500 µl DNase-RNase free ependorf tüpünde deiyonize su ile süspanse edildi ve 100°C'de 10 dk kaynatıldı. Daha sonra 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek üstteki sıvı PCR'da hedef DNA olarak kullanılmak üzere saklandı [5].

**PCR Amplifikasyonu:** PCR identifikasyonunda Abd El-Razik ve ark [1]'nin kullandıkları protokol modifiye ve optimize edildi. PCR amplifikasyonu 50 µl son hacim içinde gerçekleştirildi. Ekstrakte edilmiş 200 ng DNA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X PCR buffer, 1 µM primer, 0,2 mM dNTP ve 2 U Taq polimeraz içeren PCR karışımı hazırlandı. Amplifikasyon koşulları olarak 95°C'de 2 dk ilk denatürasyon, 35 siklus olmak üzere 94°C'de 45 sn denatürasyon, 57°C'de 45sn bağlanma, 72°C'de 45 sn uzama ve son siklustan sonra 72°C'de 10 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı.

**Tablo 2.** *E. coli* izolatlarının tür düzeyinde identifikasyonu için kullanılan oligonükleotid primerler.

Hedef bakteri	Oligonükleotid primer dizilimi	Bant büyüklüğü (bp)	Kaynak
<i>E. coli</i>	F 5'-GCTTGACACTGAACATTGAG-3' R 5'-GCACTTATCTCTCCGCATT-3'	662	Abd El-Razik ve ark. [1]

**Amplikonların Görüntülenmesi:** Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren % 1,5'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Görüntüleme sonrasında 662 bp'lik bant görülmesi *E.coli* için pozitif olarak değerlendirildi.

**İzolatların Genotiplendirilmesi:** Tüm izolatlar ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus)-2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3') primeri kullanılarak RAPD-PCR profillerinin belirlenmesi sonrasında genotiplendirildi. RAPD-PCR amplifikasyonu Versalovic ve ark [31] tarafından bildirilen metodun modifiye edilmesiyle gerçekleştirildi. Bu aşamada deiyonize su, 1XPCR Buffer, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM her bir dNTP, 2,5 U

Taq DNA polimeraz, 25 pmol primer ve 5 µl template DNA içeren 25 µl'lik PCR karışımı oluşturuldu. Bu karışım 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 1 dk denatürasyon, 40°C'de 1 dk bağlanma, 72°C'de 3 dk uzama olmak üzere 40 siklus ve 72°C'de 7 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren % 1,5'lük agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Oluşan RAPD paternlerinin dendrogramları UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) metodu ile Quantity One (BioRad) dendrogram ve görüntü analiz programı kullanılarak çizildi.

## Bulgular

**İzolasyon ve İdentifikasyon bulguları:** Peynir numuneleri koliform bakteri sayısı açısından değerlendirildiğinde 100 adet peynir numunesinin 77 adetinde (% 77) belirlenen dilüsyonlarda üreme saptandı. İncelenen peynir numunelerinin koliform

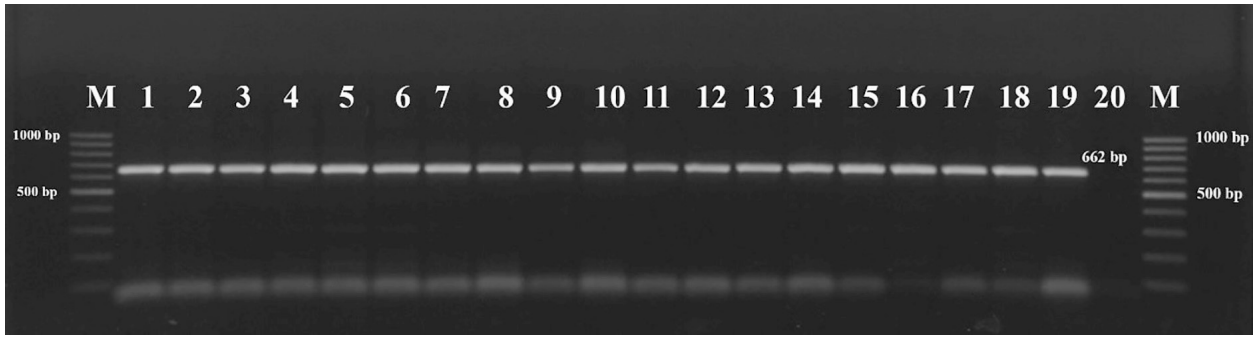
bakteri sayısı sonuçları Tablo 3'te gösterilmiştir. İncelenen peynir numunelerinin 22 adetinde (% 22) *E. coli* varlığı tespit edildi. Pozitif olan numunelerden 44 adet *E. coli* izolatu elde edildi (Aynı peynir örneğinden izole edilen *E. coli* suşları aynı numara ve farklı harflerle kodlanarak gösterildi).

**Tablo 3.** İncelenen peynir numunelerinin koliform bakteri sayısı sonuçları.

Koliform Bakteri Pozitif Numune Sayısı (77)	Koliform Bakteri Sayısı (log <sub>10</sub> kob/g)		
	Minimum	Maksimum	Ortalama
	2,47	6,54	4,83

**PCR Bulguları:** Fenotipik olarak *E. coli* şüpheli izolatların PCR ile analizi sonrasında 44 adet izolatın 662 bp.'lik ürün verdiği görüldü ve identifi-

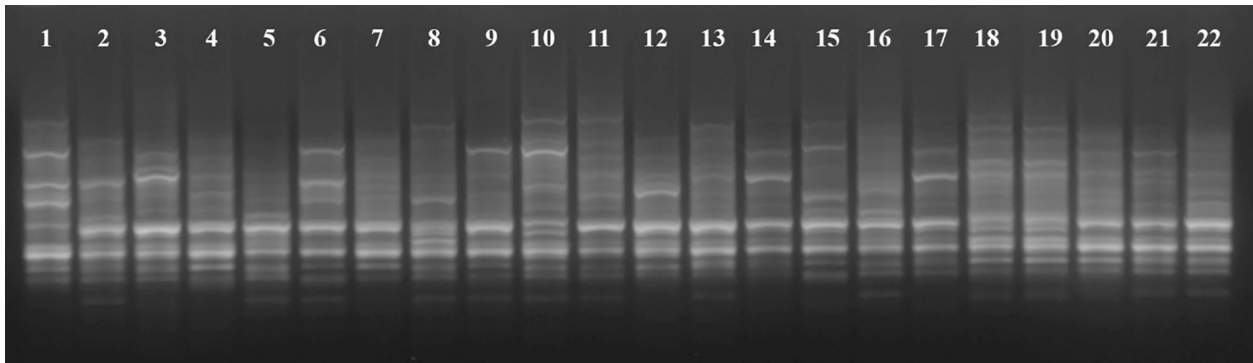
kasyonu (Resim 1). Bu sonuçlara göre incelenen 44 adet izolat da *E. coli* olarak identifiye edildi.



**Resim 1.** *E. coli* PCR sonuçları. M: marker (100 bp, Fermentas); 1-19: *E. coli* (662 bp), 20: negatif kontrol (*Staphylococcus aureus*).

**Genotiplendirme ve Filogenetik Analiz:** *E. coli* olarak identifiye edilen 44 adet izolatın genotiplendirmesi amacıyla ERIC-2 primeri kullanılarak gerçekleştirilen işlem sonucunda 22 farklı RAPD-

PCR profili tespit edildi (Resim 2). Onbir RAPD-PCR profiline tek bir izolat düşerken, diğer 11 profil içinde % 100 düzeyinde homoloji gösteren 2-6 izolat yer aldı.



**Resim 2.** İncelenen *E. coli* izolatlarının RAPD profilleri.

Dendrogramın % 100 eşik değeri belirlenerek yapılan analizi sonucunda izolatların 11 adet tekli genotip ve 11 adet küme oluşturduğu belirlendi. Kümelerin 5 adetinin 2 izolat, 3 adetinin 3 izolat, 2 adetinin 4 izolat ve 1 adetinin de 6 izolattan oluştuğu saptandı (Tablo 4).

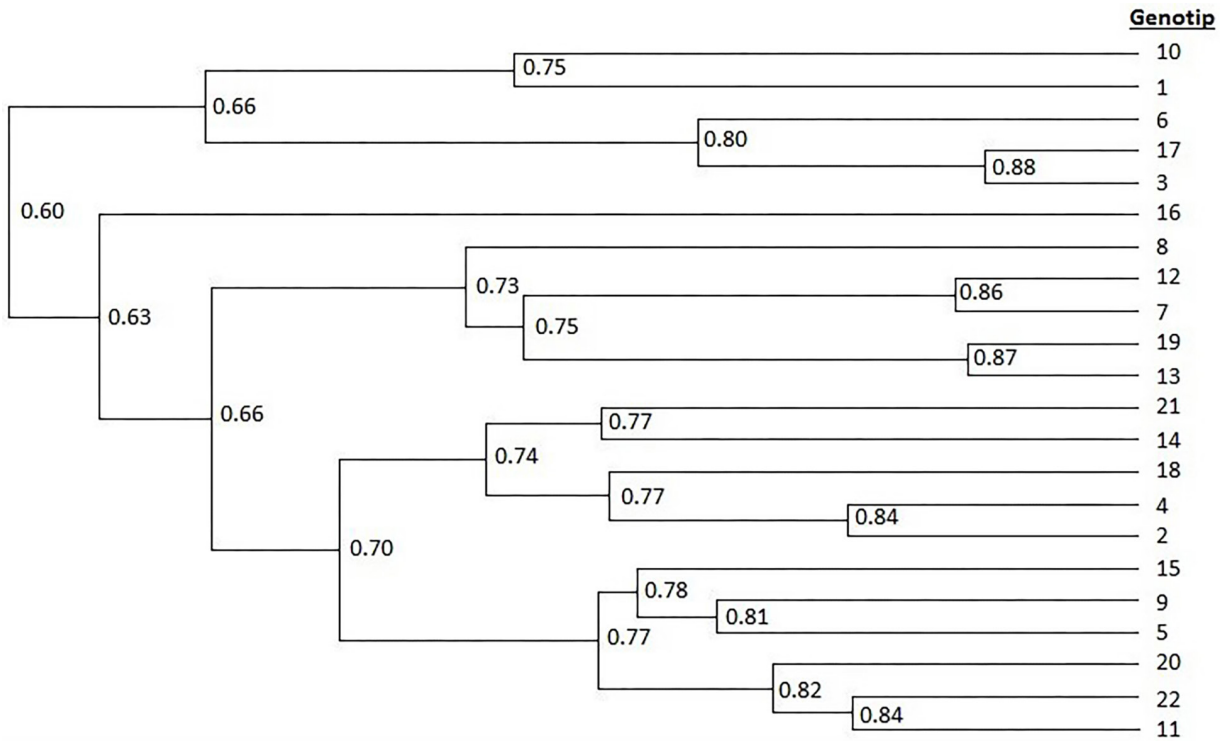
RAPD-PCR profillerinin UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) ile yapılan filogenetik analizlerinin sonucu Şekil 1'de gösterilmiştir. Buna göre, belirlenen 22 genotip arasında 0,60-0,88 katsayı (% 60-88) arasında homoloji görüldü.

Çalışmada 7 genotipte (1, 2, 7, 12, 20, 21, 22) sadece birer peynir örneğine ait suşlar yer aldı. Bununla birlikte 7 genotip içinde (5, 6, 9, 11, 13, 14, 17) farklı peynir örneklerinden izole edilen suşlar aynı genotip içinde yer aldı (Tablo 5).

Diğer bir açıdan değerlendirildiğinde 6 peynir örneğinden farklı genotiplerde yer alan farklı suşlar (25.örnek 3.ve 5. genotip, 27.örnek 4. ve 5. genotip, 32. örnek 6. ve 8. genotip, 37. örnek 9. ve 10. genotip, 73. örnek 11., 15. ve 16. genotip, 84. örnek 18. ve 19. genotip) elde edildi (Tablo 5).

**Tablo 4.** RAPD-PCR sonucunda saptanan genotiplerde yer alan izolatlar ve sayıları.

Genotip	Bakteri no	n
1	20B3A	1
2	22B3A	1
3	25B2B	1
4	27B2B, 27B2A	2
5	25B3A, 27B3A	2
6	30B3B, 32B3A, 32B3B	3
7	33B2A	1
8	32B3A	1
9	35B3A, 35B3B, 37B2B, 37B3A	4
10	37B3B	1
11	44B3B, 44B4B, 44B3A, 73-3A	4
12	62B3A	1
13	63B3, 68B4	2
14	71-3A, 71-4A, 69-4A	3
15	73-3B	1
16	73-4A	1
17	75-3B, 75-4A, 75-4B, 78-3A, 78-3B, 78-4B	6
18	84-3A, 84-3B	2
19	84-4A	1
20	91-3A	1
21	99-4A,99-4B	2
22	100-3A,100-4A,100-4B	3



**Şekil 1.** İncelenen *E. coli* izolatlarının filogenetik yakınlık analizi sonucunda oluşturulan dendrogram (1 katsayı x 100 = % homoloji).

**Tablo 5.** Belirlenen genotiplerin peynir örneklerine dağılımı.

GENOTİP*	PEYNİR ÖRNEK (BAKTERİ No.)																						
	20	22	*25	*27	30	*32	33	35	*37	44	62	63	68	69	71	*73	75	78	*84	91	99	100	
***1	+																						
***2		+																					
3			+																				
4				+																			
**5			+	+																			
**6					+	+																	
***7							+																
8						+																	
**9								+	+														
10									+														
**11										+						+							
***12											+												
**13												+	+										
**14														+	+								
15																+							
16																+							
**17																	+	+					
18																			+				
19																			+				
***20																				+			
***21																						+	
***22																							+

\*\*\*7 genotipte sadece birer peynir örneğine ait suşlar yer aldı. \*\*7 genotip içinde farklı örneklerden izole edilen suşlar aynı genotip içinde yer aldı.  
\*6 örnekten farklı genotiplerde yer alan farklı suşlar elde edildi.

## Tartışma ve Sonuç

İnsan ve hayvanların barsak florasında bulunan *E. coli* canlı için genellikle zararsız bir bakteri olarak kabul edilmektedir. Bazı patojenik türleri gıdaları kontamine edebilmekte veson yıllarda artış gösteren salgınlarda, her yıl yüzbinlerce insanın etkilendiği, yüzlercesinin de öldüğü saptanmıştır. Bu gıda zehirlenmelerinde kaynak insan veya hayvan dışkıdır. Kontaminasyon yolu oldukça kompleks olabilmekte ve insanlar, hayvanlar, bitkiler ile tüm bunların ekosistemle etkileşimleri kaynak oluşturmaktadır. Konakçı kaynak, sanitasyon ve hijyen düzeyleri, tarımsal sistemler, gıda üretim yöntemleri, bakterinin epidemiyolojisi üzerine etkili unsurlar olarak karşımıza çıkmaktadırlar [9].

Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), 2014 yılında çiğ süten yapılmış 60 günlük peynirlerin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi amaçlı bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada 19 Şubat 2014 ile 3 Kasım 2015 tarihleri arasında 1606 adet peynir örneği toplanmıştır. Toplanan bu örneklerin 473 adetinin (% 29) yerli üretim tarzında üretildiği, 1133 adetinin (% 71) ise uluslararası peynir tiplerinden oluştuğu belirtilmiştir. Yerel peynir örnekleri üretim noktaları, depolar ve satış noktalarından, dış kaynaklı peynir örneklerinin ülkeye giriş noktası olan liman ve benzeri yerlerden, iç piyasaya sunulmadan önceki son kontrol noktalarından toplanmıştır. Bu çalışma sonucunda, 1606 adet örneğin 87 adetinde *E. coli* saptandığı, çalışmanın bütünündeki kontaminasyon oranının ise % 5.4'ü olduğu be-



İrtilmiştir. *E. coli* saptanan örneklerden 18 adetinin yerel peynir, 69 adetinin dış kaynaklı peynir olduğu saptanmıştır. Toplam 1606 adet örneğin hiçbirinde *E. coli* O157:H7 bulunmadığı bildirilmiştir. Araştırmada 1606 örnekten 11 adetinde Shiga toksin üreten *E. coli* saptandığı, bu 11 adet örnekten 1 adetinde de patojenik serotip O111:H8 bulunduğu bildirilmiştir [10]. Madic ve ark. [20], çiğ süttten üretilen peynirlerde, Multiplex Real-Time PCR tekniğini kullanarak, 400 örnekte Shiga toksin üreten *E. coli* taraması yapmışlardır. Bu çalışmada 5 temel patojenik serotip olan O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 ve O157:H7 serotiplerini araştırmışlar, 26 örnekte (% 6,5) bu serotiplerde Shiga Toksin üreten *E. coli* bulduklarını bildirmişlerdir. Quinto ve Cepeda [23], yumuşak peynirlerde toksijenik *E. coli* insidensini araştırmak için yaptıkları çalışmada, 221 adet çiğ süttten yapılmış, 75 adet pastörize süttten yapılmış peynir örneklerini analiz ettiklerini, enterotoksijenik, verotoksijenik, nekrotoksijenik *E. coli* serotiplerini çalıştıklarını belirtmişlerdir. Pastörize süttten üretilen peynir örneklerinde toksijenik *E. coli* izole etmediklerini, çiğ süttten üretilen peynir örneklerinin 3 adetinde (% 1,35) toksijenik *E. coli* saptadıklarını bildirmişlerdir. Paneto ve ark. [21], Orta-Batı Brezilya'da satılan, çiğ süttten üretilmiş peynirlerde toksijenik *E. coli* varlığını araştırmak için planladıkları çalışmada, farklı marketlerden 50 adet örnek topladıklarını, analiz yöntemi olarak PCR tekniğini kullandıklarını bildirmişlerdir. Çalışma sonunda 48 adet (% 96) örnekte *E. coli* saptadıklarını, bunlardan % 6'sının O125, % 4'ünün O111, % 2'sinin O55, % 2'sinin O119 serotiplerinde olduğunu belirtmişlerdir. Stephan ve ark. [25], İsviçre'de çiğ süttten üretilen peynirlerde STEC varlığını, serotiplerini saptamak amacıyla planladıkları araştırmada, ülke genelindeki üreticilerden Mart 2006-Aralık 2007 tarihleri arasında 796 adet örnek topladıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, 2006 yılında toplanan 432 örnekten 16 adetinde (% 3,7), 2007 yılında toplanan 364 örnekten 23 adetinde (% 6,3) STEC saptadıklarını belirtmişlerdir. Ahmed ve ark. [2], Mısır'da üretilen taze peynirlerde (Damietta ve Kareish) fekal koliform ve enteropatojenik *E. coli* varlığını araştırmak amacı ile 100 adet örnek topladıklarını, Damietta peynir örneklerinin % 2'sinde *E. coli* düzeyinin  $\geq 10^3$  kob/g, Kareish peynir örneklerinin % 84'ünde *E. coli* düzeyinin  $10-10^3$  kob/g olduğunu bildirmişlerdir. *E. coli* saptanan 46 adet Damietta ve

Kareish peynir örneklerinin 15 adetinin O125:B15, O25:K11, O128:B12, O126:B16 ve O111:B4 enteropatojenik *E. coli* (EPEC) ile kontamine olduğunu belirtmişlerdir. Ladan ve Reza [19], İran yerel taze peynirlerinde enteropatojenik *E. coli* (EPEC) kontaminasyon varlığını araştırmak amacıyla güney-batı İran, Kerman bölgesindeki satış noktalarından 77 adet örnek topladıklarını bildirmişlerdir. Topladıkları 77 adet örnekten 76 adetinde (% 98,70) *E. coli* izole ettiklerini, bunlardan 15 adetinde de (% 19,48) enteropatojenik *E. coli* (EPEC) saptadıklarını bildirmişlerdir. Tekinşen ve Özdemir [27], Van otlu peynirinde gıda kaynaklı patojenlerin varlığını araştırmışlar, bu amaçla olgunlaşmamış 50 adet peynir örneği topladıklarını belirtmişlerdir. Araştırma sonucunda, 31 adet (% 62) örnekte *E. coli* izole ettiklerini, kontaminasyon düzeyinin 3,68 log kob/g olduğunu bildirmişlerdir. Keskin ve ark. [17], semt pazarlarında satılan beyaz peynirlerin mikrobiyolojik kalitesinin araştırılması amaçlı planladıkları çalışmada, İstanbul Üsküdar Belediyesine bağlı 20 semt pazarındaki 50 beyaz peynir satıcısından, 2004 yılı Ocak-Mart aylarında peynir örnekleri aldıklarını, örneklerin % 96'sında koliform bakteri, % 86'sında *E. coli* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Kaynar ve ark. [16], Ankara piyasasında tüketime sunulan beyaz peynirlerin hijyenik kalitelerinin belirlenmesi üzerine yaptıkları araştırmada, Ankara ili Ulus semtindeki marketlerden 30 adet peynir örneği aldıklarını, 21 adet örnekte koliform grubu bakteri izole ettiklerini, bu örneklerin 18 adetinde de  $7,3 \times 10^1 - 2,4 \times 10^2$  kob/g düzeyinde fekal koliform ve *E. coli* saptadıklarını bildirmişlerdir. Doğan ve ark. [6], çeşitli gıdalarda koliform, fekal koliform, *E. coli* varlığının araştırılması amaçlı yaptıkları çalışmada, topladıkları 97 adet peynir numunesinin % 78,4'ünde koliform bakteri, % 75,3'ünde fekal koliform, % 72,2'sinde *E. coli* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bingöl ve ark. [4], İstanbul'da satılan peynirlerde enterotoksin ve verotoksin varlığının araştırılması amacıyla yaptıkları çalışmada, topladıkları 150 adet peynir numunesinden 55 adetinde (% 36,66) *E. coli* izole ettiklerini, 3 peynir örneğinde *E. coli* O157 saptadıklarını, hiçbir peynir örneğinde O157:H7 izole edilmediğini bildirmişlerdir. Arslan ve Özdemir [3], Türk ev yapımı beyaz peynirlerde *E. coli* O157'nin araştırılması amacıyla Bolu ilindeki açık halk pazarlarından, çiğ süttten ya da yetersiz pastörizasyon işlemi uygulanmış sütlere

den üretilmiş, ev yapımı 245 adet beyaz peynir örneği topladıklarını belirtmişlerdir. Toplam 245 adet peynir örneğinin 21 adetinde (% 9,4) *E. coli* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Gelişmiş olan ülkelerde taze peynirlerde *E. coli* varlığının, düzeylerinin saptanması amacı ile yapılan çalışmalarla ilgili incelenen makalelerdeki bulgulara göre, araştırmacılar taze peynirlerde % 5-% 6,5 düzeylerinde *E. coli* saptadıklarını, elde edilen bu sonuçların bir kısmının insanlarda oluşan salgınlarla ilişkilerinin belirlendiğini bildirmişlerdir [10,20]. Bu çalışmada taze peynir örneklerinde % 22 düzeyinde *E. coli* izole edilmiş olup, bu düzeyin gelişmiş olan ülkelerdeki saptanan düzeylere göre oldukça yüksek olduğu belirlendi. Bu sonuç, taze peynirlerde hijyen probleminin olduğunu ve elde edilen *E. coli* prevalansının halk sağlığı açısından önemli risk oluşturabileceğini göstermiş olup, bu konuda etkin çalışma ve eğitimlerin yapılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Gelişmekte olan ülkelere taze peynirlerde *E. coli* varlığının, düzeylerinin saptanması amacı ile yapılan çalışmalarla ilgili incelenen makalelerdeki bulgulara göre, araştırmacılar % 46-% 98 düzeylerinde *E. coli* saptadıklarını bildirmişlerdir [2,19]. Bu saptanan düzeyler çalışmamızda saptadığımız % 22 *E. coli* düzeyinin oldukça üzerindedir. Bu sonuç, gelişmekte olan ülkelere göre peynir hijyeni ve teknolojisi açısından daha iyi bir noktada olduğumuzu göstermektedir.

Ülkemizde taze peynirlerde *E. coli* varlığının, düzeylerinin saptanması amacı ile yapılan çalışmalarla ilgili incelenen makalelerdeki bulgulara göre, Bolu ilinde yapılan çalışmada *E. coli* düzeyi % 9,4 olarak bildirilmiş [3], diğer çalışmalarda ise % 36 - % 86 düzeylerinde *E. coli* saptandığı bildirilmiştir [4,17]. İncelenen makalelerdeki çalışmaların yapıldığı iller ve sonuçlar karşılaştırıldığında, illerin coğrafi konumunun, ekonomik gelişmişliğinin saptanan *E. coli* düzeyleri üzerinde etkisinin olmadığı gözlemlendi. Bu çalışmada saptanan % 22 *E. coli* düzeyinin, ülkemizdeki sonuçlara göre düşük olduğu belirlenmiş ancak halk sağlığı açısından önemli riskler oluşturabilecek düzeyde olduğu saptanmıştır.

Bu çalışma ile ilk kez Aydın ilinde taze peynir örneklerinden izole edilen *E. coli* izolatlarının filogenetik analizleri yapıldı. İzole edilen *E. coli* izo-

latlarının RAPD-PCR ile genotiplendirilmeleri ve filogenetik yakınlık analizleri sonucunda izolatların 22 farklı genotipe sahip olduğu ve bu genotiplerin % 60-88 arasında benzerliklere sahip oldukları belirlendi. Dendrogramın değerlendirilmesi ile izolatların 11 adet tekli genotip, 11 adet küme içerisinde yer aldığı saptandı. Kümelerin 5 adetinin 2 izolat, 3 adetinin 3 izolat, 2 adetinin 4 izolat ve 1 adetinin de 6 izolattan oluştuğu görüldü. Halk sağlığı açısından önemli riskler oluşturan *E. coli*'nin peynirlere bulaşma yollarının ve aşamalarının çok çeşitliliği, bu çalışmada 22 farklı genotip saptanması ile ortaya konuldu. RAPD-PCR sonucunda % 60-88 arasında benzerlik gösteren 22 farklı genotip tespit edilmesi bölgedeki peynirlerde bulunan *E. coli* suşlarının ekolojik çeşitliliğini gösterdi. Bu çeşitlilik *E. coli*'nin peynirlere bulaşma yollarının farklılığından kaynaklanabileceğini düşündürdü. Bu ekolojik çeşitlilik de halk sağlığı açısından önemli riskler oluşturan *E. coli*'nin peynirlere bulaşma yollarının ve aşamalarının daha net saptanması ve kritik kontrol noktalarının daha etkin şekilde belirlenmesinin gerekliliğini göstermektedir.

## Kaynaklar

1. Abd El-Razik KA, Abderrahman KA, Ahmed YF, Gomaa AM, Eldebaky HA, (2010). Direct Identification of Major Pathogens of the Bubaline Subclinical Mastitis in Egypt using PCR. *Journal of American Science*, 6(10), 652-660.
2. Ahmed AH, Ahmed SH, Moustafa K, (1988). Occurrence of Fecal Coliforms and Enteropathogenic *Escherichia coli*(EEC) in Egyptian Soft Cheese. *Journal of Food Production*, 51 (6), 442-444.
3. Arslan S, Özdemir F, (2013). Investigation of *Escherichia coli* O157 in Turkish homemade White Cheese. *Istanbul University Faculty of Science Journal of Biology*, 72(1), 45-51.
4. Bingöl BE, Çetin Ö, Çolak H, Hampikyan H, (2012). Presence of enterotoxin and verotoxin in Turkish cheeses sold in İstanbul. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 36(4), 424-432.
5. Çiftçi A, Fındık A, Onuk EE, Savasan S, (2009). Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 254-261.
6. Doğan BH, Çakır İ, Keven F, Coşansu S, Kırıl N, Dağar İT, Gürsu G, Halkman KA, (2001). Çeşitli Gıdalarda Koliform, Fekal Koliform ve *E. coli* Varlığı. *Gıda*, 6(2), 83-90.
7. Dufty G, Whiting R, Sheridan J, (1999). The Effect of Competitive Microflora, pH and temperature on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, 16, 299-307.

8. Ergüllü E, (1980). Beyaz peynirlerin olgunlaşması sırasında mikrofloranın, özellikle gaz yapan bakterilerin değişimi üzerine araştırmalar. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, s.21.
9. Food and Agriculture Organisation (FAO), (2011). Preventing *E. coli* in Food, 231.
10. Food and Drug Administration (FDA), (2016). FY 2014-2016 Microbiological Sampling Assigment. Summary Report: Raw Milk Cheese Aged 60 days. Office of Compliance, Center for Food Safety and Applied Nutrition.
11. Food and Drug Administration (FDA), (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. Authors: Peter Feng, Stephen D. Weagent, Karen Jinneman. Bacteriological Analytical Manual, Chapter 4A.
12. Halkman KA, (2005). Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Başak Matbaacılık, Ankara, 141-182.
13. Halkman KA, (2013). Gıda Mühendisliği II. Ders Notları, Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara, 24-31.
14. Heperkan D, Sarıyar L, Aytakin A, (1994). Peynirlerde *Escherichia coli* Gelişmesi ve Hijyenin Önemi. Animal, 9, 87-95.
15. Kaper JB, Natro JP, Mobely HLT, (2004). Pathogenic *E. coli* Natural. Review. Microbiology, 2, 123-140.
16. Kaynar Z, Kaynar P, Koçak C, (2005). Ankara Piyasasında Tüketime Sunulan Beyaz Peynirlerin Hijyenik Kalitelerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Türk Hijyen Deneysel Biyoloji Dergisi, 62(1,2,3), 1-10.
17. Keskin Y, Özyaral O, Başkaya R, Susur M, (2006). Semt pazarlarında satılan beyaz peynirlerin mikrobiyolojik kalitesinin araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 36, 9-19.
18. Kousta M, Mataragos M, Skandomis P, Drosinos EH, (2010). Prevalance and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. Food Control, 21(6), 808-815.
19. Ladan NM, Reza G, (2006). A study on enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from domestic Iranian soft cheese. The Journal of Veterinarski Arhiv, 76, 531-536.
20. Madic J, Vingadassalon N, Garam P, Marault M, Scutz F, Brugere H, Jamet E, Auvrey F, (2011). Detection of Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* Serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 and O157:H7 in Raw Milk Cheeses by Using Multiplex Real-Time PCR. Applied and Environmental Microbiology, 2035-2041.
21. Paneto BR, Hurrino SRP, Macedo C, Santo E, Marin JM, (2007). Occurence of toxigenic *Escherichia coli* in raw milk cheese in Brazil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia, 59(2).
22. Pamela L, Rinemann D, Kathryn H, (2008). The Effect of Milking Management on Microbial Quality Presented at XII. Curso. Novas Enfoques Na produçose reproduced de Bovinos, Uberlandia, Brazil.
23. Quinto EJ, Cepeda A, (1997). Incidence of toxigenic *Escherichia coli* in soft cheese made with raw or pasteurized milk. Letters in Applied Microbiology, 24, 291-295.
24. Roberts D, Greenwood M, (2003). Practical Food Microbiology. 3rd edition, Blackwell Publishing, 150-170.
25. Stephan R, Schumacher S, Corti S, Krause G, Danuser J, Beutin L, (2008). Prevalence and Characteristics of Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* in Swiss Raw Milk Cheeses Collected AT Producer Level. Journal of Dairy Science, 91(7), 2561-2565.
26. Tan S, Ertürk YE, (2002). Peynir. TEAE Bakış Dergisi, 1(11), 1-4.
27. Tekinşen KK, Özdemir Z, (2006). Prevalence of the foodborne pathogens in Turkish Van otlı (herb) cheese. Food Control, 17(9), 707-711.
28. Töreci K, (2002). *Escherichia* türleri. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 2.baskı, 1564-1574.
29. Tunail N, (1999). Mikrobiyel enfeksiyonlar ve intoksikasyonlar. In: Akçelik M, Aydar LY, Ayhan K, Çakır İ, Doğan HB. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Armoni Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 59-90.
30. Üçüncü M, (2013). Süt ve Mamülleri Teknolojisi. Meta Basım Matbaacılık, İzmir.
31. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR, (1991). Distribution of repetitive DNA sequences to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research, 19(24), 6823-6831.

## Türkiye’de Sık Rastlanan *Salmonella* Enteritidis Serovarlarına Spesifik Bakteriyofajların İzolasyonu

Zafer Ata

Askeri Veteriner Okulu ve Eğitim Merkezi Komutanlığı Gıda Kontrol ve Araştırma Merkezi Başk., Gemlik, Bursa

Geliş Tarihi / Received: 18.11.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 30.11.2018

**Özet:** Birçok ülkede önemli halk sağlığı sorunu olan *S. Enteritidis*, hayvanlardan ve gıdalardan izole edilen en yaygın *Salmonella* serotiplerinden biridir. Hayvanların bakteriyel infeksiyonlarının kontrolünde bakteriyofaj kullanımı, son yıllarda üzerinde araştırma yapılan konular arasındadır. Bu çalışmada, ülkemizde kanatlılardan en çok izole edilen *Salmonella* serotiplerinden biri olan *S. Enteritidis* (15 adet), bakteriyofajların konak hedef hücreleri olarak kullanıldı. Virulent bakteriyofajların izolasyonu ve zenginleştirilmesi amacıyla overlay-agar yöntemi seçildi. İzole edilen bakteriyofajların hedef bakteri suşları üzerindeki litik aktiviteleri spot test uygulaması ile belirlenerek değerlendirildi. Türkiye’nin farklı bölgelerinde bulunan ticari broyler tesislerinden *S. Enteritidis* üzerinde litik etki gösteren fajların izolasyonu için alınan toplam 78 adet örnek (tavuk dışkı, kümes atık suları, kümes altlık) bakteriyofaj izolasyonu amacıyla test edildi. Bu örneklerden toplam 22 adet *S. Enteritidis*’e spesifik fajın purifikasyonu gerçekleştirildi. Yapılan bu çalışmada, Af1-Ka ve Af3-Ka fajları, test edilen 15 adet *S. Enteritidis* suşunu sırasıyla %78’ini ve %71’ini lize ederek geniş bir konak spektrumu göstermiştir. Bu iki bakteriyofajın ileri faj karakterizasyonu ve tiplendirilmesinin yapılmasıyla, kanatlı endüstrisindeki bakterileri kontrol etmede kullanılacak etkili bakteriyofajın seçilmesi için bir temel oluşturulmasında yardımcı olabileceği kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Bakteriyofaj, Biyokontrol, İzolasyon, *Salmonella* Enteritidis

### Isolation of Bacteriophages Specific to *Salmonella* Enteritidis Serovars Common in Turkey

**Abstract:** *S. Enteritidis*, an important public health problem in many countries, is one of the most common *Salmonella* serotypes isolated from animals and foods. The use of bacteriophage in the control of bacterial infections of animals is among the topics that have been researched in recent years. In this study, *S. Enteritidis* (15), one of the most frequently isolated *Salmonella* serotypes in Turkey, was used as host target cells of bacteriophages. Overlay-agar method was chosen for the isolation and enrichment of virulent bacteriophages. The lytic activities of the isolated bacteriophages on the target bacterial strains were determined by spot test application. Total of 78 samples (chicken manure, poultry waste waters, poultry litter) taken from commercial broiler facilities located in different regions in Turkey was tested for isolation of phage that had a lytic effect on *S. Enteritidis*. A total of 22 *S. Enteritidis* specific phages were purified from these samples. In this study, Af1-Ka and Af3-Ka phages showed a wide host spectrum by lysing 78% and 71% of the 15 *S. Enteritidis* strains tested respectively. It has been concluded that advanced phage characterization and typing of these two bacteriophages can help to establish a basis for selecting the effective bacteriophage to be used in controlling the bacteria in the poultry industry.

**Keywords:** Bacteriophage, Biocontrol, Isolation, *Salmonella* Enteritidis

### Giriş

*Salmonella* infeksiyonları Türkiye’de kanatlı hayvan yetiştiriciliğinin en önemli problemlerinden birisidir [3]. Önemli bir zoonoz olan *Salmonella* infeksiyonları kanatlı hayvanlarda verim düşüklüklerine, önemli hastalık tablolarına ve ölümlere neden olmaktadır. Buna ek olarak; özellikle kanatlı hayvanlarda görülen *Salmonella* infeksiyonları insanlarda gıda zehirlenmelerine neden olan bulaşma kaynaklarının başında gelmektedir. Yukarıda sayılan nedenlerle kanatlılarda salmonellaların bulunması;

bu hayvanların yetiştiriciliğinden halk sağlığına kadar farklı alanları ve sektörleri etkilemektedir [2].

Son yıllarda antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalara karşı kullanmak amacıyla yapılan bakteriyofaj çalışmalarında artış olmuştur. Fajla terapi uygulamaları geçtiğimiz yüzyılın başlarında başlamıştır. 1923 yılında Gürcistan’ın Tiflis şehrinde kurulan George Elieva Enstitüsünde birçok hastalığın tedavisinde bakteriyofajlar etkin olarak kullanılmaktadır [17]. Virulent *Salmonella* faj Felix-O1 (FO1) 1930’larda Felix ve Callow tarafından ilk kez tanımlanmıştır [10]. *Myoviridae* üyesi olan bu faj,

*Salmonella* spp. arasında geniş konak özelliğine sahiptir [8].

Fajlar hem gıda ile temas eden yüzeylerde hem de hayvanlarda zoonoz etkenlere karşı kullanılabilirler [4]. Hayvan sağlığı alanında bakteriyofajlar, broylerlerde *E. coli* infeksiyonlarının [14], buzağılarda *E.coli*'ye bağlı ishallerin [5], piliçlerde *S. Typhimurium*'un ve *S. Enteritidis*'in bağırsaklarda ve karaciğerdeki sayılarını azaltmak için kullanılabilirler [4]. Ayrıca *S. Enteritidis* ile infekte tavuklarda hastalığın kontrolünde kullanılan bakteriyofajlar önemli oranda bakteri sayısını azaltabilmektedir [20].

Kanatlı yetiştiriciliğinde *Salmonella* infeksiyonlarının kontrol altına alınması zor bir işlemdir. Kümeslerde ciddi biyogüvenlik tedbirlerinin alınmasını ve birçok antibiyotik kullanımını gerektirmektedir [9]. Karkas yüzeylerinde *Salmonella* gibi enterik patojen kaynaklı yüzey kontaminantlarının sayılarını azaltmak için farklı metotlar kullanılarak yapılan çalışmalar çok uzun yıllara dayanmaktadır. Et üretim tesislerinde yapılan hijyen amaçlı çalışmalar, geniş çapta klorlu suların veya trisodyum fosfat gibi diğer antimikrobiyal ajanların sprey tarzında uygulamalarını kapsamaktadır [21]. *Salmonella* enfeksiyonlarına karşı alınan pahalı ve bir o kadar da zor ve insan sağlığı açısından şüpheli olan bu uygulamalara alternatif başka çözümler gereklidir. Bakteriyosinler (nisin-*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), antimikrobiyal peptidler ve bakteriyofajlar bu sorunun çözümünde doğal antimikrobiyaller olarak rol oynamaktadırlar. Bu grup içinde de bakteriyofajlar doğada geniş çapta bulunmalarının yanında doğal bakteri yiyen ajanlar olarak dikkat çekmektedirler. Doğada, atık sularda ve hayvansal atıklarda bulunabildikleri gibi birçok gıda maddesinde de bulunmaktadırlar. *Salmonella* fajları kanatlı ekstraktlarından, kanatlı çiftlik ortamlarından ve atık su işleme tesislerinden izole edilebilmektedir. Bakteriyofajların yüksek oranda bakteri spesifik özellikleri, toksik olmamaları ve biyofilm oluşumunda birçok mikroorganizmayı kontrol edebilmeleri [16], günden güne bakteriler arasında artan antibiyotik dirençlilikleri, bakteriyofajları veteriner hekimlik ve tip alanında daha önemli yerlere taşımıştır [4].

Literatür taramalarında diğer ülkelerde salmonelları lize eden fajlara ait birçok çalışmanın bulunmasına rağmen, ülkemizde *S. Enteritidis*'e spesifik

faj çalışması bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışma; ülkemizde ve dünyada sık rastlanan paratifo etkenleri arasında yer alan *S. Enteritidis* infeksiyonlarını kontrol etmede etkili olabilecek, ülkemiz coğrafyasından izole edilen *S. Enteritidis* spesifik fajların purifikasyonları ve konakçı seçiciliğinin saptanması (bakteriyofajların *Salmonella* suşları üzerine olan litik etkilerinin belirlenmesi) amacıyla gerçekleştirilmiştir.

## Materyal ve Metot

### Standart Suşlar

Bu çalışmada, *S. Enteritidis* ATCC 13076 suşu, bakteriyofajların konak hedef hücreleri olarak kullanıldı. 2000-2010 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı laboratuvarında izole edilmiş olan kanatlı hayvan orijinli toplam 14 adet *S. Enteritidis* izolatu fajların çalışmaya litik spektrumlarının belirlenmesi amacıyla dahil edildi. Ayrıca *Salmonella enterica* spesifik Felix O1 fajı ile *S. Enteritidis* vB-GES-Se-K1 Tiflis fajından, çalışmanın tüm aşamalarında kontrol fajı olarak faydalandı.

### Virulent Bakteriyofaj İzolasyonu

Bursa, Adapazarı, Afyon, Balıkesir, Bandırma, Düzce bölgelerinde farklı lokalizasyonlarda bulunan kanatlı kümesi tesislerinden *S. Enteritidis* üzerinde litik etki gösteren fajların izolasyonu için alınan tavuk dışkı örnekleri, kümesi atık suları, kümesi altlık olmak üzere, toplam 78 adet örnek (şubat-kasım 2015 tarihleri arasında) bakteriyofaj izolasyonu amacıyla kullanıldı. Laboratuvara taşınan örnekler debris çöktükten sonra 50 ml'lik falkon tüplerde üst sıvı santrifüj edildi (4°C, 13 000 g de 10 dk). Santrifüj sonrası süpernatant kısmı 0,22 µm geçirgenlikteki filtrelerden geçirilerek filtre edildi. Filtre edilen sıvı (filtrat) faj kaynağı olarak kullanıldı. Çalışmada kullanılan konak kültürü 37°C'de Tryptic Soy Broth ve Tryptic Soy Agar'da çoğaltıldı, istenen bakteri konsantrasyonları spektrofotometrik olarak oluşturulan eğriye göre ayarlandı. Bakteriyofaj üremesini indüklemesi nedeniyle çalışma boyunca besiyerleri hazırlanırken, içerisine CaCl<sub>2</sub> eklendi. 5 ml'lik hacimde Brain Heart Infusion Broth (BHIB)'a muhtemel bakteriyofaj içeren filtrattan 5 ml ve 0.1 ml MacFarland 0.5 konak kültürü eklendi. 37°C'de 24

saat boyunca sallayıcı (Nüve SL 350) üzerinde inkübe edildi. Bu işlem 3 gün süreyle tekrar edildi [7].

### Elde Edilen Fajların Purifikasyonu (tek plak izolasyonu)

Fajların litik aktiviteleri kullanılarak izole edilmeleri için overlay-agar ( $\text{CaCl}_2$ 'lü yarı katı BHIB) yöntemi kullanıldı ve bunun için belirli konsantrasyonlarda (MacFarland 0.5) konak kültürü (3-6 saatlik taze kültür) yarı katı agar içerisine eklendi ve bu karışım önceden hazırlanmış dip agar ( $\text{CaCl}_2$ 'lü BHIB) üzerine döküldü. Bu sırada her bir faj stoğunun ayrı ayrı faj plaklarının daha belirgin olmalarının sağlamak amacıyla saline–magnezyum (SM) vasatı kullanıldı. Faj lizatının  $10^{-6}$ - $10^{-11}$ pfu/ml olacak şekilde her plak için fizyolojik tuzlu su (FTS) dilüsyonu hazırlandı. Her faj için 7 plak (petri besi yeri) olmak üzere 6 adet dilüsyon, 1 adet kontrol (fajsız) kullanıldı. Dilüsyonlar hazırlandıktan sonra her dilüsyondan ayrı ayrı hızlıca 100  $\mu\text{l}$  faj dilüsyonu overlay agara (3 ml) eklendi ve sonra hızlıca 300  $\mu\text{l}$  konak bakteri eklenerek pipetajla karıştırıldı. Kontrol plağı için olan overlay agara sadece konak kültür eklendi. Bu karışım yüzeyi kurumuş dip agara döküldü. Bu işlem her dilüsyon için tekrarlandı. Kullanılacak plakların yüzeylerinin kuruması için  $37^\circ\text{C}$ 'de 1-2 saat ters çevrilip bekletildi. Kuruyan plaklar ters çevrilerek 18-24 saat  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edildi. Ertesi gün her petrideki faj plakları tek düştüğü bir bölgeden tek bir plak steril enjektör ucuyla kesilip, steril bir tüp içerisine alındı. Bu tüpe 5 ml BHIB eklenip iyice karıştırılarak fajların besiyerine geçmesi sağlandı. 3-6 saatlik konak kültürden (MacFarland 0.5 konsantrasyonda) tekrar 0.1 ml alınarak bu tüp içine pipetlenerek adsorpsiyonun gerçekleşmesinden sonra 5 ml daha sıvı besiyeri eklendi.  $37^\circ\text{C}$ 'de 24 saat boyunca sallayıcı üzerinde inkübasyonun ardından konak hücre artıklarını uzaklaştırmak için  $4^\circ\text{C}$ , 13 000 g de 10 dk'lık santrifüj işlemi uygulandı. Bu işlemler her overlay agarda aynı morfolojiye sahip plak formasyonu görülene kadar tekrarlanarak faj purifikasyonu tamamlandı. Son olarak purifiye olarak elde edilen süpernatant, 0,22  $\mu\text{m}$  porlu filtrelerden geçirilerek veya %10 kloroform eklenerek faj filtratı olarak kullanıldı. Filtrata %10 kloroform eklenerek  $-20^\circ\text{C}$ 'de bakteriyofajlar saklandı [7].

### Fajların Çoğaltılması

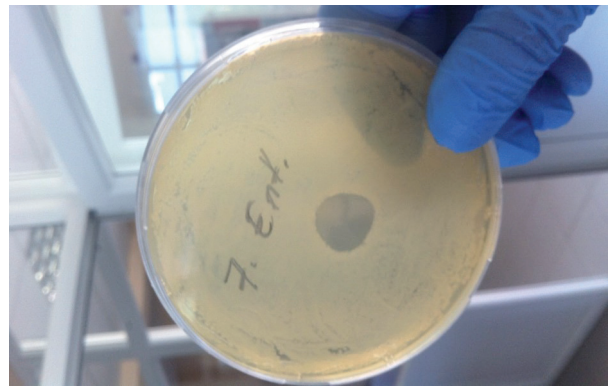
Saf faj filtratının zenginleştirilmesi için kısaca yukarıda anlatıldığı gibi faj ve 3-6 saatlik konak bakteri, sıvı ortamda istenilen titreye ulaşınca kadar pasajlar yapılarak karşılaştırıldı. Titrenin belirlenmesi için son karşılaştırmaya ait faj süspansiyonunun  $10^{-6}$  - $10^{-11}$ 'e kadar FTS içerisinde dilüsyonları hazırlandı ve yine overlay-agar yöntemi kullanıldı [7].

### Bakteriyofajların Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi

İzole edilen bakteriyofajların hedef bakteri suşları üzerindeki litik aktiviteleri spot test uygulaması ile belirlenerek değerlendirildi. Hazırlanan dip agara fajın konak bakteri üzerinde etkili olup olmadığını anlamak amacıyla spot test uygulandı. Bu test için hazırlanan dip agara yayma plak yöntemiyle her bir bakteriden ekim yapıldı. Ekim yapılan dip agara  $10^8$  pfu/ml olan 5-15  $\mu\text{l}$  faj süspansiyonu eklenerek (damlatılarak) 24 saat  $37^\circ\text{C}$  de inkübe edildi. Etüvde  $37^\circ\text{C}$ 'de 18-24 saat inkübasyon sonrasında plak formasyonları değerlendirildi. İnkübasyon sonunda üreme olmayan alanların görülmesi fajın konak bakteri üzerine etkili olduğunu gösterdi [7,13].

### Bulgular

Bakteriyofaj izolasyonu amacıyla kullanılan 78 adet örnekten toplam 22 adet *S. Enteritidis*'e spesifik faj purifiye edildi (Tablo 1). Kanatlı hayvanlardan izole edilen toplam 14 *S. Enteritidis* ve 1 *S. Enteritidis* ATCC 13076 standart suşunun, 22 *S. Enteritidis* fajlarına karşı litik aktiviteleri Tablo 2'de, litik aktiviteye sahip bakteriyofajlara ait spot test ve overlay-agar görünüşleri sırasıyla Şekil 1 ve Şekil 2'de sunuldu.



Şekil 1. Spot test görünümü

**Tablo 1.** Ticari broyler kümeslerden izole edilen *Salmonella* Enteritidis'e özgü bakteriyofajların örneğe ve bölgelere göre dağılımı

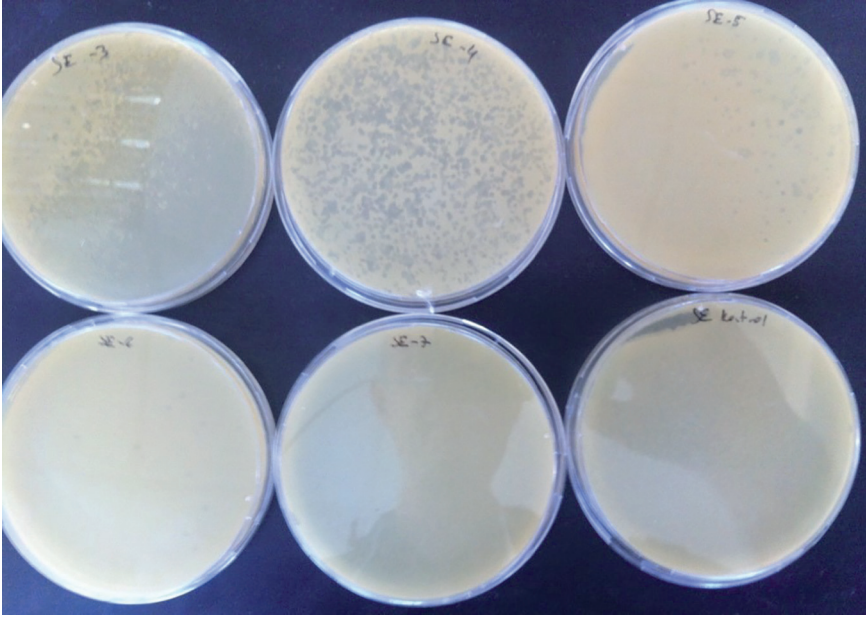
Orijin	İzole edilen bakteriyofaj pozitif tavuk dışkı örneği/toplam%	İzole edilen bakteriyofaj pozitif kümes atık sıvısı örneği/toplam %	İzole edilen bakteriyofaj pozitif kümes altlık örneği/toplam %	İzole edilen bakteriyofaj pozitif örnek / toplam %
Adapazarı	2/9 (%22,2)	0/2 (%0)	1/3 (%33,3)	3/14 (%21,4)
Afyon	6/17 (%35,2)	-	3/8 (%37,5)	9/25 (%36)
Bahkesir	0/8 (%0)	-	-	0/8 (%0)
Bandırma	2/5 (%40)	1/2 (%50)	0/2 (%0)	3/9 (%33,3)
Bursa	4/14 (%28,5)	0/1 (%0)	0/2 (%0)	4/17 (%23,5)
Düzce	3/5 (%60)	-	-	3/5 (%60)
<b>Toplam</b>	<b>17/58 (%29,3)</b>	<b>1/5 (%20)</b>	<b>4/15 (%26,6)</b>	<b>22/78 (%28,2)</b>

**Tablo 2.** Ticari broyler kümes (tavuk dışkı, kümes atık suları, kümes altlık) örneklerinden izole edilen 22 adet *S. Enteritidis* fajının, kanatlı hayvanlardan izole edilen toplam 15 adet *S. Enteritidis* suşundaki litik aktivitesi

Faj Kodu <sup>a</sup>	<i>Salmonella</i> suşları														
	SE	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14
Ad1-Td	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Ad2-Td	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Ad3-Ka	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
Af1-Td	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
Af2-Td	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
Af3-Td	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Af4-Td	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-
Af5-Td	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Af6-Td	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
Af1-Ka	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Af2-Ka	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Af3-Ka	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Ban1-Td	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Ban2-Td	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
Ban1-Kas	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Bur1-Td	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Bur2-Td	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Bur3-Td	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Bur4-Td	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Dü1-Td	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
Dü2-Td	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
Dü3-Td	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-

<sup>a</sup> İdentifiye edilen bakteriyofajlar: Fajın izole edildiği bölge (Ad: Adapazarı; Af: Afyon; Ban: Bandırma; Bur:Bursa; Dü:Düzce), faj izolasyonunun numarası ve örnek çeşidi (Td:Tavuk dışkısı; Ka: Kümes altlık; Kas: Kümes atık sıvısı)

SE: *S. Enteritidis* ATCC 13076; +: Litik aktivite pozitif; -: Litik aktivite negatif



**Şekil 2.** *S. Enteritidis* bakteriyofaj plaklarının overlay-agar görünüşleri

## Tartışma ve Sonuç

Salmonelloz, ticari kümes hayvanlarını etkileyen, kümes hayvanı üretimine zarar veren ve halk sağlığı açısından kaygı oluşturan önemli bakteriyel enfeksiyonlardan biridir. Dünyada ve Türkiye’de paratifoid *Salmonella* etkenleri uzun süredir insanlarda ve kanatlı hayvanlarda önemli sağlık sorunlarına ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Çeşitli ülkelerde *S. Enteritidis*’e özgü bakteriyofajların izolasyonu ile ilgili yapılan araştırmalar [4,7,20] bulunmasına rağmen, ülkemizde konuyla ilgili çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma, ülkemizde ticari broyler kümes örneklerinden (tavuk dışkı, kümes atık suları ve kümes altlıkları) *S. Enteritidis*’e özgü bakteriyofajların izolasyonunun yapıldığı ilk çalışmadır.

Her konağa spesifik olmak, bakteriyofajların ortak özellikleri arasında bulunmaktadır. Bakteriyofajlar çoğu zaman sadece 1 bakteri türünü veya bir tür içinde sadece 1 serotipi enfekte ederler [1]. Bununla birlikte, bakteriyofajların bu özelliği bakteriyel enfeksiyonlara karşı kontrol ve tedavi etkisini sınırlayıcı bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır [6]. Araştırmacıların izole ettikleri bakteriyofajların geniş konak spektrumuna sahip olduğuyla ilgili daha önce yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmada, Af1-Ka ve Af3-Ka fajları, test edilen 15 adet *S. Enteritidis* suşunu sırasıyla %78’ini ve %71’ini lize ederek geniş bir konak spektrumu gösterdi.

Çin’de yapılan bir çalışmada [22], kanatlı çiftliklerinden SaFB14 fajının izole edildiği, bu fajın test edilen 39 *S. Enteritidis*’i %94,87 oranında lize ederek geniş konak spektrumuna sahip olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen fajların konak spektrumu yönünden çalışmamız, bu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Atterbury ve ark. [4] kümes hayvanı işletmelerinden izole ettikleri  $\phi$  25,  $\phi$  28,  $\phi$  37 fajlarının, test edilen 7 *S. Enteritidis* suşunun tümünde (%100) litik aktiviteye sahip olduğunu göstererek, bu çalışmaya oranla, daha geniş konak spektrumuna sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan hedef bakteri suşu olan *S. Enteritidis*’in sayısı (15 adet) Atterbury ve ark.’nın [4] çalışmasının (*S. Enteritidis* hedef bakteri suşu 7 adet) iki katı oranındadır. Test edilecek bakteri sayısının artması litik fajların konak spektrumu azaltmaktadır. Bunun nedeninin, konak spektrumu belirlenecek bakteri suşlarının sayıları ile litik fajların konak spektrumu arasındaki negatif korelasyon olarak düşünülmektedir.

Bakteriyofajların karakterizasyonu ve tiplendirilmesiyle (Faj genom büyüklüğü, faj genom dizi analizi, faj yapısal proteinlerinin tespiti, fajların elektron mikroskopisi vb.) farklı araştırmacıların yaptıkları birçok çalışma bulunmaktadır [15,18,19]. Bu çalışmada izole edilen fajların litik aktivitelerinin farklı *S. Enteritidis* suşlarında yakın sayılabile-



cek özellikte olması faj izolatlarının aynı şuş olabileceği sorunu akla getirmektedir. Bu nedenle, ileri faj karakterizasyonu ve tiplendirilmesinin yapılması bu sorunun yanıtı olabileceği düşünülmektedir.

Dışkı örnekleri ve atık sular her zaman birçok *Salmonella* serotipine karşı litik fajların izolasyonu için büyük bir ilgi alanına sahiptir. *S. Enteritidis*'e özgü bakteriyofajlar bu çalışmada, ticari broyler kümeslerinin kümes atık sıvısı, dışkı vb. gibi toplam 78 örneğin %28,2'sinden izole edilmiştir. Ticari broyler kümeslerinin kümes atık sıvısı, dışkı vb. örneklerinde bol miktarda bakteriyofajın bulunduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [4,12,22].

Fiorentin ve ark.'nın [11] 2005 yılında yaptıkları çalışmada kullandıkları bakteriyofajların piliçlerde *S. Enteritidis* PT4'ü yoğunluğu azalttığını göstermişlerdir. Atterbury ve ark. [4], *Salmonella* bakteriyofajlarının, ticari broylerlerde *Salmonella* suşları ile mücadele etmek için kullanılabilecek olanaklarını araştırmıştır. Araştırmacıların elde ettikleri sonuçlar, bu bakteriyofajların *S. Enteritidis*'in barsak kolonizasyonunu önemli ölçüde azalttığını göstermiştir [4]. Bakteriyofajların bu avantajları ve *S. Enteritidis*'e litik aktivite gösteren bakteriyofajların uygulamaları göz önüne alındığında, bu çalışmada izole edilen bakteriyofajların, *S. Enteritidis*'in neden olduğu tavukların bakteriyel infeksiyonlarını kontrol etmek için iyi terapötik ve profilaktik maddeler olma potansiyeline sahip olabileceği kanısına varılmıştır.

## Teşekkür

Bu çalışmayı HDP (V)-2014-43 numaralı proje olarak Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) desteklemiştir.

## Kaynaklar

- Ackermann HW, Audurier A, Berthiaume L, Jones LA, Mayo JA, Vidaver AK, (1978). *Guidelines for bacteriophage characterization*. Adv Virus Res. 23, 1–24.
- Akan M, (2008). *Kanatlılarda salmonella infeksiyonları ve kontrolünde temel prensipler*. Veteriner Tavukçuluk Derneği Mektup Ankara Dergisi 6(2), 3-4
- Aksakal A, (2003) *Bazı kanatlıların dışkılarında Salmonella türlerinin varlığı ve yaygınlığı ile antibiyotiklere duyarlılıkları*. YYÜ Vet. Fak. Derg. 14 (1), 95-101.
- Atterbury RJ, Van Bergen MAP, Ortiz F, Lovell MA, Harris JA, De Boer A, Wagenaar JA, Allen VM, Barrow PA, (2007). *Bacteriophage therapy to reduce Salmonella colonization of broiler chickens*. Appl Environ Microbiol. 73, 4543-4549.
- Barrow P, Lovell M, Berchieri AJ, (1998). *Use of lytic bacteriophage for control of experimental Escherichia coli septicemia and meningitis in chickens and calves*. Clin Diag Lab Immunol. 5, 294-298.
- Bielke L, Higgins S, Donoghue A, Donoghue D, Hargis BM, (2007). *Salmonella host range of bacteriophages that infect multiple genera*. Poult. Sci. 86(12), 2536-2540.
- Carey-Smith GV, Billington C, Cornelius AJ, Hudson JA, Heinemann JA, (2006). *Isolation and characterization of bacteriophages infecting Salmonella spp.* FEMS Microbiol Lett. 258, 182-186.
- Cherry WB, Davis BR, Edwards PR, Hogan RB, (1954). *A simple procedure for the identification of the genus Salmonella by means of a specific bacteriophage*. J Lab Clin Med. 44, 51-55.
- Dibner JJ, Richards JD, (2005). *Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action*. Poult Sci. 84, 634-643.
- Felix A, Callow BR, (1943). *Typing of paratyphoid B bacilli by means of Vi bacteriophage*. Brit Med J. 12, 127–130.
- Fiorentin L, Vieira ND, Barioni WJ, (2005). *Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of Salmonella Enteritidis PT4 in caecal contents of broilers*. Avian Pathol. 34, 258-263.
- Higgins JP, Higgins SE, Guenther KL, Huff W, Donoghue AM, Donoghue DJ, Hargis BM, (2005). *Use of a specific bacteriophage treatment to reduce Salmonella in poultry products*. Poult Sci. 84, 1141-1145.
- Higgins JP, Andreatti Filho RL, Higgins SE, Wolfenden AD, Tellez G, Hargis BM, (2008). *Evaluation of Salmonella-lytic properties of bacteriophages isolated from commercial broiler houses*. Avian Dis. 52, 139-142.
- Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM, (2005). *Alternative to antibiotics utilization of bacteriophage to treat colibacillosis and prevent food born pathogens*. Poult Sci. 84, 655-659.
- Kang HW, Kim JW, Jung TS, Woo GJ, (2013). *WksI3, a new biocontrol agent for Salmonella enterica Serovars Enteritidis and Typhimurium in foods: Characterization, application, sequence analysis, and oral acute toxicity study*. Appl Environ Microbiol. 79(6), 1956-1968.
- Kudva IT, Jelacic S, Tarr PI, Youderian P, Hovde JC, (1999). *Biocontrol of Escherichia coli O157 with O157-specific bacteriophages*. Appl Environ Microbiol. 65(9), 3767-3773.
- Kutateladze M, Adamia R, (2010). *Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics*. Trends Biotechnol. 28(12), 591-595.
- Kwon HJ, Cho SH, Kim TE, Won YJ, Jeong J, Park SC, Kim JH, Yoo HS, Park YH, Kim SJ, (2008). *Characterization of a T7-like lytic bacteriophage (SG-JL2) of Salmonella enterica Serovar Gallinarum Biovar Gallinarum*. Appl Environ Microbiol. 74(22), 6970-6979.

19. Lappe ND, Doran G, O'Connor J, O'Hare C, Cormican M, (2009). *Characterization of bacteriophages used in the Salmonella enterica serovar Enteritidis phage-typing scheme*. J Med Microbiol. 58, 86-93.
20. Sklar IB, Joerger RD, (2001). *Attempts to utilize bacteriophage to combat salmonella enterica serovar enteritidis infection in chickens*. J Food Saf. 21(1), 15-29.
21. Slavik MF, Kim JW, Pharr MD, Raben DP, Tsai S, Lobsinger CM, (1995). *Effect of trisodium phosphate on campylobacter attached to post-chill chicken carcasses*. J Food Prot. 57, 324-326.
22. Tang D, Zhang P, Zhang Q, Xue F, Ren J, Sun J, Qu Z, Zhuge X, Li D, Wang J, Jiang M, Dai J, (2018). *Isolation and characterization of a broad-spectrum phage of multiple drug resistant Salmonella and its therapeutic utility in mice*. Microb Pathog. doi:10.1016/j.micpath.2018.10.042.

## Gökkuşığı Alabalığı Kökenli *Listonella anguillarum* İzolatlarının Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyonu

Ertan Emek Onuk<sup>1</sup>, Soner Altun<sup>2</sup>, Muhammed Duman<sup>2</sup>, İzzet Burçin Satıcıoğlu<sup>2</sup>, H. Kaan Müştak<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun

<sup>2</sup>Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 07.11.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 23.11.2018

**Özet:** Bu çalışmada, gökkuşığı alabalıklarından izole edilen altı *L. anguillarum* izolatı ve bir referans suş fenotipik ve genotipik özellikler açısından incelendi. İzolatların fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde klasik mikrobiyolojik testler ve API 20 E strip testi kullanıldı. İzolatların moleküler identifikasyonu *amiB* genine dayanan *L. anguillarum* tür spesifik PCR uygulaması ve sonrasında aynı bölgenin sekans analizinin yapılmasıyla gerçekleştirildi. İzolatların dokuz farklı antibiyotiğe karşı antimikrobiyel aktiviteleri disk difüzyon yöntemiyle belirlendi. Ayrıca izolatlar arasındaki olası klonal ilişkiler Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimorfik DNA (RAPD) metodu ile ortaya konuldu. API 20 E testlerinde izolatlar arasında  $\beta$ -Galaktosidaz, arginin dihidrolaz, sitrat, sorbitol, amygdalin ve arabinoz testlerinde farklılıklar görülmüştür. Tüm izolatların *L. anguillarum* spesifik 429 bp'lik bant verdiği saptanmış ve bu sonuç sekans analizi ile doğrulanmıştır. *L. anguillarum* izolatlarının çalışmada kullanılan dokuz farklı antibiyotiğe karşı değişik düzeyde antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları belirlendi. En yüksek direnç oranı neomisin ve linkomisin'e (% 100), en düşük direnç oranı ise doksisklin'e (% 14,2) karşı gözlemlendi. RAPD analizi sonucunda *L. anguillarum* izolatları % 60 benzerlik katsayısına göre bir unique tip ve beş alt türden oluşan bir küme (cluster) içerisinde gruplanmıştır. Bu çalışmanın balık kökenli *L. anguillarum* izolatlarının fenotipik ve genotipik özelliklerinin belirlenmesi ile ilgili ileride yapılacak çalışmalara temel oluşturabileceği düşünülmektedir. Ayrıca elde edilen sonuçlar, balık hastalıklarının tedavisinde uygun antimikrobiyal ajanların seçilmesinin önemini ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Antibiyotik, Genotiplendirme, Gökkuşığı alabalığı, *Listonella anguillarum*

### Phenotypic and Genotypic Characterization of *Listonella anguillarum* Isolates from Rainbow Trout

**Abstract:** In this study, six *L. anguillarum* isolates obtained from rainbow trout and one reference strains were examined in terms of phenotypic and genotypic characteristics. Conventional microbiological and API 20E tests were used to determine phenotypic characteristics of isolates. Molecular identification of isolates was carried out by applying the *L. anguillarum* specific PCR method based on the *amiB* gene followed by sequence analysis of the analysis of amplified product with the same primer pairs. Antimicrobial activity of isolates was determined by disk diffusion method against the nine different antibiotics. Additionally, possible clonal relationships between isolates were demonstrated by the RAPD-PCR method. There were differences between strains in terms of  $\beta$ -galactosidase, arginine dihydrolase, citrate, sorbitol, amygdalin and arabinose tests in API 20E system. In *L. anguillarum* specific PCR assay all of isolates gave the final PCR product of 429 bp and this result was confirmed by sequence analysis. *L. anguillarum* isolates were found to have different levels of antimicrobial activity against nine different antibiotics used in the study. There was a high incidence of resistance to neomycine and lincomycine (84%), and a low incidence of resistance to doxycycline (14.2%). In RAPD method, *L. anguillarum* isolates were grouped into one unique type and one cluster including five subtypes according to 60% similarity coefficient index. The present study was considered to may provide a basis for further studies on phenotypic and genotypic characterization of *L. anguillarum* isolates from fishes. Moreover the present results showed the importance of choosing appropriate antimicrobial agents for treatment of fish diseases.

**Key words:** Antibiotic, Genotyping, *Listonella anguillarum*, Rainbow trout

### Giriş

Vibriozis çeşitli deniz ve tatlı su balıklarında, çift kabuklu ve eklem bacaklılarda ölümcül hemorajik septisemi ile seyreden ve tüm dünyada hem akua-

kültürde hem de larvikültürde önemli ekonomik kayıplara neden olan bir hastalıktır [11]. Hastalığın etkeni olan *Vibrio anguillarum* başlangıçta Biotip 1 ve 2 olarak iki biyotipe ayrılmıştır [15]. Ancak, *V. anguillarum* biyotip 2 DNA teknolojisindeki geliş-

meler sonucunda *V. ordalii* adıyla yeni bir tür olarak yeniden sınıflandırılmıştır [28]. *V. anguillarum* biyotip 1 ise 5S ribozomal RNA (rRNA) gen dizisi analizine dayanarak *Listonella anguillarum* olarak yeniden sınıflandırılmıştır [21]. Ancak bazı araştırmacılar halen *V. anguillarum* ismini kullanmayı tercih etmektedirler [11, 35].

Vibriosis hastalığının neden olduğu ekonomik kayıpların etkili bir şekilde en aza indirilmesi ve uygun kontrol önlemlerinin alınması için *L. anguillarum*'un hızlı, doğru ve güvenilir bir şekilde saptanması önem arz etmektedir. Geleneksel olarak etkenin tanımlanması klinik ve histolojik bulguların yorumlanması, patojenin seçici bir ortamda kültüre edilmesi, morfolojik veya biyokimyasal özelliklerinin ortaya konulması ile yapılmaktadır [11]. Ancak karışık kültürlerden morfolojik ve biyokimyasal olarak *L. anguillarum*'un identifikasyonunda yanlış sonuçların elde edildiği bildirilmiştir [3, 14, 20]. Bunun yanında bakteriyel balık patojenlerinin identifikasyonunda API 20E minyatürize test sistemlerinin kullanımının giderek arttığı görülmektedir. Fakat API Web tabanında *V. anguillarum*'un bulunmaması bu sistemin kullanımını sınırlamaktadır [5, 25]. Klasik kültür ve minyatürize sistemlere dayanan saptama ve tanımlama tekniklerinde yaşanan bu sınırlamalar, bu yöntemlerin yerine kültürden bağımsız tekniklerin geçmesine veya onlar ile desteklenmelerine neden olmaktadır [5, 9]. Günümüzde *L. anguillarum* izolatlarının genetik olarak identifikasyonunda *rpoN* geni, *amiB* geni ve *empA* genini hedef alan spesifik PCR metodları geliştirilmiştir [13, 17, 35].

Moleküler tiplendirme metodları çevresel ve klinik örneklerden elde edilen izolatlar arasındaki ilişkiyi belirleyen güçlü araçlardır ve etkenlerin ortak bulaş yolları hakkında kanıtlar sağlarlar. Bakteriyel izolatların genetik olarak tiplendirilmesinde restriction fragment length polymorphism, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), RAPD PCR ve repetitive-sequence-based polymerase chain reaction gibi çeşitli moleküler yöntemler kullanılmıştır. Bu metodlardan PFGE'nin bakterilerin tiplendirilmesinde en iyi metod olduğu düşünülmektedir, ancak bu metodun prosesinin zahmetli olması, zaman gerektirmesi ve teknik olarak zor olması çok sayıda örneğin işlenmesinde rutin kullanımda sınırlamaktadır. PCR tabanlı yöntemlerden RAPD PCR

yöntemi PFGE ile karşılaştırıldığında hızlı ve uygulaması basit olan yöntemlerdir [6]. RAPD PCR metodu son yıllarda bakteriyel balık patojenleri arasındaki klonal yakınlıkların belirlenmesinde yaygın bir kullanım alanı bulmuştur [18, 23, 26].

Bu çalışma ile ülkemiz su ürünleri sektöründe, özellikle, alabalık işletmelerinde önemli ekonomik kayıplara neden olan *L. anguillarum* izolatlarının fenotipik ve genotipik karakterizasyonunun yapılması, izolatların antimikrobiyal profillerinin ortaya konulması ve izolatlar arası klonal ilişkilerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

**Bakteriyel İzolatlar:** Çalışmada Türkiye'nin değişik illerinden izole edilen altı *L. anguillarum* izolatı ve 1 referans suş (ATCC 14181) kullanıldı (Tablo 1).

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan *L. anguillarum* suşları

No	İzolasyon Yeri	İzolasyon Yılı
1	İzmir	2012
2	Kütahya	2012
3	Bilecik	2012
4	Muğla	2012
5	İzmir	2012
6	İstanbul	2012
7	ATCC 14181	-

**İzolatların Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi:** İzolatların Gram morfoloji, oksidasyon-fermentasyon (O/F), jelatin hidrolizi, sitokrom oksidaz, katalaz, % 0 ve % 7, NaCl'de üreme, 37 °C'de üreme, indol, metil kırmızısı, voges proskaver (VP) reaksiyonu, arabinoz, inositol, sakkaroz, laktoz, mannitol ve glukoz'dan asit üretimi, vibriostatik ajan (O/129) duyarlılık ve Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) besiyerindeki koloni morfolojisi konvansiyonel mikrobiyolojik metodlar ile belirlendi. Ek olarak bütün izolatların, API 20E (BioMerieux) hızlı teşhis kiti yönergesine uygun olarak striplere ekimleri yapıldı ve 25°C'de 24 saat inkübe edilerek sonuçlar değerlendirildi.

***L. anguillarum* Spesifik PCR ve Sekans Analizi:** Konvansiyonel olarak identifiye edilen *L. anguillarum* izolatları moleküler olarak PCR metodu

ile doğrulandı. Bu amaçla öncelikle izolatlar a ait saf kültürlerden ticari DNA ekstraksiyon kiti (Qiagen, GmbH) kullanılarak kromozal DNA'lar elde edildi. *L. anguillarum* izolatlarının PCR ile moleküler konfirmasyonunda *N*-acetylmuramoyl-l-alanine amidase enzimini kodlayan *amiB* genine özgü van-ami 8 (5'-ACATCATCCATTTGTTAC-3') ve 417 (5'-CCTTATCACTATCCAAATTG-3') oligonukleotid primer seti kullanıldı [17]. PCR amplifikasyonunda DEPC-treated water, 1xPCR Buffer, 1.2 mM of MgCl<sub>2</sub> her bir dNTP'den 0.2 mM, her bir primerden 2 µM, 1.0 U Taq polymerase ve 5 µl template DNA içeren 25 µl PCR master mix'i oluşturuldu. Oluşturulan karışım 95°C'de 10 dk ön denatürasyonu takiben 95°C'de 30 sn denatürasyon, 56°C'de 30 sn primer bağlanma, 72°C'de 30 sn uzama olmak üzere 25 siklus ve 72°C'de 7 dk final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. Sonuçta 429 bp'lik amplifikasyon ürününün görülmesi pozitif olarak değerlendirildi.

Elde edilen 429 bp'lik amplifikasyon ürünlerinin sekans analizi Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer'da aynı primerler kullanılarak çift yönlü olarak yapıldı. Elde edilen sekanslar Blast programı kullanılarak GenBank veri tabanında bulunan mevcut sekanslar ile karşılaştırıldı. İzolatlar a ait sekans dizileri GenBank'a yüklenerek kabul numaraları alındı.

**İzolatlar Arası Genetik İlişkinin Belirlenmesi:** İzolatlar arası klonal ilişkinin belirlenmesinde M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') primerinin kullanıldığı RAPD PCR metodu kullanıldı [32]. Amplifikasyon aşaması Versalovic ve ark. [33] tarafından bildirilen metodun modifiye edilmesiyle gerçekleştirildi. Bu aşamada DEPC-treated water, 1xPCR Buffer, 2.5 mM MgCl, 200 µM her bir dNTP, 1.25 U Taq DNA polimeraz, 25 pmol primer ve 5 µl template DNA içeren 25 µl'lik bir master karışımı oluşturuldu. Bu karışım 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 1 dk denatürasyon, 40°C'de 1 dk primer bağlanma, 72°C'de 3 dk uzama olmak üzere 40 siklus ve 72°C'de 7 dk final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren %1.5'luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi.

DNA profilleri CHEF-DR® III, Quantity One® yazılımı (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) ile

analiz edildi. Dendrogramları unweighted-pair grup metodu (UPGMA) ile oluşturuldu.

**Antimikrobiyal Duyarlılık Testi:** Tüm izolatların antimikrobiyal duyarlılıkları Mueller-Hinton agar'da Kirby-Bauer disk difüzyon metodu ile test edildi [7]. Antimikrobiyal duyarlılıkların belirlenmesinde amoksisilin (25 µg), doksisisiklin (30 µg), eritromisin (15 µg), gentamisin (120 µg), florfenikol (30 µg), linkomisin (2 µg), neomisin (10 µg), oksiyetrasiklin (30 µg), ve sulfamethoksazole+trimetoprim (25 µg) (Oxoid) diskleri kullanıldı. 24 - 48 saat inkübasyon sonrasında zon çapları ölçülerek kaydedilmiştir.

## Bulgular

**İzolatlarının Fenotipik Karakterizasyonu:** *L. anguillarum* izolatlarının TSA besi yerinde 22 °C'de 48 saat inkübasyon sonucunda 1-2 mm çapında, yuvarlak, kenarları düz, hafif konveks, kabarıklık görünümünde ve krem renginde, TCBS agarda ise sarı renkte koloniler oluşturduğu belirlendi. API 20E test sonuçlarına göre izolatlar arasında β-galaktosidaz (ONPG), arginin dihidrolaz (ADH), sitrat, sorbitol, amygdalin ve arabinoz testleri yönünden farklılıklar olduğu belirlendi (Tablo 2). Konvansiyonel mikrobiyolojik testler ile API 20E test sonuçları karşılaştırıldığında *L. anguillarum* izolatlarının büyük ölçüde benzer olduğu ancak lizin dekarboksilaz (LDC), VP ve sitrat testlerinde farklı sonuçların görüldüğü tespit edildi. Çalışmada kullanılan saha izolatlarının konvansiyonel testler ile belirlenmiş fenotipik özellikleri ve bu özelliklerin diğer araştırmacıların bildirmiş oldukları sonuçlar ile karşılaştırması Tablo 3'de verildi.

**Tablo 2.** *L. anguillarum* izolatlarının API 20E hızlı teşhis kiti test sonuçları

Fenotipik Özellikler	İzolat No						
	1	2	3	4	5	6	7
ONPG	+	+	+	-	+	+	+
ADH	+	-	+	+	+	+	+
LDC	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat Üretimi	-	+	+	+	-	+	-
H <sub>2</sub> S Üretimi	-	-	-	-	-	-	-
Ureaz Üretimi	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-
İndol Üretimi	+	+	+	+	+	+	+

Fenotipik Özellikler	İzolat No						
	1	2	3	4	5	6	7
VP	+	+	+	+	+	+	+
Jelatin Hidroliz	+	+	+	+	+	+	+
Glukoz*	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol*	+	+	+	+	+	+	+
İnositol*	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol*	-	+	+	+	+	+	-
Rhamnoz*	-	-	-	-	-	-	-
Sakkaroz*	+	+	+	+	+	+	+
Melibioz*	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin*	-	-	-	-	-	-	+
Arabinoz*	-	-	-	+	-	-	+

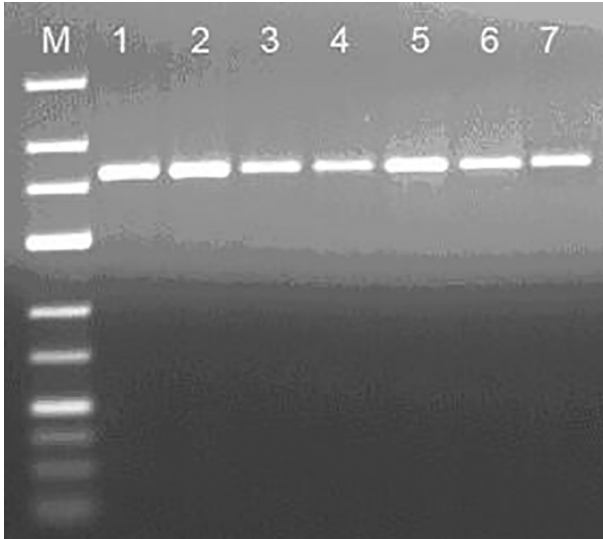
ONPG:  $\beta$ -Galaktosidaz, ADH: Arginin dihidrolaz, LDC: Lizin dekarboksilaz, ODC: Ornitin dekarboksilaz, TDA: Triptofan deaminaz, VP: Voges proskauer Reaksiyonu, \*: 'den Asit Üretimi

***L. anguillarum* Spesifik PCR ve Sekans Analizi:** Çalışmada fenotipik olarak tanımlanan izolatlar genotipik olarak bakteriyel türlere özgü spesifik primerlerin kullanıldığı PCR yöntemi ile doğrulandı. Tüm izolatlar ve ATCC 14181 suşu *L. anguillarum* spesifik olan 429 bp bant verdiği saptandı (Şekil 1). Sekans analizi sonucu izolatlarla ait *amiB* gen bölgesi dizileri Genbank'a MK091482, MK091483, MK091484, MK091485, MK091486, MK091487 ve MK091488 kabul numaraları ile kaydedildi. Elde edilen sekansların GenBank veri tabanında yer alan DQ431190 erişim numaralı *L. anguillarum* *AmiB* (*amiB*) gene, complete cds sekansıyla karşılaştırılması sonucu, izolatların en düşük %96.1 en yüksek %99.4 oranında benzer oldukları belirlendi.

**Tablo 3.** Çalışmada kullanılan *L. anguillarum* izolatlarının fenotipik özelliklerinin diğer araştırmacıların izolatlarıyla karşılaştırılması

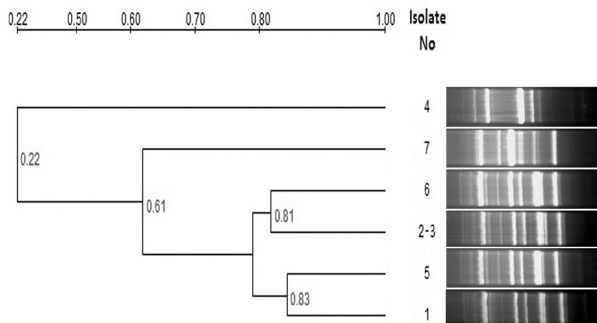
Fenotipik Özellikler	<i>L. anguillarum</i> 6 İzolat	Colorni ve ark., [8]	Austin ve Austin, [4]	Akaylı ve Durna, [1]
Gr boyama	- (6/6)	-	-	-
Morfoloji	Çubuk eğri	Çubuk eğri	Çubuk eğri	Basil
Haraket	+	+	+	+
Stokrom oksidaz	+	+	+	+
Katalaz	+	▪	+	+
Oksidasyon/Fermentasyon	F (6/6)	F	F	F
O/129	+	+	+	+
Lizin dekarboksilaz	- (5/6)	+	-	-
Arginin dihidrolaz	+	-	+	+
İndol	+	+/-	+	+
Üre	- (6/6)	+/-	-	-
Jelatin	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	- (6/6)	+/-	-	▪
Metil Red	+	+	-	▪
Voges proskauer	+	-	+	+
Sitrat	+	-	+	+
%0 NaCl'de üreme	+	-	-	-
%7 NaCl'de üreme	+	+	-	▪
37°C üreme	+	▪	+	+
Glukoz	+	+	▪	▪
Arabinoz	- (5/6)	+/-	+	-
İnositol	- (6/6)	-	-	-
Sakkaroz	+	▪	▪	+
Laktöz	- (6/6)	+/-	-	-
Mannitol	+	+/-	+	+

(+): Pozitif, (-): Negatif, (▪): Yapılmadı



**Şekil 1.** *L. anguillarum* spesifik PCR, 429 bp. M; Marker (25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 700), 1-6; *L. anguillarum* saha izolatları, 7; *L. anguillarum* ATCC 14181.

**İzolatlar Arası Genetik İlişkinin Belirlenmesi:** RAPD PCR analizi sonucunda *L. anguillarum* izolatlarının 6 farklı RAPD bant profili verdiği, izolatların % 60 benzerlik katsayısına göre 1 tekli (unique) tip ve 1 küme (cluster) içerisinde gruplandırıldığı belirlendi. Buna göre ilk grupta sadece 4 numaralı izolatın yer aldığı, ikinci grupta ise 1, 2, 3, 5, 6 ve 7 numaralı izolatların yer aldığı, ayrıca 2 ve 3 numaralı izolatların aynı RAPD bant paternine sahip olduğu belirlendi (Şekil 2).



**Şekil 2.** *L. anguillarum* izolatlarının RAPD bant profilleri ve genotiplerinin filogenetik ağaçta gösterilmesi

**İzolatların Antimikrobiyal Duyarlılık Profilleri:** *L. anguillarum* izolatlarının çalışmada kullanılan dokuz farklı antibiyotiğe karşı değişik düzeyde antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları belirlendi

(Tablo 4). En yüksek direnç oranı neomisin ve linkomisin'e (% 100), en düşük direnç oranı ise doksisisiklin'e (% 14.2) karşı gözlemlendi.

**Tablo 4.** *L. anguillarum* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık profilleri

Antibiyotikler	<i>L. anguillarum</i> izolatları						
	1	2	3	4	5	6	7
Gentamisin	R	S	S	S	S	S	R
Neomisin	R	R	R	R	R	R	R
Linkomisin	R	R	R	R	R	R	R
Oksitetrasiklin	R	I	R	R	S	I	I
Amoksisilin	R	S	R	R	R	R	R
Florfenikol	R	S	S	S	R	S	I
Trimetoprim-sulfametoksazol	R	S	S	S	S	S	R
Eritromisin	R	I	R	R	R	R	R
Doksisisiklin	R	S	S	I	I	S	I

## Tartışma ve Sonuç

*L. anguillarum*, en az 28 farklı ülkede, toplamda 90'dan fazla akuatik organizma için patojenik olan bir bakteridir [16]. Etken Türkiye'de geniş bir coğrafik dağılıma sahip olup çipura deniz levreği, kırmızı porgy (*Pagrus pagrus*) ve Gökkuşluğu alabalıklarından izole edilmiştir [24].

Genel olarak Vibrioların identifikasyonu ve sınıflandırılması biyokimyasal testler kullanılarak yapılmaktadır [22]. Bakteriyel hastalık etkenlerinin fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde ve teşhisinin yapılmasında en çok kullanılan yöntemlerden birisi de API 20E test kitleridir [2]. Ancak API test kitlerinin inkübasyon sıcaklıklarının balık patojenlerinin inkübasyon sıcaklıklarına uygun olmayışı, bu kitlerin balık patojenleri için kullanıldığında hatalı sonuçlar ortaya çıkmasına neden olmaktadır [5, 25]. Vibrio türlerinin fenotipik özelliklerinin ortaya konulmasında API 20E hızlı teşhis kitlerinin kullanıldığı birçok çalışmada bulunmaktadır [5, 19, 30, 31]. Özellikle bu sistemin birbirine çok yakın iki tür olan *V. anguillarum* ile *V. ordalii*'yi kolaylıkla ayırt edebildiği rapor edilmiştir. Ancak sitrat testinde *V. ordalii* ve *V. anguillarum* izolatlarında büyük oranda değişkenlik görülmüş ve bu nedenle değerlendirme yapılırken sitrat testinin çıkartılması gerektiği bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada *V. anguillarum* izolatları arasında bazı şeker testlerinde (Amygdalin ve

Arabinoz) farklı sonuçların elde edildiği görülmüştür [14]. Yine bazı araştırmacılar ADH, sitrat, indol, VP ve sorbitol testlerinde izolatlar arasında farklı sonuçların elde edildiğini bildirmişlerdir [5, 14, 30, 31]. Benzer şekilde çalışmamızda API 20E test sonuçlarına göre çalışmada kullanılan izolatlar arasında ADH, sitrat, amygdalin, arabinoz ve sorbitol testlerinde izolatlar arasında farklılıkların olduğu görülmüştür. Ek olarak Konvansiyonel mikrobiyolojik testler ile API 20E testi arasında LDC, VP ve sitrat testlerinde farklı sonuçların olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada konvansiyonel mikrobiyolojik testler ile elde edilen sonuçlar diğer araştırmacıların bildirdiği sonuçlar ile karşılaştırıldığında *L. anguillarum* izolatlarının fenotipik olarak heterojen bir yapıya sahip olduğunu belirtilebilir (Tablo 4).

Apiweb veri tabanında *L. anguillarum* bulunmadığı için sisteme girilen kodların *V. fluvialis* ve/veya motil *Aeromonas* türlerinden biri olarak yanlış tanımlanabilmektedir [5]. Yapılan bir çalışmada *V. anguillarum* izolatlarının % 66'ya yakın bir oranda *A. hydrophila* olarak tanımlanmış [27]. Bu bağlamda son yıllarda *L. anguillarum* saptama metotları, tanı ve önleyici tedbirleri hızlı bir şekilde hayata geçirmek için kültür bazlı yöntemlerden uzaklaşmaya başlamıştır [16]. Çalışmamızda API ve konvansiyonel mikrobiyolojik test sonuçlarında görülen farklılıklar ve bu farklılıklara göre yapılabilecek olası yanlış değerlendirmelerden kaçınmak için izolatlar genetik olarak *AmiB* genin kullanıldığı PCR ile konfirme edilmiş ve sonrasında PCR ürünlerinin sekans analizi yapılması ile sonuçlar konfirme edilmiştir.

Uzun yıllardır, kültür balıklarında bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde antibiyotikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin Norveç'te *Vibrio* salgınlarının önlenmesinde oksolinik asit ve florfenikol kullanılmaktadır [11]. Ülkemiz su ürünleri yetiştiriciliğinde Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü verilerine göre balıklarda kullanılacak 40 adet ruhsatlı antibakteriyel ürün bulunmakta ve bu ürünlerin ise 5 farklı etken madde florfenikol, oksitetrasiklin HCl, enrofloksasin, sülfadiazin-trimetoprim ve amoksisilin trihidrat içerdiği görülmektedir [12]. Ülkemizde *L. anguillarum*'un antibiyotik etkinliklerinin belirlendiği çalışmalar bulunmaktadır. Balta ve Balta, [5] Doğu Karadeniz Bölgesi'nden Gökkuşluğu alabalıklarından elde ettikleri *L. angu-*

*illarum* izolatlarının enrofloksasin, oksalinik asit ve florfenikol'e karşı, Tanrıku, [29] ise gökkuşluğu alabalıklarından izole ettiği 12 izolatın amoksisilin ve trimetoprim-sulfadiazine karşı duyarlı olduklarını belirlemişlerdir. Bu çalışmada elde edilen test sonuçlarına göre hastalığın tedavisinde florfenikol veya trimetoprim-sulfametoksazol'den birinin kullanılmasının uygun olacağı belirlenmiştir.

*L. anguillarum* izolatları arasındaki genetik ilişkiler farklı random primerlerin kullanıldığı RAPD PCR metodu ile belirlenmiştir. Vaseeharan ve ark., [34] OPP6, OPP9, OPAX5, OPAX18 ve OPX1 primerlerini kullandıkları çalışmalarında izolatların unique tipte RAPD profili sergilediklerini dolayısıyla genetik olarak heterojen bir yapıda olduklarını ortaya koymuşlardır. OPV-12 ve OPN-08 kullanıldığı başka bir çalışmada ise *L. anguillarum* izolatları 5 genotipe ayrılmıştır. Gökkuşluğu alabalıklarından elde edilen izolatların levrek balıkları ve sedimentten izole edilen izolatlar ile aynı genogruba yer aldığını belirlemişlerdir [10]. Bu çalışmada RAPD PCR metodunda kullanılan M13 primerinin *L. anguillarum* izolatların genotiplendirmesinde kullanılabilir olduğu ancak diğer araştırmacılar tarafından farklı olarak izolatların genetik olarak homojen bir yapıda olduğu belirlenmiştir. Bu farklılığın izolat sayısına ve coğrafi dağılıma bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışma ile *L. anguillarum* izolatların identifikasyonunda konvansiyonel mikrobiyolojik metotlar ile API 20E test kitleri arasında farklı sonuçların görülebileceği, dolayısıyla tür identifikasyonunun moleküler çalışmalar ile desteklenmesi gerektiği, izolatlar arası klonal ilişkilerin belirlenmesinde M13 primerinin kullanıldığı RAPD PCR metodunun hızlı ve güvenilir bir sonuç verdiği ortaya konulmuştur.

### Teşekkür

Bu çalışma, 2'inci Uluslararası Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

### Kaynaklar

1. Akaylı T, Durma M, (2017). *Kültür Levrek (D. labrax) Balıklarından izole edilen Vibrio anguillarum izolatlarının karakterizasyonu*. Kocatepe Vet J. 10(3), 134-141.



2. Altun S, Kubilay A, Diler O, (2010). *Yersinia ruckeri* suşlarının fenotipik ve serolojik özelliklerinin incelenmesi. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 16(Suppl B), 223-229.
3. Austin B, Alsina M, Austin DA, Blanch AR, Grimont F, Grimont PAD, Jofre J, Koblavi S, Larsen JL, Pedersen K, Tiainen T, Verdonck L, Swings J, (1995). *Identification and typing of Vibrio anguillarum: a comparison of different methods*. Syst Appl Microbiol. 18, 285-302.
4. Austin B, Austin DA, (1993). *Bacterial fish pathogens disease of farmed and wild fish*, Second edition. Chichester, England, Ellis Horwood. p.269-270.
5. Balta F, Balta ZD, (2017). Doğu Karadeniz'de yetiştiriciliği yapılan gökkuşuğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)'ndan izole edilen *Vibrio anguillarum* suşlarının serotiplendirilmesi, genetik karakterizasyonu ve antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesi. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 64, 321-328.
6. Beaz-Hidalgo R, Lopez-Romalde S, Toranzo AE., Romalde JL, (2008). *Polymerase Chain Reaction amplification of Repetitive Intergenic Consensus and Repetitive Extragenic Palindromic Sequences for molecular typing of Pseudomonas anguilliseptica and Aeromonas salmonicida*. J Aquat Anim Health. 20, 75-85.
7. CLSI, (2014). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Fourth Informational Supplement*. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, USA, M100-S24, 230s.
8. Colomi A, Paperna I, Gordin H, (1981). *Bacterial infections in gilt-head sea bream Sparus aurata cultured at Elat*. Aquaculture, 23, 257-267.
9. Cunningham CO, (2002). *Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control*. Aquaculture. 206, 19-55.
10. Frans I, Dierckens K, Crauwels S, Assche AV, Leisner J, Larsen MH, Michiels CW, Willems KA, Lievens B, Bossier P, Rediers H, (2013). *Does virulence assessment of Vibrio anguillarum using Sea Bass (Dicentrarchus labrax) Larvae correspond with genotypic and phenotypic characterization?* Plos One. 8(8), e70477.
11. Frans I, Michiels CW, Bossier P, Willems KA, Lievens B, Rediers H, (2011). *Vibrio anguillarum as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention*. J Fish Dis. 34, 643-661.
12. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. İyi Üretim Uygulamaları Sertifikası (GMP) Bakanlığımızca Verilmiş veya Kabul Edilmiş Pazarlama İzinli Veteriner Biyolojik Ürünler. <https://www.tarim.gov.tr/Konular/Veteriner-Hizmetleri/Veteriner-Saglik-Urunleri>. İnternet Erişimi: 15.03.2018.
13. Gonzalez SF, Osorio CR, Santos Y, (2003). *Development of a PCR-based method for the detection of Listonella anguillarum in fish tissue and blood samples*. Dis Aquat Org. 55, 109-115.p
14. Grisez L, Ceusters R, Ollevier F, (1991). *The use of API 20E for the identification of Vibrio anguillarum and V. ordalii*. J Fish Dis. 14, 359-365.
15. Harrell LW, Novoty AJ, Schiewe MH, Hodgins HO, (1976). *Isolation and description of two vibrios pathogenic to Pacific salmon in Puget Sound, Washington*. Fish Bullet. 74, 447-449.
16. Hickey ME, Lee J-L, (2018). *A comprehensive review of Vibrio (Listonella) anguillarum: ecology, pathology and prevention*. Rev Aquacult. 10, 585-610.
17. Hong GE, Kim DG, Bae JY, Ahn SH, Bai SC, Kong IS, (2007). *Species-specific PCR detection of the fish pathogen, Vibrio anguillarum, using the amiB gene, which encodes N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase*. FEMS Microbiol Lett. 269, 201-206.
18. Huang Y, Runge M, Michael GB, Schwarz S, Jung A, Steinhagen D, (2013). *Biochemical and molecular heterogeneity among isolates of Yersinia ruckeri from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum) in north west Germany*. BMC Vet Res. 9, 215
19. Korun J, Gokoglu M, (2007). *Listonella anguillarum isolated from hatchery cultured red porgy Pagrus pagrus in Turkey*. J Anim Vet Adv. 6, 823-827.
20. Kuhn I, Austin DA, Austin B, Blanch AR, Grimont PAD, Jofre J, Koblavi S, Larsen JL, Mollby R, Pedersen K, Tiainen T, Verdonck L, Swings J, (1996). *Diversity of Vibrio anguillarum isolates from different geographical and biological habitats, determined by the use of a combination of eight different typing methods*. Syst Appl Microbiol. 19, 442-450.
21. MacDonell MT, Colwell RR, (1985). *Phylogeny of the Vibrionaceae, and recommendation for two new genera, Listonella and Shewanella*. Syst Appl Microbiol. 6, 171-182.
22. Noguerola I, Blanch AR, (2008). *Identification of Vibrio spp. with a set of dichotomous keys*. J Appl Microbiol. 105, 175-185.
23. Onuk EE, Çiftçi A, Findık A, Çiftçi G, Altun S, Balta F, Özer S, Çoban AY, (2011). *Phenotypic and molecular characterization of Yersinia ruckeri isolates from Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum, 1792) in Turkey*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 124 (7-8), 320-328.
24. Öztürk RÇ, Altınok İ, (2014). *Bacterial and viral fish diseases in Turkey*. Turk J of Fish Aquat Sci. 14, 275-297.
25. Popovic TN, Coz-Rakovac R, Strunjak-Perovic I, (2007). *Commercial phenotypic tests (API 20E) in diagnosis of fish bacteria: a review*. Vet Med. 52(2), 49-53.
26. Ravelo C, Magarinos B, Lopez-Ramade S, Toranzo AE, Romalde JL, (2003). *Molecular fingerprinting of fish-pathogenic Lactococcus garvieae strains by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis*. J Clin Microbiol. 41(2), 751-756.
27. Santos Y, Romalde JL, Bandin I, Magarinos B, Nunez S, Barja JL, Toranzo AE, (1993). *Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens*. Aquaculture. 116(2-3), 111-120.
28. Schiewe MH, Trust TJ, Crosa JH, (1981). *Vibrio ordalii sp.nov.: a causative agent of vibriosis in fish*. Curr Microbiol. 6, 343-348.

29. Tanrikul TT, (2007). *Vibriosis as an epizootic disease of rainbow trout (Onchorhynchus mykiss) in Turkey*. Pak J Biol Sci. 10, 1733-1737.
30. Tanrikul TT, Cagırgan H, Toksen E, (2004). *Levreklerden (Dicentrarchus labrax L., 1758) izole edilen vibrio türlerinin API 20E yöntemiyle identifikasyonu*. EÜ Su Ürünleri Dergisi. 21, 243-247.
31. Tanrikul TT, Gultepe N, (2011). *Mix infections in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum) Lactococcus garvieae and Vibrio anguillarum O1*. J Anim Vet Adv. 10, 1019-1023.
32. Tekerekoglu MS, Ay S, Otlu B, Çiçek A, Kayabaş Ü, Durmaz R, (2007). *Molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from clinical specimens of patients with nosocomial infection: are there unnoticed silent outbreaks?* New Microbiol. 30, 131-137.
33. Versalovic J, Koeuth T, Lupski R, (1991). *Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes*. Nuc Acid Res. 19(24), 6823-6831.
34. Vaseeharan B, Hussian MR, Chen JC, (2008). *RpoN gene, RAPD profile, antimicrobial resistance and plasmids of Vibrio anguillarum isolates from vibriosis infected Penaeus monodon*. Lett Appl Microbiol. 47, 380-385.
35. Xiao P, Mo ZL, Mao YX, Wang CL, Zou YX, Li J, (2009). *Detection of Vibrio anguillarum by PCR amplification of the empA gene*. J Fish Dis. 32, 293-296.

## Subklinik Mastitis'in Anadolu Mandalarının Süt Kompozisyonundaki Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkisi

Hande Gürler<sup>1</sup>, Gülay Çiftçi<sup>2</sup>, Seçkin Salar<sup>3</sup>, Ayhan Baştan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Klinik Bilimler Anabilim Dalı, Samsun

<sup>2</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Samsun

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 25.05.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 17.10.2018

**Özet:** Bu çalışmada, subklinik mastitisli Anadolu mandalarının süt serumunda bazı biyokimyasal değerlerin araştırılması amaçlandı. Çalışma materyalini, on adet sağlıklı ve altı adet subklinik mastitisli olduğu belirlenen manda sütleri oluşturdu. Sağlıklı ve mastitisli manda sütleri, Kaliforniya Mastitis Testi (CMT) ve somatik hücre sayısı (SHS)'ye göre belirlendi. Alınan sütlerin serumunda albümin, total protein, trigliserit, üre ve ürik asit düzeyi analizör cihazında belirlendi. Somatik hücre sayısı yüksek olan (SHS>429x10<sup>3</sup> hücre/mL) subklinik mastitisli mandaların süt serumu sağlıklı manda süt serumu ile karşılaştırıldığında albümin düzeyinin önemli düzeyde (P<0.05) yüksek olduğu total protein ve üre düzeyinin ise hafif düzeyde arttığı belirlendi (P>0.05). Trigliserit düzeyinin ise mastitisli manda sütünde sağlıklı manda sütüne göre önemli düzeyde (P<0.05), ürik asit düzeyinin ise hafif düzeyde azaldığı saptandı (P>0.05). Somatik hücre sayısı ile albümin, total protein ve üre arasında pozitif korelasyon olduğu, trigliserit ve ürik asit arasında ise negatif bir korelasyon olduğu belirlendi. Bu sonuçlar ile laboratuvar bulgularının klinik bulgular ile birlikte subklinik mastitisi anlamada yardımcı olabileceği, tanisal ve prognostik olarak kullanılabilirliği kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Manda, Subklinik Mastitis, Süt

### The Effect of Subclinical Mastitis on Some Biochemical Parameters in Milk Composition of Anatolian Water Buffalos

**Summary:** In this study, it was aimed to investigate some biochemical values in milk serum of subclinical mastitic Anatolian buffaloes. The study material consisted of ten healthy and six buffaloes identified as having subclinical mastitis. Healthy and mastitic buffalo milks were determined by the California Mastitis Test (CMT) and somatic cell count (SCC). Albumin, total protein, triglyceride, urea and uric acid levels were determined in the serum of the receiving milk samples in the analyzer. When the milk serum of the subclinical mastitis with high somatic cell count (SCC> 429x10<sup>3</sup> cells / mL) was compared with healthy buffalo's milk serum, it was found that the albumin level was increased significantly (P<0.05) and total protein and urea levels were slightly increased (P> 0.05). Triglyceride levels were found to be significantly (P<0.05) lower in the mastitic buffalo than in the healthy buffalo (p<0.05), while uric acid level decreased slightly (P> 0.05). There was a positive correlation between SCC and albumin, total protein and urea, and a negative correlation between triglyceride and uric acid. These results suggested that laboratory findings may be helpful in the diagnosis of subclinical mastitis in conjunction with clinical findings, and may be used as diagnostic and prognostic indicators.

**Key Words:** Buffalo, Milk, Subclinical Mastitis

### Giriş

Mastitis, meme bezinin iritanlara karşı reaksiyonu olup meme dokusunu, süt kalite ve miktarını önemli ölçüde etkileyen ekonomik açıdan önemli bir hastalıktır [8,49]. Mastitis'in çeşitli nedenleri ve şiddet dereceleri vardır. Subklinik mastitis, klinik yönden fark edilebilen ancak, lokal ve sistemik belirtili göstermeden seyreden ve süte lökosit sayısında artışa neden olan, patojen etkenlerin izolasyonu ve bazı biyokimyasal değişimlerin belirlenmesi ile

tanınabilen mastitis türüdür [30]. Hastalık, süten yapısında değişikliklere neden olmakta ve mastitis kaynaklı süt üretim kayıplarının %70-80'i subklinik mastitisten kaynaklanmaktadır [16]. Klinik mastitisin tedavisi zor olup, subklinik mastitis düzeyinde belirlenebilmesinin önemli olduğu bildirilmiştir [43]. Subklinik mastitis teşhisinde kimyasal ve mikrobiyolojik birçok test kullanılmaktadır [9,43]. Son yıllarda somatik hücre sayısı (SHS)'nin belirlenmesini esas alan testler gittikçe önem kazanmaktadır. Somatik hücreler, meme bezinin enfeksiyon yada

hasarlanmasına yanıt olarak bölgeye gelen, memedeki sekretorik epitelleri dejenereden mikroorganizmalar ile mücadele ederken ölen ve sütün içine karışan akyuvarlardır. Sütteki somatik hücrelerin %75'ini lökosit, %25'ini de epitel hücreler oluşturmaktadır [13].

Sütün içeriğini başlıca su, yağ, laktoz ve protein oluşturur. Manda sütünün protein, laktoz, yağ ve kuru madde içeriği inek sütünden çok daha yüksektir [2]. Sütün içerisinde en çok bulunan protein kazein olup albümin ve globülin daha az miktardadır. Meme içi enfeksiyon, subklinik olsa bile, süt verimini ve içeriğini etkilemektedir [15]. Subklinik mastitis kazein olmayan protein konsantrasyonunun artışına neden olmaktadır. Bu artışın daha çok kan serum albümin ve immunoglobülin artışından kaynaklanabileceği bildirilmiştir [17]. Sütteki yağ, meme epitel hücrelerinde yağ damlacıkları olarak salgılanmaktadır. Yağ damlacıkları fosfolipit ve kolesterolden oluşan trigliserit yapıda bir zar ile çevrilidir. Trigliseritler toplam süt yağının yaklaşık %97-98'ini oluşturmaktadır. Trigliseritler süt alveol hücresine ait endoplazmik retikulumların dış yüzeyinde, gliserol ve yağ asitlerinden sentezlenmektedir. Manda sütünün yağ oranı inek sütünden yaklaşık olarak iki kat daha fazla, enerji ve besin değeri daha yüksektir [45]. Mastitisin meydana gelmesi yağ konsantrasyonunu etkilemektedir. Bu durum meme bezinin yapısından veya sekresyon kapasitesinin azalmasından kaynaklanabileceği belirtilmektedir [33].

Üre dokulardaki proteinlerin katabolizması sonucu oluşan, kan ve vücut sıvılarında bulunan organik bir moleküldür. Hayvanların yetersiz miktarda protein alması halinde özellikle bağırsaklardan emilmektedir. Üre aynı zamanda pirimidin katabolizması sonucu oluşmaktadır [37]. Sütteki üre seviyeleri, süt kompozisyonu, cins, mevsim, somatik hücre sayısı, beslenme rejimi, besleme yöntemi, beslenme süresi, kuru madde tüketimi gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir [28,34]. Sütteki üre düzeyinin kan plazmasındaki üre düzeyi ile güçlü bir ilişkisi vardır [21]. Süt ve kandaki üre konsantrasyonunun, süt ineklerinin beslenmesindeki enerji ve proteini izlemek için önemli bir parametre olduğu bildirilmiştir [18]. Üre düzeyinin süte belirlenmesinin kan alma sırasında oluşan stresi önlediği ve daha pratik olduğu bildirilmiştir [10]. Süt üre nit-

rojen değerinin ineklerin sağlığı ve beslenmesiyle ilgili bilgiler sağlanması nedeniyle sürü sağlığı ve besleme ekonomisi açısından önemli olduğu ve rasyondaki karbonhidrat ve protein arasındaki dengeyi yansıttığı belirtilmiştir [6].

Ürik asit, plazma antioksidan kapasitesine önemli ölçüde katkıda bulunan, iyi bilinen bir antioksidandır. Alveol epitel hücrelerinde üretilir ve daha sonra süte salınır [25].

Bu çalışmada, SHS ile subklinik mastitis olduğu belirlenen Anadolu mandalarının süt kompozisyonundaki total protein, albümin, trigliserit, üre ve ürik asit düzeylerine olan etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Çalışmanın materyalini Samsun ilinde yetiştirilen, 10 adet sağlıklı ve 6 adet subklinik mastitisli olduğu belirlenen Anadolu mandalarından alınan sütler oluşturdu.

### California Mastitis Testi

Mandalardan toplanan sütlerde subklinik mastitis olgusu California Mastitis Testi (CMT) analiz edildi. CMT sonuçları Schalm ve ark.,'nın [36]. tarif ettiği yonteme göre yapıldı.

### Süt serumu çıkarılması

Alınan sütler 15 000 g 15dk santrifüj edilerek yağ tabakası ayrılarak süpernatant çıkarıldı. Biyokimyasal analizler elde edilen bu süpernatanttan gerçekleştirildi [19].

### Biyokimyasal parametreler

Süt serumlarında albümin, total protein, trigliserit, üre ve ürik asit düzeyleri Biosistem kitleri kullanılarak otoanalizör (Biosistem A25, İspanya) cihazında ölçüldü.

### İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel analizler için SPSS (SPSS-PC, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) kullanıldı. Verilerin analizinde bağımsız örneklem için T-testi ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ve gruplar arasındaki ilişkiyi belirlemek için Pearson korelasyon testi uygulandı.

## Bulgular

Sağlıklı Anadolu manda sütlerinde ortalama SHS  $27.1 \pm 3.9$  olarak belirlendi. Somatik hücre sayısı  $429 \times 10^3$  hücre/mL'den büyük olan sütler subklinik mastitis pozitif olarak kabul edildi. Subklinik mastitisli manda sütlerinde SHS ortalaması ise  $1529.66 \pm 547.05$  olarak belirlendi. Subklinik mastitisli olan Anadolu Manda sütlerinde SHS'deki artışın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ( $P < 0,001$ ) (Tablo 1).

Subklinik mastitisli ve sağlıklı manda süt serumundaki albümin, total protein, trigliserit, üre ve ürik asit düzeyinin ortalaması ve standart hata değerleri tablo 1'de sunulmuştur.

Subklinik mastitisli mandaların süt serumunda albümin düzeyinin sağlıklı manda sütüne göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı ( $P < 0,05$ ), total protein ve üre düzeyinin ise subklinik mastitisli olan mandalarda sağlıklı olan manda sütlerine göre arttığı ama bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P > 0,05$ ) belirlendi.

Subklinik mastitisli mandaların süt serumunda trigliserit düzeyinin sağlıklı manda süt serumuna göre önemli düzeyde azaldığı ( $P < 0,05$ ), ürik asit düzeyinin ise hafif düzeyde azaldığı belirlendi ( $P > 0,05$ ).

**Tablo 1.** Subklinik mastitisli ve sağlık manda sütlerindeki, somatik hücre sayısı (SHS), albümin, total protein, trigliserit, üre ve ürik asit düzeyleri (ortalama  $\pm$  SE)

	Sağlıklı grup	Mastitisli grup	P
Albümin (g/dl)	$2.7 \pm 0.15$	$7.33 \pm 1.72$	0,021
Total Protein(g/dl)	$1.16 \pm 0.22$	$2.03 \pm 0.37$	0,425
Trigliserit (mg/dl)	$53.9 \pm 10.27$	$37.16 \pm 3.48$	0,003
Üre (mg/dl)	$28.2 \pm 1.91$	$35 \pm 3.23$	0,51
Ürik asit (mg/dl)	$1.37 \pm 0.15$	$0.94 \pm 0.23$	0,428
SHS	$27.1 \pm 3.9$	$1529.66 \pm 547.05$	0

SHS, albümin, total protein, trigliserit, üre ve ürik asit düzeyleri arasındaki korelasyon ilişkisi tablo 2'de sunulmuştur.

SHS ile ürik asit arasında önemli düzeyde negatif korelasyon ( $r = -0.649^{**}$ ) olduğu SHS ile albümin arasında önemli düzeyde pozitif korelasyon ( $r = 0.786^{**}$ ) olduğu belirlendi.

Total protein, albümin ve üre arasında önemli düzeyde pozitif korelasyon olduğu belirlendi

( $r = 0.772^{**}$ ,  $r = 0.731^{**}$ ). Aynı şekilde trigliserit ile ürik asit düzeyi arasında da pozitif korelasyon ( $r = 0.439$ ) olduğu belirlendi. Üre ve ürik asit arasında ise negatif korelasyon ( $r = -0.457$ ) olduğu saptandı.

**Tablo 2.** Somatik hücre sayısı (SHS), Albümin (Alb), total protein (TP), trigliserit (TG), üre ve ürik asit (ÜA) düzeyleri arasındaki korelasyon ilişkisi

	Alb	TP	TG	ÜRE	ÜA	SHS
Alb	1	0.772**	-0,208	0,530*	-0,376	0.786**
TP		1	0,121	0.731**	-0,249	0.466
TG			1	0,041	0,439	-0.241
ÜRE				1	-0,457	0.455
ÜA					1	-0.649**
SHS						1

\*( $P < 0,05$ ), \*\*( $P < 0,01$ )

## Tartışma ve Sonuç

Mastitis ülkemizde çok yaygın olarak görülmekte olup büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Özellikle subklinik mastitis diğer mastitislere oranla çok daha fazla görülmektedir. Erken teşhis edilmesi ve uygun olan tedavi yönteminin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Mastitisin memeyi işgal eden patojenlere karşı inflamasyon reaksiyonu olmasından dolayı süttten somatik hücrelere akan immünreaktif hücrelerin ve süt somatik hücre sayılarının dramatik bir şekilde artması en önemli belirteç olarak bildirilmiştir [11, 46]. Yaptığımız çalışmada subklinik mastitisli olan Anadolu mandalarının sütündeki SHS'deki artışın sağlıklı manda sütündeki SHS'ye göre istatistiksel olarak önemli düzeyde olduğunu belirledik ( $P < 0,05$ ). Subklinik mastitis, süt kompozisyonunda değişiklik ile bağışıklık sisteminin baskılanmasına neden olabilmektedir. Sığır sütündeki somatik hücre sayısının, meme sağlığı ve süt kalitesinin bir göstergesi olduğu ve enflamatuar bir uyarandan sonra hücresel bağışıklık tepkisi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir [24].

SHS'si yüksek olan subklinik mastitisli manda sütlerinde total protein miktarının hafif arttığını ama bunun istatistiksel olarak önemli olmadığını belirledik ( $P > 0,05$ ). Subklinik mastitisin proteinlerin kandan süte geçişini kolaylaştıran kılcal geçirgenliği

artırabileceği bildirilmiştir [5]. Bizim çalışmamıza paralel olarak Şahin ve Kaşıkçı (2014), esmer ineklerde SHS ile total protein arasında önemli düzeyde pozitif bir korelasyon olduğunu bildirmiştir. Aynı şekilde Najafi ve ark. (2009), süt tankındaki hücre sayısı ile sütün protein içeriği arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu, sütün protein fraksiyonlarının ilkbahar ve kış aylarında diğer aylara göre daha fazla değişim gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayşan ve ark. (2011) ise süt ineklerinde SHS yüksek olanlarda total protein düzeyinin etkilenmediğini bildirmişlerdir.

Subklinik mastitisli manda sütlerinde albümin düzeyinin önemli düzeyde arttığını belirledik ( $P<0.05$ ). Bizim çalışmamıza paralel olarak [3,12,44,47], koyunlarda [22] ve keçilerde [23] subklinik mastitisli sütlerde albümin düzeyinin arttığı bildirilmiştir. Albümin sentezinin yapıldığı başlıca yer karaciğer olup, az miktarda da olsa ekstrahepatik olarak meme bezi epitel hücrelerinde üretilmektedir [38]. Subklinik mastitis durumunda sütteki albümin miktarının artması yangısal durumuna bağlı olarak meme bezi epitel hücrelerinde sentezinin artmasından ve kan damarlarından sızıntı yaparak sütün içine geçmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Sütteki yağ oranı sütün fiyatlanmasını ve kalitesini etkileyen önemli unsurlardan biridir [29]. Yaptığımız çalışmada SHS yüksek olan sütlerde trigliserit düzeyinin etkilenecek şekilde azaldığı, trigliserit düzeyi ile süt yağı oranı arasında önemli düzeyde negatif korelasyon olduğunu belirledik ( $P<0.05$ ). Bizim çalışmamıza paralel olarak mandalarda [1] ve ineklerde [31,32,35] bu ilişkinin önemli olduğunu bildirilmiştir. Subklinik mastitis durumunda mandalarda süt serumunda yağ miktarının azalmasının meme bezinin sentez ve sekresyon yeteneğinin azalmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Süt ve kandaki üre konsantrasyonu, protein alımı, protein türü ve protein enerjisinden kolayca etkilenmektedir [48]. Somatik hücre sayısı yüksek olanlar manda sütlerinde üre düzeyinin hafif yükseldiğini bunun istatistiksel olarak önemli olmadığını belirledik ( $P>0.05$ ). Bizim çalışmamıza paralel olarak SHS yüksek olan siyah alaca ineklerde üre düzeyinin hafif arttığı bunun istatistiksel olarak önemli olmadığını bildirilmiştir [7].

Ürik asit düşük molekül ağırlıklı hücre içi bir antioksidandır [20]. SHS yüksek olan subklinik mastitisli mandaların süt serumunda ürik asit düzeyinin sağlıklı manda sütüne göre azalmış olduğunu belirledik. İnek [14,39] ve keçi [40,41] serumunda ürik asit düzeyinin arttığı bildirilmiştir. Ürik asit, antioksidant madde olup radikalleri yakalama özelliği bulunmakta olup SHS ile ürik asit arasında önemli düzeyde negatif korelasyon olduğu ( $r=-0.649^{**}$ ), radikallerin artmasından dolayı süt serumunda ürik asit düzeyinin azalmış olabileceği düşünüldü.

Anadolu ırkı manda süt serumunda SHS yüksek olan subklinik mastitisli manda sütlerinin serumu sağlıklı olan mandalara göre süt kompozisyonunu değiştirdiği belirlendi. SHS ile trigliserit ve ürik asit arasında negatif korelasyon olduğu, albümin, total protein ve üre arasında ise pozitif korelasyon olduğu saptandı. Anadolu ırkı manda süt serumunda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan bu çalışma ile elde edilen bu bulguların klinik ve laboratuvar bulguları ile birlikte subklinik mastitis anlamada yardımcı olabileceği, tanısal ve prognostik olarak kullanılabilirliği kanısına varılmıştır.

## Kaynaklar

- Ahmad T, Bilal M, Uallah S, Rahman ZU, Muhammad G, (2007). *Impact of mastitis severity on mineral contents of buffalo milk*. Pak J Agri Sci. 44, 176-178.
- Ahmad S, Gaucher I, Rousseau F, Beaucher E, Piot M, Grongnet JF, Gaucheron F, (2008). *Effects of acidification on physicochemical characteristics of buffalo milk: A comparison with cow's milk*. Food Chem. 106, 11-17.
- Alaçam E, Nizamloğlu M, Erganiş O, (1988). *İneklerde subklinik mastitislerin tanısı amacı ile süt ve kanda PGF2 alfa ile bazı mikrobiyolojik, hücresel ve biyokimyasal değerlerin araştırılması*. Doğa T Vet ve Hay Derg. 12, 11-17.
- Alaçam E, Tekeli T, Erganiş O, İzgi N. (1989). *İnek ve mandalarda subklinik mastitislerin tanısı, etkenlerin izolasyonu ve bunlara karşı etkili antibiyotiklerin belirlenmesi*. SÜ Vet Fak Derg. 5, 91- 101.
- Andrei S, Adela P (2004). *Vitamine, Enzime, Hormoni – Analize Biochimice*, Editura CLUSIUM, Cluj-Napoca, ISBN 973-555-434-8.
- Ayaşan T, (2009). *Süt ineklerinin beslenmesinde süt üre nitrojen önemi*. GOÜ Ziraat Fak Derg. 26, 27-33.
- Ayaşan T, Hızlı H, Yazgan E, Kara U, Gök K, (2011). *Somatik hücre sayının süt üre nitrojen ile süt kompozisyonuna olan etkisi*. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 17, 659-662.
- Baştan A, (2010). *İneklerde Meme Sağlığı ve Sorunları*. Kardelen Ofset Matbaacılık, Ankara.
- Blowey R, Edmondson P, (1995). *Mastitis Control in Dairy Herds*. Farming Press Books, Ipswich, United Kingdom.

10. Butler WR, Calaman JJ, Bean SW, (1996). *Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle*. J Anim Sci. 74, 858-865.
11. Bruckmaier RM, Weiss D, Wiedemann M, Schmitz S, Wendl G, (2004). *Changes of physicochemical indicators during mastitis and the effects of milk ejection on their sensitivity*. J Dairy Res. 71, 316-321.
12. Coulon JB, Gasqui P, Barnouin J, Ollier A, Pradel P, Pomies D, (2002). *Effect of mastitis and related-germ on milk yield and composition during naturally-occurring udder infections in dairy cows*. Anim Res. 51, 383-393.
13. Dairyman's Digest, (2009). *What You Should Know About Somatic Cells*. Winter issue. [http://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/dynamiques/PDF\\_AN/Management/WhatShouldKnowSCC.pdf](http://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/dynamiques/PDF_AN/Management/WhatShouldKnowSCC.pdf). Erişim Tarihi, 22.05.2018.
14. El-Deeb WM, (2018). *Clinicobiochemical investigations of gangrenous mastitis in does: immunological responses and oxidative stress biomarkers*. J Zhejiang Univ Sci B. 14, 33-9.
15. Fthenakis GC, El-Masannat ET, Booth JM, Jones JET, (1991). *Somatic cell count of ewes' milk*. Br Vet J. 147, 575-581.
16. Gürbulak K, Canoğlu E, Abay M, Atabay O, Bekyurek T, (2009). *Determination of subclinical mastitis in dairy cows by different methods*. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 15, 765-770.
17. Ishikawa H, Shimizu T, Hirano H, Saito N, Nakano T, (1982). *Protein composition of whey from subclinical mastitis and effect of treatment with levamisole*. J Dairy Sci. 65, 653-658.
18. Jonker JS, Kohn RA, Hight J, (2002). *Use of milk urea nitrogen to improve dairy cow diets*. J Dairy Sci. 86, 939-946.
19. Kandemir FM, Yüksel MN, Özdemir N, Devci H, (2013). *A different approach to diagnosis of subclinical mastitis: milk arginase activity*. Veterinarski Arhiv. 83, 603-610.
20. Kassim SK, Elbeigermi M, Nasr GF, Khalil R, Nassar M, (2002). *The role of interleukin-12, and tissue antioxidants in chronic sinusitis*. Clin Biochem. 35, 369-375.
21. Kauffman AJ, St-Pierre NR, (2001). *The relationship of milk urea nitrogen to urine nitrogen excretion in Holstein and Jersey cows*. J Dairy Sci. 84, 2284-2294.
22. Leitner G, Chaffer M, Shamay A, Shapiro F, Merin U, Ezra E, Saran, A, Silanikove N (2004a). *Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep*. J Dairy Sci. 87, 46-52.
23. Leitner G, Merin U, Silanikove N, (2004b). *Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats*. J Dairy Sci. 87, 1719-1726.
24. Lindmark-Mansson H, Akesson B, (2000). *Antioxidative factors in milk*. Br J 406 Nutr. 84, S103-S110.
25. Lindmark-Mansson H, Branning C, Alden G, Paulsson M, (2006). *Relationship between somatic cell count, individual leukocyte populations and milk components*. Int Dairy J. 16, 717-727.
26. Najafi MN, Mortazavi SA, Koocheki A, Khorami J, Rezik B, (2009). *Fat and protein contents, acidity and somatic cell counts in bulk milk of holstein cows in the Khorasan Razavi province*. Iran International Journal of Dairy Techn. 62, 19-26.
27. Ng-Kwai-Hang KF, Hayes JF, Moxley JE, Monardes HG (1985). *Percentages of protein and nonprotein nitrogen with varying fat and somatic cells in bovine milk*. J Dairy Sci. 68, 1257-1262.
28. Nourozi M, Moussavi AH, Abazari M, Zadeh MR, (2010). *Milk urea nitrogen and fertility in dairy farms*. J Anim Vet Adv. 9, 1519-1525.
29. Olechnowicz J, Jaskowski JM, (2010). *Impact of clinical lameness, calving season, parity, and month of lactation on milk, fat, protein, and lactose yields during early lactation of dairy cows*. Bull Vet Inst Pulawy. 54, 605-610.
30. Özyurtlu N, (2011). *İneklerde mastitisin ekonomik ve sağlık açısından önemi*. Dicle Üniv Vet Fak Derg. 1, 36-38.
31. Paura L, Kairisha D, Jonkus D, (2002). *Repeatability of milk productivity traits*. Vet Zootech-Lith. 19, 90-93.
32. Rajčević M, Potočnik K, Levstek J, (2003). *Correlations between somatic cells count and milk composition with regard to the season*. Agric Conspec Sci. 68, 221-226.
33. Raynal-Ljutovac K, Pirisi A, De Cremoux R, Gonzalo C (2007). *Somatic cells of goat and sheep milk: analytical, sanitary, productive and technological aspects*. Small Rumin Res 68,126-144
34. Roy B, Brahma B, Ghosh S, Pankaj PK, Mandal. G, (2011). *Evaluation of milk urea concentration as useful indicator for dairy herd management: A review*. Asian J Anim Vet Adv. 6, 1-19.
35. Sawa A, Piwczynski D, (2002). *Somatic cell count and milk yield and composition in Black and White x Holstein-Friesian cows*. Med Weter. 58, 636-640.
36. Schalm OW, Carrol EJ, Jain NC., (1971). *Bovine Mastitis*. Lea-Febiger Comp., Philadelphia.
37. Sederevicius A, Kabasinskiene A, Savickis S, Svedaite V, Makauskas S, (2008). *Milk urea nitrogen as an important indicator of dairy cow: nutrition review*. Vet Zootech-Lith. 44 (66).
38. Shamay A, Homans R, Fuerman Y, Levin I, Barash H, Silanikove N, Mabeesh SJ (2005). *Expression of albumin in non-hepatic tissues and its synthesis by the bovine mammary gland*. J Dairy Sci. 88, 569-576.
39. Silanikove N, Shapiro F, Leitner G, (2007). *Posttranslational ruling of xanthine oxidase activity in bovine milk by its substrates*. Biochem Biophys Res Commun. 363, 561-565.
40. Silanikove N, Rauch-Cohen A, Shapiro F, Arieli A, Merin U, Leitner G, (2012). *Lipopolysaccharide challenge of the mammary gland in cows induces nitrosative stress that impaired milk oxidative stability*. Animal. 6, 1451-1459.
41. Silanikove N, Merin U, Shapiro F, Leitner G, (2014). *Subclinical mastitis in goats is associated with upregulation of nitric oxide derived oxidative stress that causes reduction of milk antioxidative properties and impairment of its quality*. J Dairy Sci. 97, 3449-55.

42. Şahin A, Kaşıkçı M, (2014). *Esmir ineklerde somatik hücre sayısı ve bazı çiğ süt parametreleri arasındaki ilişkilerin belirlenmesi*. TURJAF. 2, 220-223.
43. Şahin M, Çolak A, Otlu S, Aydın F, Genç O, Güler MA, Oral H, (1997). *Kars yöresi ithal Simental ineklerinde subklinik ve klinik mastitislerin görülme oranları ve etkili antibiyotiklerin belirlenmesi*. Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 3, 49-55.
44. Urech, E, Puhan Z, Schallibaum M, (1999). *Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis*. J Dairy Sci. 82, 2402-2411.
45. Varrichio ML, Di Francia A, Masucci F, Romano R Proto V, (2007). *Fatty acid composition of Mediterranean buffalo milk fat*. Italian J Animal Sci. 6, 509-511.
46. Viguier C, Arora S, Gilmartin N, Welbeck K, O'Kennedy R, (2009). *Mastitis detection: current trends and future perspectives*. Trends Biotechnol. 27, 486-493.
47. Vijayalakshmi P, Prathaban S, Dhanapalan P, (2001). *Comparative study on the efficacy of diagnostic tests in the field diagnosis of bovine mastitis*. Indian Vet J. 78, 4-6.
48. Whitaker DA, Kelly JM, Eayres HF, (1995). *Assessing dairy cow diets through milk urea tests*. Vet Rec. 136, 179-180.
49. Yüksel M, Kandemir FM, Deveci H, Özdemir N (2009). *The serum ALP, ALT and glucose levels of healthy and subclinically mastitic cows*. J Vet Sci Ataturk University. 4, 163-168.



## Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* ve Önemi

Barışhan Doğan<sup>1</sup>, Mücahit Palaz<sup>1</sup>, Müjgan İzgür<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 03.05.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 06.07.2018

**Özet:** Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), antimikrobiyallere karşı geliştirdiği direnç mekanizmaları sayesinde dikkatleri üzerine çekerek günümüzde çok önemli bir konuma sahip olmuştur. Stafilocoklar, insanlarda ve hayvanlarda normal mikrobiyota etkeni olarak bulunmasının yanı sıra patojen, humanoz, zoonoz karakterli enfeksiyonlar başta olmak üzere lokal ve sistemik enfeksiyonlara neden olan piyojenik karakterli etkenlerdir. Hazırlanan bu derleme ile MRSA'nın önemine dikkat çekmek, bilinçli antibiyotik kullanımına vurgu yapmak amaçlanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** MRSA, Metisilin direnci, *Staphylococcus aureus*.

### Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and Importance

**Abstract:** Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has a very important position today by drawing attention to its resistance mechanisms developed against antimicrobials. Staphylococci have a pyogenic character that causes local and systemic infections, particularly pathogenic, humanotic, zoonotic infections, as well as normal microbiota effects in humans and animals. With this review, it is aimed to draw attention to the importance of MRSA and to emphasize the use of conscious antibiotics.

**Key words:** MRSA, Methicillin resistance, *Staphylococcus aureus*.

### Giriş

*Staphylococcus aureus*'lar ölümcül tehlikeye sahip mikroorganizmalar olarak geçtiğimiz yüzyıl boyunca tıbbi bilimler alanında oldukça önemli yer bulmuştur. Stafilocoklar ilk kez 1881 yılında İskoçya'lı cerrah ve bakteriyolog Alexander Ogston tarafından tanımlanmıştır. Etkenin o dönemde çok ağır klinik tabloyla seyreden, tedavisi oldukça zor, ölümcül karakterde enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir [35]. *S. aureus*'larda bildirilen ilk antibiyotik direnci 1920'li yılların sonuna doğru yaygın klinik kullanıma giren sülfonamid grubu antibiyotiklerle başlamıştır. 1928 yılında Alexander Fleming'in penisilini bulmasından sonra 1940 yılında Forey ve Chain tarafından penisilinin üretiminin başarılması ile stafilocokal enfeksiyonların tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmiştir [8]. Ancak penisilinin yaygın bir şekilde klinik kullanıma girmesiyle birlikte yaklaşık dört yıl içerisinde penisiline dirençli (beta-laktamaz enzimi sentezleyen) *S. aureus* suşlarının varlığı açıklanmıştır. Stafilocoklarda beta-laktamaz (penisiliniz) sentezlenmesi ilk olarak 1944'te Kirby tarafından bildirilmiştir. Bu tarihten itibaren *S. aureus* suşlarında penisilin direnci giderek art-

mış, 1951 yılında çoklu dirençli *S. aureus* suşlarının varlığı bildirilmiştir [30].

Penisiline karşı oluşan direnç problemine 1959 yılında beta-laktamaz enzimine dayanıklı, semisentetik (yarı sentetik) bir penisilin olan metisilin ile çözüm bulunmuştur [41]. 1960 yılında metisilinin ve daha sonra da penisilinaza (beta-laktamaz) dirençli diğer penisilinlerin kullanıma girmesiyle birlikte stafilocokal enfeksiyonların tedavisinde önemli başarılar elde edilmiştir. Metisilinin çok yaygın ve özensiz kullanımı ile bulunan bu çözüm de uzun sürmemiş, kısa bir süre sonra SCCmec (SCC, Staphylococcal Cassette Chromosome; mec, metisilin direncine neden olan genetik eleman) klonlarının kazanılmasıyla *S. aureus* suşlarında çoklu antibiyotik direnç problemi ortaya çıkmıştır. İlk olarak 1961 yılında İngiltere'de Jevons tarafından metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatları tanımlanmıştır [24].

MRSA'da direnç probleminin artması ile birlikte dünya genelinde başta nozokomiyal yani hastane kaynaklı enfeksiyonlar (HA-MRSA-Hospital Acquired MRSA) olmak üzere, toplumsal kaynaklı (CA-MRSA-Community Acquired MRSA) ve hay-

vansal kaynaklı (LA-MRSA-Livestock Acquired MRSA) enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir. HA-MRSA yüksek mortalite ile seyreden enfeksiyonların en önemli nedenleri arasında gösterilmektedir [9, 33].

Günümüzde MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde en çok kullanılan antibiyotikler ise vankomisin ve teikoplanindir. Bunların yanı sıra linezolid, daptomisin ve tigesiklin gibi yeni antibiyotikler de kullanılmaya başlamıştır. Buna rağmen stafilokoklarda görülen hızlı direnç gelişimi her iki yeni antibiyotiğe karşı da ortaya çıkmıştır. 1996 yılında VISA (Vancomycin Intermediate *S. aureus*) izolatları ve 2002 yılında da VRSA (Vancomycin Resistant *S. aureus*) izolatları görülmeye başlanmıştır. Linezolid ilk kez 2000 yılında klinik kullanıma girmiş ve bundan yaklaşık bir yıl gibi çok kısa bir süre sonra ilk linezolid dirençli MRSA izolatı tanımlanmıştır. Daha sonra benzer bir şekilde, daptomisin ilk kez 2003 yılında klinik kullanıma girmiş ve kullanıma girdikten iki yıl sonra daptomisin dirençli MRSA izolatları tanımlanmıştır [43].

### Stafilokoklarda Metisilin Direnç Mekanizmaları

Metisilin, beta-laktamaz enziminin hidrolizine dirençli penisilin grubu antibiyotikler içerisinde ilk elde edilen ve klinik kullanıma ilk giren antibiyotiktir [24]. Metisilin direnci, beta-laktamaz enzimiyle hidrolize olmayan beta-laktam antibiyotiklere (metisilin, oksasilin, kloksasilin, dikloksasilin) karşı gözlemlenen direnç olarak adlandırılır. Metisilin direnci, aynı zamanda intrinsik direnç yoluyla yani antibiyotiği inaktive eden faktörün beta-laktamaz enzimiyle değil, kromozomal yolla meydana geldiği bilinir [6].

*S. aureus*'ta metisilin direnci, penisilnaz (beta-laktamaz) üretiminden farklı bir mekanizma olan "Penisilin Bağlayan Protein" (PBP)'ler ile gerçekleşmektedir. PBP'ler, peptidoglikan öncüllerini yapılmakta olan hücre duvarına taşımak ve bağlamakla görevlidir. Metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA)'larda, beş adet "Penisilin Bağlayan Protein" (PBP) bulunurken, MRSA'larda bunlara ek olarak PBP2 ya da PBP2a olarak adlandırılan 78 kDa ağırlıkta olan farklı bir PBP sentezlenmektedir [16]. PBP2/2a, diğer PBP'lerden farklı olarak beta-laktam yapısındaki antibiyotiklere karşı düşük affinite göstermektedir. Dolayısıyla, beta-laktam

grubu antibiyotik varlığında, yüksek affinite gösteren PBP'lerin fonksiyonunu görerek peptidoglikan sentezini sürdürebilme yeteneğine sahip olan tek transpeptidazdır [14, 25].

Duyarlı stafilokok izolatlarında beta-laktamlar, duvar prekürsörleri ile yarışarak enzimin aktif bölgesine bağlanıp, bu transpeptidasyon basamağını inhibe ederler. Ancak, doğal prekürsörden farklı olarak, bu bağlanmanın geriye dönüşlü olmaması nedeni ile PBP aktivitesi kalıcı olarak bloke edilir ve bakteriyel ölüm gerçekleşir. Bakteri duvarındaki peptidoglikanın çapraz bağlanmasını sağlayan diğer PBP'ler beta-laktamlar varlığında inaktive olurken, PBP2/2a beta-laktamlara karşı düşük affiniteye sahip olduğundan, inaktive olmuş PBP'lerin yerine geçer ve varlığında hücre duvarı peptidoglikan sentezi tamamlanır [14, 25]. Bu proteinlerin bir kısmı iki fonksiyonlu olup hem transglükosidaz hem de transpeptidaz aktivitesine sahiptir [20]. *S. aureus*, bir adet iki fonksiyonlu PBP2 ve tek fonksiyonlu PBP1, PBP3 ve PBP4 olmak üzere üç adet PBP'ye sahiptir [25]. MRSA'da temel direnç mekanizması, beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı düşük affiniteye sahip yeni bir penisilin bağlayan protein olan PBP2/2a sentezine dayanmaktadır [6, 29].

PBP'leri *mecA* ve *mecC* olarak adlandırılan genler kodlamaktadır ve bu genler bakteri kromozomunda *SCCmec* kasetleri üzerinde yer almaktadır. MRSA'lar bu gene sahipken MSSA'larda bu gen bulunmamaktadır. *SCCmec* kasetlerinin büyüklükleri 20 kb'dan 68 kb'a kadar değişkenlik gösteren 11 tipi (Tip I-XI) bulunmaktadır [1, 2, 39]. Tip I, IV ve V, sadece yapısal ve regülatör genler ile rekombinaz genlerini içerir. Bu alt tiplerde, transpozon elemanları ve beta-laktam antibiyotik dışındaki antibiyotiklere dirençten sorumlu olan genler bulunmamaktadır. HA-MRSA'lar *SCCmec* kasetleri üzerinde alt tip I, II ve III'ü içerirken, CA-MRSA'lar *SCCmec* kasetleri üzerinde alt tip IV ve V'i içermektedir [1, 2, 20].

MRSA'larda *mecA* geninin varlığı ile ortaya çıkan bu direnç, fenotipik laboratuvar testlerinde homojen direnç ve heterojen direnç olmak üzere iki şekilde ortaya çıkmaktadır. Homojen direnç, koloniyi oluşturan tüm *S. aureus*'ların *mecA* genine sahip olması ve tamamında da bu genin aktif olması durumudur. Oluşan yüksek direncin çevresel faktörlerle ilişkisi bulunmamaktadır [36]. *mecA*

geninin tamamında aktif olması durumunda ortaya çıkan fenotipik direnç yüksek düzeydedir. Homojen dirençte bakterilerin tamamı yüksek konsantrasyondaki metisilin varlığında üreyebilme özelliği göstererek yüksek düzeyde direnç ortaya koyarlar [6, 18]. MRSA'larda görülen bu yüksek direnç yakın geçmişe kadar nadiren görülmekteyken günümüzde oldukça fazla rastlanmaktadır. Heterojen direnç, koloniyi oluşturan tüm *S. aureus* suşlarının *mecA* genini taşımalarına rağmen yüksek direncin  $10^6$ - $10^8$  bakteriden birinde belirlenebilmesi olarak tanımlanmaktadır ve izolasyon uygulamaları sırasında en sık karşılaşılan direnç şeklidir [19, 20]. Heterojen direnç gösteren MRSA'larda, stafilkokların çoğunluğu (%99) düşük metisilin konsantrasyonlarına (1-5 µg/mL) duyarlı iken,  $10^2$ - $10^8$  stafilkoktan biri yüksek metisilin konsantrasyonlarına ( $\geq 50$  µg/mL) direnç göstermektedir [6, 7].

Heterojen direnç gösteren MRSA suşları, NaCl veya sukrozlu besiyeri kullanılması, düşük derecede inkübasyon gibi bazı özel kültür koşullarının sağlanması durumunda homojen direnç gösterir hale gelmektedir. Değişik kültür koşullarına göre direncin ortaya konulmasında meydana gelen bu değişiklik geçicidir ve tamamen fenotiptir [6]. Homojen direncin ortaya çıkmasını arttıran bazı koşulların bakteri otolizisindeki değişikliklerle ilişkili olduğu gözlemlenmiştir [5, 7, 23]. *S. aureus* suşlarında dirençten sorumlu geni taşımalarına rağmen heterojen direncin görülme nedeninin, *mecA* geninin fonksiyonunu kontrol ettiği düşünülen *fem* (factors essential for the expression of methicillin resistance) faktörü olarak tanımlanmış genlerden ileri geldiği bilinmektedir. Heterojen direncin gelişiminde *fem A* ve *fem X* kontrol genlerinden bir veya birkaçının *mecA* geninin ekspresyonunu inhibe etmesine bağlı olduğu düşünülmektedir [6, 23].

MRSA suşlarında olduğu gibi MSSA suşlarında da *fem* faktörleri bulunabilmektedir [4, 10, 19]. *fem* faktörünün yanı sıra *mecRI-mecI* sistemi yer almaktadır. *mecA* geni, *mecRI* ve *mecI* olmak üzere iki regülatör gen ile kontrol edilmektedir. *mecRI* ve *mecI* genleri beta-laktamaz geninin regülatör genleri olan *blaRI* ve *blaI* ile yapı, fonksiyon ve regülasyon mekanizması açısından benzerlik göstermektedir [28]. *BlaI*, *blaI* geni tarafından kodlanan, beta-laktamaz geninin transkripsiyonunu inhibe eden bir proteindir. *BlaRI* ise *blaRI* geni tarafından

kodlanır ve beta-laktamaz varlığında beta-laktamaz gen transkripsiyonunu sağlar. *mecI* ve *mecRI*, *mecA* için aynı düzenleyici rolü oynar. *mecI*, *mecA*'yı baskılayan bir protein, *mecRI* ise sinyal uyarıcı bir protein kodlar [27, 28].

Fenotipik direnci ortaya çıkaran diğer durum ise beta-laktamaz plazmidini olarak bilinmektedir. Beta-laktamaz enzim yapımı *blaZ* geni tarafından kodlanır. Antirepresör olan *blaRI* ve represör olan *blaI* olmak üzere iki gen tarafından kontrol edilir. Ortamdaki beta-laktam, *BlaRI*'e (transmembran proteini) bağlanır ve bakterinin dışından içine sinyal iletimini sağlayarak beta-laktamaz enziminin sentezinin başlamasında rol oynar. Böylece metisilin direncinin fenotipik olarak ortaya konmasında etkili bir rol üstlenmiş olur [38].

MRSA'ların çoğunda beta-laktamaz genini taşıyan plazmid bulunması ve *mecRI-mecI* sisteminin defektif olması nedeniyle *mecA* geninin esas olarak "*bla sistemi*" ile indüklendiği düşünülmektedir [6, 7]. Beta-laktam grubunda yer alan bir antibiyotik ile indüksiyon yapıldığında, *blaRI-blaI* sisteminde meydana gelen indüklenme, *mecRI-mecI* sisteminden daha hızlı olmaktadır. Aynı zamanda *mecRI-mecI* sistemi ile kıyaslama yapıldığında, *mecA* geninin baskılanması, *blaRI-blaI* sistemine göre daha zayıf olmaktadır [17].

MRSA'larda *mecC* geninin varlığı ilk olarak 2007 yılında Güneybatı İngiltere'de sığır mastitisinin epidemiyolojik bir çalışması sırasında tank sütü örneklerinden MRSA izolasyonu ile saptanmıştır [12]. LGA251 olarak adlandırılan MRSA suşunun *mecA* geni ve PBP2/2a için doğrulayıcı testlerde tamamı negatif olarak belirlenmiştir. "Wellcome Trust Sanger Institute", LGA251 suşunun, başlangıçta *mecALGA251* olarak adlandırdığı yeni bir *mecA* geni homoloğu taşıdığını ortaya koymuştur [13]. LGA251 suşunun DNA'sı *mecA* genine %69 ve PBP'lerin amino asit kompozisyonuna %63 oranında özdeşleştiği saptanmıştır. LGA251 suşundan alınan *SCCmec* dizisi "Working Group on the Classification of SCC" tarafından değerlendirilerek Kasım 2009 yılında Tıp XI *SCCmec* geninin varlığını bildirmiştir ve *mecALGA251* olarak adlandırılan gen, 2012 yılında *mecC* olarak yeniden adlandırılmıştır [21, 22]. *mecC* geni tarafından kodlanmış PBP'lerin işlevi,  $\beta$ -laktam direncinin rolü ve dikkate değer farklılıkları, yapılan çalışmalar ile bildi-

rilmiştir. *mecC* tarafından kodlanan PBP'ler,  $\beta$ -laktam'a karşı yüksek affinite gösterirken, *mecA* geni tarafından kodlanan PBP'ler daha az affinite göstermiştir [26]. Termostabilite ve sıcaklık değerlerindeki aktivasyonu ile ilgili değerlendirmelerde ise *mecC* geni tarafından kodlanan PBP'ler, *mecA* geni tarafından kodlanan PBP'lerden daha kararsız yapıya sahip olduğu bildirilmiştir[26]. Bu karakterizasyonlar, MRSA'nın PBP2 fonksiyonunu ve metisilin direncindeki rolünü teyit etmektedir. *mecA* ve *mecC* genleri tarafından kodlanan proteinlerin davranışlarında önemli farklılıklar vardır. Bu moleküllerin ayırımında yapısal ve evrimsel temeller henüz tam olarak belirlenmemiştir ve bu konuda araştırmalar devam etmektedir [44].

## Sonuç ve Öneriler

MRSA prevalansı ülkemizde ve dünyada hızla artmaktadır. Prevalans ülkeler arasında, hastaneler ve hastanelerin farklı üniteleri arasında da değişik oranlar göstermektedir. MRSA çoklu ilaç direnci göstermesi nedeniyle günümüzde kullanılabilecek antibiyotik seçeneklerini oldukça kısıtlamaktadır. Tek başına bir antibiyotik yeterli olmamakta ve mutlaka kombine antibiyotik tedavisi uygulanmalıdır. Bu kapsamda kullanılabilecek antibiyotikler; vankomisin, linezolid, kinupristin, dalfopristin, daptomisin daha çok tercih edilmekte ve kombine şekilde kullanılmaktadır [8, 42, 43].

Hekimliğimizde hayvan türleri arasında gözlemlenen MRSA prevalans artışının temelinde bilinçsiz ve akılcı olmayan antibiyotik kullanımı söz konusudur [11]. Veteriner Hekimlik alanında antibiyotik kullanımı öncesi en kolay ve ekonomik metot olan antibiyogram uygulamasının yapılması ve doğru antibiyotiklerin tercih edilmesi gerekmektedir. Bu doğrultuda Veteriner Hekim kontrolünde antibiyotik kullanımı ile ilgili sıkı önlemler alınmalı, hayvanlarda kullanılan antibiyotiklerin türü, miktarı ve bu antibiyotiklere karşı oluşan direnç izlenmeli, uygun süre ve dozlarda kullanımına dikkat edilmeli, kontrolsüz ve aşırı ilaç kullanımından kaçınılmalıdır.

## Kaynaklar

1. Appelbaum PC (2006). MRSA the tip of the iceberg. *Clin Microbiol Infect.* 12(2):3-10.

2. Appelbaum PC (2007). Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* (45):65-70.
3. Baptiste KE, Williams K, Williams NJ, Wattret A, Clegg PD, Dawson S, Corkill JE, O'Neill T, Hart CA (2005). Methicillin-resistant *Staphylococci* in Companion Animals. *Emerg. Infect. Dis.* (11):1942-1944.
4. Berger-Baechi B (1989). Genetics of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* (23):671-675.
5. Chambers HF (1988). Methicillin-resistant staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* (1):173-186.
6. Chambers HF (1997). Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* (10):781-791.
7. Chambers HF, Hackbarth CJ (1987). Effect of NaCl and nafcillin on penicillin-binding protein 2a and heterogeneous expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* (31):1982-1988.
8. Chambers HF (2001). The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* Emerg. *Infect. Dis.* (7):178-182.
9. Demirel G, Fındık D, Dagi HT, Arslan U (2014). Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Genotypes Among University Students in TURKEY. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 45(6):1401-1409.
10. Eliopoulos G (2005). Antimicrobial agents for treatment of serious infections caused by resistant *S. aureus* and enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 24(12):826-831.
11. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(11):7687-7692.
12. Álvarez L, Webb C, Holmes M (2011). A novel field-based approach to validate the use of network models for disease spread between dairy herds. *Epidemiol Infect.* 139(12):1863-1874.
13. Álvarez L, Holden M, Lindsay H, Webb C, Brown D, Curran M, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, Parkhill J, Bentley SD, Edwards GF, Girvan EK, Kearns AM, Pichon B, Hill LRL, Larsen AR, Skov RL, Peacock SJ, Maskell DJ, Holmes M (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet.* 11(8):595-603.
14. Gordon RJ, Lowy FD (2008). Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin. Infect. Dis.* (46):350-359.
15. Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E (2006). Emergence and resurgence of methicillin-resistant *S. aureus* as a public health threat. *The Lancet.* (368):874-885.
16. Hackbarth CJ, Chambers HF (1993). *blaI* and *blaRI* regulate  $\beta$ -lactamase and PBP 2a production in methi-

- cillin resistant *S. aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* (39):1144-1149.
17. Hackbarth CJ, Miick C, Chambers HF (1994). Altered production of penicillin-binding protein 2a can affect phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* (38):2568-2571.
  18. Hartman BJ, Tomasz A (1986). Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents and Chemother.* (29):85-92.
  19. Henze U, Sidow T, Wecke J, Labischinski H, Berger-Bachi B (1993). Influence of femB on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *S.aureus*. *J Bacteriol.* (175):1612-1620.
  20. Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, Ito T (2002). Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* (292):67-74.
  21. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) (2009). Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for Reporting Novel SCC*mec* Elements. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(12):4961-4967.
  22. Ito T, International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) (2012). Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. *Antimicrob. Agents Chemother.* (56):4997-4999.
  23. Jacoby GA, Archer GL (1991). New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *N. Eng. J. Med.* (324): 601-612.
  24. Jevons MP (1961). Celbenin resistant *Staphylococci*. *BMJ.* (1):124-125.
  25. Jonge BL, Tomasz A (1993). Abnormal peptidoglycan produced in a methicillin-resistant strain of *S. aureus* grown in the presence of methicillin: functional role for penicillin-binding protein 2A in cell wall synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* (37):342-346.
  26. Kim C, Milheiriço C, Gardete S, Holmes MA, Holden MTG, de Lencastre H, Tomasz A (2012). Properties of a Novel PBP2A Protein Homolog from *Staphylococcus aureus* Strain LGA251 and Its Contribution to the  $\beta$ -Lactam-resistant Phenotype. *J Biol Chem.* 287(44): 36854–36863.
  27. Kobayashi N, Taniguchi K, Urasawa S (1998). Analysis of diversity of mutations in the *mecI* gene and *mecA* promoter/operator region of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* (42):717-720.
  28. Kuwahara-Arai K, Kondo N, Hori S, Tateda-suzuki E, Hiramatsu K (1996). Suppression of methicillin resistance in a *mecA* containing pre-methicillin-resistant *S. aureus* strain is caused by the *mecI* mediated repression of PBP2' production. *Antimicrob Agents Chemother.* (40):2680-2685.
  29. Liu GY (2009). Molecular pathogenesis of *S. aureus* infection. *Pediatr. Res.* (65):71-77.
  30. Lowy FD (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *New Eng. J. Med.* (20):520-531.
  31. Lozano C, López M, Gómez-Sanz E, Ruiz-Larrea F, Torres C, Zarazaga M (2009). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in food samples of animal origin in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* (64):1325-1326.
  32. Monecke S, Aamot HV, Stieber B, Ruppelt A, Ehrlich R (2014). Characterization of PVL-positive MRSA from Norway. *APMIS.* 122(7):580-584.
  33. Morgan M (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis. *J. Antimicrob. Chemother.* (62):1181-1187.
  34. Ogston A (1881). Report upon microorganisms in surgical diseases. *J Br Med.*(1):369-375.
  35. Özgünes N, Ergen P, Ceylan N, Yazıcı S, Aksoy Y (2002). Yatan hastalardan ve poliklinik hastalarından izole edilen stafilocok suşlarında metisilin direnci ve dirençli suşlarda glikopeptid duyarlılığı. *ANKEM Derg.* (16):423-426.
  36. Peacock S (2006). *Staphylococcus aureus*. *Principles and practice of clinical bacteriology.* (2):73-98.
  37. Pu S, Han F, Ge B (2009). Isolation and characterization of methicillin resistant *S. aureus* strains from Louisiana retail meats. *Appl. Environ. Microbiol.* (75):265-267.
  38. Ryffel C, Kayser FH, Berger-Bachi B (1992). Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin-resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* (36):25-31.
  39. Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S, Coleman DC (2011). Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type XI Carrying Highly Divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *bla<sub>Z</sub>*, and *ccr* Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(8):3765–3773.
  40. Shorr AF (2007). Epidemiology of staphylococ resistance. *Clin. Infect. Dis.* (45):171-176.
  41. Stefani S, Goglio A (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. *Int J Infect Dis.* 14(4):19-22.
  42. Stefani S, Varaldo PE (2003). Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* (9):1179-1186.
  43. Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G (2001). Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *The Lancet.* 358(9277):207-208.
  44. Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Baba T, Hiramatsu K (2010). Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*-Like Element in *Macroccoccus caseolyticus* . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 54(4):1469–1475.
  45. Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishal WR (2005). Community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *The Lancet Infect. Dis.* (5):275-286.

## Rekombinant DNA Teknolojisinin Veteriner Aşılarında Kullanımı

Merve Gizem Sezener, Alper Çiftci, Arzu Fındık

*Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye*

Geliş Tarihi / Received: 10.09.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 13.10.2018

**Özet:** İlk keşfedildiği yıllardan bu yana aşılar, infeksiyöz hastalıkların kontrolü için en etkili, nispeten ucuz maliyetli ve sürdürülebilir bir yöntem olarak kullanılmıştır. Bugün veteriner hekimlikte çoğunlukla canlı attenüe, inaktif ve toksoid aşılar kullanılmakla birlikte, daha güvenilir ve etkili aşılarla olan gereksinimden dolayı, rekombinant DNA teknolojisi önemli bir strateji olarak ortaya çıkmıştır. Tüm dünyada bu teknolojinin kullanıldığı aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Bu derlemede, veteriner hekimlikte hali hazırda kullanılan ve çeşitli hayvan türlerinin önemli bazı infeksiyonlarını kontrol altına almak için üzerinde çalışmalara devam edilen rekombinant aşılarla yer verilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Aşı, DNA, Rekombinant, Veteriner

### The Use of Recombinant DNA Technologies in Veterinary Vaccines

**Abstract:** Since their first exploration, vaccines have been used as the most effective, relatively inexpensive and sustainable method of controlling infectious diseases. Today, most of the licensed veterinary vaccines are in the form of live attenuated, inactive and toxoids. However, recombinant DNA technology has emerged as an important strategy because of the need for more effective and safety vaccines. All over the world, vaccine development studies using this technology are ongoing. In this review, currently used recombinant vaccines in veterinary medicine and also ongoing researches on development of new recombinant vaccines to be used to control some vital infections of various animal species were discussed.

**Key words:** DNA, Recombinant, Vaccine, Veterinary

### Giriş

Hastalıklara karşı koruma sağlamak amacıyla vücuda verilmek üzere tasarlanmış, zayıflatılmış veya inaktif hale getirilmiş patojenler olarak tanımlanan aşılar, tarihsel süreç içerisinde immunoloji, moleküler biyoteknoloji, biyokimya, genomiks ve proteomiks alanlarındaki gelişmelerle birlikte daha yeni teknolojilerle üretilebilir hale gelmiştir. Aşı teknolojilerindeki gelişmeler, farklı avantajlara sahip aşılarda geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Bu teknolojilerden biri de rekombinant DNA (rDNA) teknolojisidir. Hastalık etkenlerine ait çeşitli genlerin klonlanması, ekspresyon sistemlerinde eksprese edilmesi ve saflaştırılması esasına dayanan gerek insan hekimliği gerekse veteriner hekimlikte kullanılmakta olan rekombinant aşılarda bulunmaktadır. Birçok hastalığa karşı rDNA teknolojisinin kullanıldığı aşı geliştirme çalışmaları da devam etmektedir [14].

### Rekombinant DNA teknolojisi

rDNA teknolojisi, genetik rekombinasyon olaylarının yapay bir şekilde gerçekleştirilmesi esasına

dayanmaktadır. Teknoloji, çeşitli kaynaklardan elde edilen ve istenilen bir gen sekansına sahip DNA parçalarının uygun bir vektör aracılığıyla başka bir konağa (ekspresyon sistemleri) aktarılmasını içerir. Multidisipliner uygulamalara sahip olan bu teknoloji, aynı zamanda yaşamla ilgili olarak sağlığın iyileştirilmesi, gıda kaynaklarının artırılması ve farklı çevresel olumsuz etkilere karşı direnç gibi önemli konulara çözüm getirme potansiyeline de sahiptir. Rekombinant farmasötiklerin günümüzde güvenle kullanılmasının yanında bu teknoloji, gen terapisi ve genetik modifikasyonlar ile birlikte biyosağaltım ve önemli hastalıklara müdahalede kullanılmaktadır [14]. Aşı veya teşhis aracı geliştirilmesinde, attenüe/inaktif hücre kültürü mikrobiyel etken antijenlerinin büyük miktarlarda elde edilmesindeki güçlükler, bu teknolojinin kullanılması ile aşılabilmektedir. rDNA teknolojisi kullanılarak, istenilen gen ürünü protein, büyük miktarlarda, saf ve natif formda elde edilebilmektedir. Seriden seriye ("batch"den "batch"e) varyasyon göstermemesi ve güvenilir ürünler olması, rekombinant proteinlerin konvansiyonel yöntemlerle üretilen aşılarla göre sahip olduğu önemli avantajdır [2].

## Rekombinant DNA teknolojisinin veteriner aşılarında kullanımı

Rekombinant DNA teknolojisi ile geliştirilen aşılar “rekombinant aşı” olarak adlandırılmaktadır [10]. Rekombinant aşıların hastalığa neden olmamaları ve güçlü immun yanıt oluşturmaları önemli avantaj-

larındandır. İlk rekombinant aşılar, yaban hayatında kuduz hastalığını kontrol altına almak için 1980’lerin sonlarında geliştirilmiştir [25].

Şu an piyasada ticari olarak bulunan rekombinant veteriner aşılar Tablo 1’de sunulmuştur.

**Tablo 1.** Mevcut ticari rekombinant veteriner aşıları

Hedef Patojen	Hedef Hayvan	Marka İsmi	Özelliği	Kaynak
<i>Brucella abortus</i>	Sığır	RB-51	Rifamisin dirençli R	[19].
<i>Streptococcus equi</i>	At	Equilis StrepE	<i>aroA</i> silinmiş canlı aşı	[13].
<i>Chlamydomphila abortus</i>	Koyun	Ovilis Enzovax	Isıya duyarlı canlı aşı	[4].
<i>Mycoplasma synoviae</i>	Tavuk	Vaxsafe MS	Isıya duyarlı canlı aşı	[20].
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Tavuk	Vaxsafe MG	Isıya duyarlı canlı aşı	[3].
<i>Salmonella spp.</i>	Hindi ve tavuk	Megan Vac1	Çift geni silinmiş <i>S. Typhimurium</i>	[1].
<i>Bordetella avium</i>	Hindi	Art Vax	Isıya duyarlı canlı mutant suş	[12].
BHV-1	Sığır	Bovilis IBR Marker	gE geni silinmiş marker aşı	[28].
Equine Influenza Virus	At	Proteq-Flu	Canarypox virus vektör aşısı	[18].
West Nile Virus	At	West Nile- Innovator DNA	DNA aşısı	[7].
HTV ve IBDV	Tavuk	Vaxxitek HVT + IBD	Canlı rekombinant aşı	[6].
NDV	Tavuk	NA	HN rekombinant aşı	[24].
H <sub>5</sub> N <sub>1</sub> ve NDV	Tavuk	Vectormune FP-ND	Fowlpox virus vektör aşı	[24].
Kuduz	Köpek	Raboral	Vaccinia virus rekombinant aşı	[17].
Parvovirus	Köpek	Recombitek Canine Parvo	Canarypox virus vektör aşısı	[23].
Kedi Lösemi Aşısı	Kedi	Eurifel FeLV	Canarypoxvirus vektör aşısı	[23].
IHN	Alabalık	Novartis	DNA aşısı	[27].

**Sığır, koyun ve keçiler için rekombinant aşılar:** Sığırların klinik ve ekonomik açıdan önemli hastalıkları; sığır solunum sistemi kompleksi (shipping fever), inek-buzağı işletmelerindeki solunum sistemi enfeksiyonları ve yavru atmalardır. Bu hastalıklara yönelik rekombinant aşı denemeleri günümüzün güncel çalışma konularındandır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’nde şu an kullanım için ruhsatlandırılmış rekombinant sığır, koyun ve keçi için rekombinant aşılar piyasada bulunmamakla birlikte [11]; İnfeksiyöz Sığır Rinotraheitisi (IBR) eradikasyon programı için doğal olarak oluşan glikoprotein E (gE) silinmiş IBR aşısı Avrupa Birliği tarafından onaylanmıştır. IBR, besi sığırlarında solunum yolu hastalıklarının yanı sıra üremeye ilgili hastalıklar, konjunktivitis ve sinir sistemi hastalıklarından sorumlu bir Herpesvirus enfeksiyonudur. gE

geninin silinmesi, IBR virusunu zayıflatmakta ve sığırların sekresyonlarıyla saçılımını engellemektedir. Bu modifiye edilmiş canlı aşı, her yaş sığır için immunojeniktir ve güvenlidir [11]. Hastalıkların eradikasyon programları için, DIVA yaklaşımı olarak bilinen, infekte olanları aşılansmış hayvanlardan ayırt etme işlemi önemlidir. Gen silinmiş veya marker aşıların kullanımı, aşı içindeki marker veya vahşi türe ait virüslerle özgü proteinlere yönelik antikorların test edilmesine olanak sağlamakta ve doğal olarak maruz kalan hayvanlardan aşılansınları ayırt etmek için kullanılmaktadır. Bu aşının bir diğer önemli avantajı gE silinmiş aşı virusunun ve vahşi IBR virüsünün PCR ile ayırt edilebilmesidir.

BVDV(Sığır Viral Diyare Virusu) sığırlarda solunum, enterik, göz enfeksiyonları ve aynı zamanda abortlara neden olan viral bir hastalıktır. E2 yüzey

glikoproteini virus üzerindeki bir immunojendir ve BVDV'nin E2 protein genini kullanarak DNA aşılması hastalığa karşı koruma sağlamaktadır [21]. E2 proteini geni ile yapılan DNA aşılamanın ardından rekombinant E2 proteini ile bir rapel aşılamanın BVDV patojenik NY suşuna karşı iyi koruma sağladığı ortaya konulmuştur [16].

Sığırlarda shipping fever ile koyun ve keçilerde başlıca pnömoniye neden olan *M. haemolytica*'ya yönelik kullanılan aşılar, etkenin primer virüls faktörü olan lökotoksin üzerine odaklanmıştır. Lökotoksin geni, hücre hatlarında olduğu kadar bitkilerde de klonlanmış, eksprese edilmiş ve rekombinant proteinin lökotoksin nötralizan antikorları uyardığı belirlenmiştir [15]. PlpE olarak adlandırılan, büyük bir *M. haemolytica* yüzey lipoproteinini de potansiyel aşı adayı olarak tanımlanmış ve buna karşı oluşan antikorların kompleman aracılı *M. haemolytica*'yı öldürmede etkili olduğu bildirilmiştir. Bir rekombinant PlpE proteini laboratuvarında eksprese edilmiş, ticari bir *M. haemolytica* aşısına eklenmiş ve buzağılarda korunmayı arttırdığı bildirilmiştir [5].

Yeni doğanlarda öldürücü ishallerine neden olan enterotoksijenik *E. coli* (ETEC)'lerde bulunan piluslar, *E.coli*'nin bağırsak epiteline adezyonunu, ve kolonizasyonunu sağlayarak infeksiyonun oluşumuna neden olurlar. K99 fimbrial antijene sahip *E. coli* suşları genellikle sığır, koyun ve keçilerde ishale neden olmaktadır. FanC, bu immunojenik K99 proteininin ana alt birimidir. Bitkilere yabancı genlerin verilmesi için bir yöntem olan *Agrobacterium* aracılı transformasyon, yenilebilir bir aşı geliştirilmesinin ilk adımı olarak, K99'un FanC alt birimini soya fasulyesinde eksprese etmek, üzere başarılı bir şekilde kullanılmıştır [26]. Farelere soya fasulyesinden ekstrakte edilen protein enjekte edildiğinde, FanC'ye spesifik antikorlar ve sitotoksik T hücreleri yanıtlarının geliştiği bildirilmiştir [11].

*Brucella abortus* için genetik olarak tasarlanmış aşılarda (rekombinant genler, proteinler, vektörler ve modifiye *B. abortus* suşları) geliştirilmesi, etkinliğinin test edilmesi ve immunolojik cevapların değerlendirilmesine yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bununla birlikte birkaç istisna dışında, bu rekombinant aşılarda çoğu hedef tür olan sığırdaki test edilememiş veya sığırlarda koruma oluşturamamıştır [9].

**Kanatlılarda rekombinant aşılar:** Kümes hayvanları için ABD'de lisanslı 11 tane rDNA aşısı bulunmaktadır. Bu aşılarda 10 tanesi, konakçının bağışıklık sistemini uyarmak için spesifik genler vermek amacıyla tasarlanmış canlı rekombinant viral vektör aşılardır. Bunlardan yedi tanesinde seçilen patojen genleri eksprese etmek için vektör olarak zayıflatılmış kanatlı çiçek virüsü (FPV) kullanılmaktadır. Üçünde ise zayıflatılmış, Marek hastalığı virusu (MDV) veya vektör olarak yakından ilişkili patojen olmayan hindi Herpesvirusu kullanılmaktadır. Bakteriyel patojen olan *Salmonella* spp. için sadece bir lisanslı aşı vardır. Bu aşı zayıflatılmış bir bakteride çift gen silinmesiyle oluşturulan mutant bir aşıdır [11].

**Balıklar için rekombinant aşılar:** Su ürünleri yetiştiriciliğinde yaklaşık 20 yıldır aşı kullanımı yaygınlaşmıştır. Balık aşılarda; deniz ve tatlı su balıklarını etkileyen viral ve bakteriyel patojenleri içeren konvansiyonel aşılardır [11]. ABD'de şu anda balıklar için kullanılan rekombinant aşı bulunmamaktadır. Norveç'te rekombinant İnfeksiyöz Pankreatik Nekroz Virus (IPNV) aşısı, Şili'de SRS ve IPNV için subunit rekombinant bir aşı, Kanada'da çiftliklerde yetiştirilen Atlantik somonunda İnfeksiyöz Hemorajik Nekroz Virus (IHNV) için bir DNA aşısı onaylanmıştır. IPNV aşılarda, virus parçacıklarının ve önemli bir antijenin ana bileşenini oluşturan VP2 proteinine dayanmaktadır [11]. Kanada'daki IHNV aşısı, hayvanlarda kullanılan ilk DNA aşısıdır. Viral hemorajik septisemi, dünya genelinde balıkları etkileyen ve alabalıklarda da ciddi kayıplara neden olan rhabdovirusun neden olduğu bir hastalıktır. Modifiye edilmiş bir Bakulovirus ile infekte olmuş ve virusun majör antijenik glikoproteinini içeren, böcek hücrelerinde üretilen rekombinant subunit aşısı geliştirilmiş olmakla birlikte, yüksek maliyetli olması nedeniyle ticari kullanım için ABD tarafından onaylanmamıştır [8].

**Kedi, köpek ve atlar için rekombinant aşılar:** Kanarya çiçek virusu, diğer kuş olmayan türlerde kullanılmak üzere bir virus vektörüne aktararak rekombinant aşı olarak denemeler yapılmıştır. Memelilerde serbest olmayan hücrelerde yineleme ve çoğalmayı tamamladığı ayrıca güçlü bir bağışıklık tepkisi uyandırdığı ve nonavian türlerde çoğalamadığı için güvenle kullanılmaktadır. Memelilerde kanarya çiçek virusu vektörleri tarafından uyarılan



hem humoral hem de hücresel bağışıklığın gelişimi ve korunma süresinin iyi olduğu bilinmektedir [22].

Köpek aşılı arasında RECOMBITEK Lyme, RECOMBITEK Canine Distemper, RECOMBITEK Ferret Distemper (ferretlerde kullanım için onaylanmıştır) ve PURVAX Canine Kuduz rekombinant aşılı bulunmaktadır. Ticari olarak bulunan Canarypox vektör temelli kedi aşılı; PUREVAX Feline Rabies, EURIFEL Feline Lösemi ve PUREVAX Feline Lösemi NF'yi içermektedir [11].

West Nile Virus (WNV), 2002'de ortaya çıkan ve tüm atların yaklaşık üçte birinde hastalık oluşturan sivrisinek yoluyla bulaşan viral bir hastalıktır. Merial firmasının RECOMBITEK WNV aşısı, atlar için koruyucu bağışıklık sağlayan; ancak ata çoğalmayan ve tamamen güvenli hale getiren bir aşıdır. İnfluenza'ya karşı Canarypox temelli rekombinant aşı (ProteqFlu, Merial) iki farklı vektör içerir. Bunlardan biri ABD at İnfluenza suşu, immünojenik hemagglutinin geni ve diğeri ise at İnfluenza virusunun Avrupa suşundan hemagglutinin genini taşır. ProteFlu-Te (Merial) aşısı, at İnfluenza Canarypox vektörlerini, tetanoz toksoidi sulandırıcı ajanı içerisinde içermektedir [11].

## Sonuç

Rekombinant DNA teknolojisindeki ilerlemelere bağlı olarak, konak bağışıklık istemi ve hastalık etkenlerinin genetik yapısı hakkındaki güncel çalışmalar sonucunda, şu anda hiçbir kontrol önleminin mevcut olmadığı hastalıklara karşı yeni aşılıların geliştirilmesi, günümüzün güncel koruma kontrol stratejilerinin başında yer almaktadır. Bu bağlamda moleküler biyoloji ve genetik bilim dallarının gelişimine paralel olarak, birçok hastalığa karşı kullanılmakta olan rekombinant aşılı geliştirilmiştir. Bilim adamları geleneksel aşı uygulama yollarını kullanmanın yanı sıra birçok bireyi aynı anda aşılamaı sağlayan ve enjeksiyonun olmadığı yeni sistemler üzerine de çalışmaktadır. Sonuç olarak; rekombinant aşılı üzerine yapılacak olan yeni çalışmaların, mevcut aşılıların uygulanma yollarına alternatif sunmaya, aşılı olmayan fakat ekonomik açıdan önemli hastalıklar için aşılıların geliştirilmesine veya koruma sağlamayan ya da yetersiz kalan mevcut aşılıların güncellenmesine odaklanması gerekmektedir.

## Kaynaklar

1. Babu U, Dalloul RA, Okamura M, Lillehoj HS, Xie H, Raybourne RB, Gaines D, Heckert RA, (2004). *Salmonella enteritidis* clearance and immune responses in chickens following *Salmonella* vaccination and challenge. *Vet Immunol Immunopathol.* 101, 251-257.
2. Balamurugan V, Sen A, Saravanan P, Singh RK, (2006). *Biotechnology in the production of Recombinant Vaccine or Antigen for Animal Health.* *J Anim Vet Adv.* 5(6), 487-495.
3. Barbour EK, Hamadeh SK, Eidt A, (2000). *Infection and immunity in broiler chicken breeders vaccinated with a temperature-sensitive mutant of Mycoplasma gallisepticum and impact on performance of offspring.* *Poult Sci.* 79, 1730-1735.
4. Chalmers WS, Simpson J, Lee SJ, Baxendale W, (1997). *Use of a live chlamydial vaccine to prevent ovine enzootic abortion.* *Vet Rec.* 141, 63-67.
5. Confer AW, Ayalew S, Panciera RJ, Montelongo M, Wray JH, (2006). *Recombinant Mannheimia haemolytica serotype 1 outer membrane protein PlpE enhances commercial M. haemolytica vaccine-induced resistance against serotype 6 challenge.* *Vaccine.* 24, 2248-2255.
6. Darteil R, Bublot M, Laplace E, Bouquet JF, Audonnet JC, Riviere M, (1995). *Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens.* *Virol.* 211, 481-490.
7. Davis BS, Chang GJ, Cropp B, Roehrig JT, Martin DA, Mitchel CJI, Bowen R, Bunning ML, (2001). *West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzymelinked immunosorbent assays.* *J Virol.* 75, 4040-4047.
8. de Kinkelin P, Bearzotti M, Castric J, Nougayrede P, Lecocq-Xhonneux F, Thiry M, (1995). *Eighteen years of vaccination against viral haemorrhagic septicaemia in France.* *Vet Res.* 26, 379-387.
9. Dorneles EMS, Sriranganathan N, Lage AP, (2015). *Recent advances in Brucella abortus vaccines.* *Vet Res.* 46, 76.
10. Ellis RW, (1999). *New technologies for making vaccines.* *Vaccine.* 17, 1596-1604.
11. Jackwood MW, Hickie L, Kapil S, Silva R, (2008). *Vaccine Development Using Recombinant DNA Technology.* *Animal Agriculture's Future through Biotechnology(CAST) Part 7,*413-40-02.
12. Jackwood MW, Saif YM, (1985). *Efficacy of a commercial turkey coryza vaccine (Art-Vax) in turkey poults.* *Avian Dis.* 29, 1130-1139.
13. Jacobs AA, Goovaerts D, Nuijten PJ, Theelen RP, Hartford OM, Foster TJ, (2000). *Investigations towards an efficacious and safe strangles vaccine: submucosal vaccination with a live attenuated Streptococcus equi.* *Vet Rec.* 2147, 563-567.
14. Khan S, Ullah MW, Siddique R, (2016). *Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life.* *Int J Genomic.* 2405954.

15. Lee RW, Strommer J, Hodgins D, Shewen PE, Niu Y, Lo RY, (2001). *Towards development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis using transgenic white clover expressing a Mannheimia haemolytica A1 leukotoxin 50 fusion protein*. Infect Immun. 69, 5786-5793.
16. Liang R, van den Hurk JV, Babiuk LA, van Drunen Littell-van den Hurk S, (2006). *Priming with DNA encoding E2 and boosting with E2 protein formulated with CpG oligodeoxynucleotides induces strong immune responses and protection from bovine viral diarrhoea virus in cattle*. J Gen Virol. 87, 2971-2982.
17. Mackowiak M, Maki J, Motes-Kreimeyer L, Harbin T, Van Kampen K, (1999). *Vaccination of wildlife against rabies: successful use of a vectored vaccine obtained by recombinant technology*. Adv Vet Med. 41, 571-583.
18. Minke JM, Audonnet JC, Fischer L, (2004). *Equine viral vaccines: the past, present and future*. Vet Res. 35, 425-443.
19. Moriyon I, Grillo MJ, Monreal D, Gonzalez D, Marin C, Lopez-Goni I, Mainar-Jaime RC, Moreno E, Blasco JM, (2004). *Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status*. Vet Res. 35, 1-38.
20. Morrow CJ, Markham JF, Whithear KG, (1998). *Production of temperature-sensitive clones of Mycoplasma synoviae for evaluation as live vaccines*. Avian Dis. 42, 667-670.
21. Nobiron I, Thompson I, Brownlie J, Collins ME, (2003). *DNA vaccination against bovine viral diarrhoea virus induces humoral and cellular responses in cattle with evidence for protection against viral challenge*. Vaccine. 21, 2082-2092.
22. Paoletti E, (1996). *Applications of pox virus vectors to vaccination: An update*. Proc Natl Acad Sci USA. 93, 11349-11353.
23. Pardo MC, Mackowiak M, (1999). *Efficacy of a new canine-origin, modified-live virus vaccine against canine coronavirus*. Canine Pract. 24, 6-8.
24. Park MS, Steel J, Garcia-Sastre A, Swayne D, Palese P, (2006). *Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: avian influenza and Newcastle disease*. Proc Natl Acad Sci USA. 103, 8203-8208.
25. Pastoret PP, Brochier B, Languet B, Thomas I, Paquot A, Bauduin B, Kieny MP, Lecocq JP, De Bruyn J, Costy F, (1988). *First field trial of fox vaccination against rabies with a vaccinia-rabies recombinant virus*. Vet Rec. 123, 481-483.
26. Piller KJ, Clemente TE, Jun SM, Petty CC, Sato S, Pascual DW, Bost KL, (2005). *Expression and immunogenicity of an Escherichia coli K99 fimbriae subunit antigen in soybean*. Planta. 222, 6-18.
27. Serge C, Gael K, Scott EL, (2000). *Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: efficacy of various routes of immunisation*. Fish Shellfish Immunol. 10, 711-723.
28. Van Oirschot JT, Kaashoek MJ, Rijsewijk FA, (1996). *Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines*. Vet Microbiol. 53, 43-54.

# Yenidoğan Buzağı İshallerinin Önemli Viral Etkenlerinden Caliciviruslar

İlke Karayel Hacıoğlu, Feray Alkan

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Viroloji Anabilim Dalı

Geliş Tarihi / Received: 26.10.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 15.11.2018

**Özet:** Sığır yetiştiriciliğinin önemli hastalıklarından biri olan yenidoğan buzağı ishalleri virus, bakteri, protozoon gibi birçok enfeksiyöz ajanın yanı sıra çevresel koşullar, bakım ve beslenme gibi etkenlerden de kaynaklanabilmektedir. Viral enfeksiyöz etkenlerin başında sıklıkla Bovine Rotavirus A, *Cryptosporidium parvum*, Bovine Coronavirus ve *E. coli* gibi etkenler tespit edilmektedir. Son yıllarda ise hem insanlarda hem de hayvanlarda önemli enfeksiyonlara neden olan Caliciviruslar yenidoğan buzağı ishallerinden sorumlu ajanlar olarak kabul edilmektedir. Caliciviruslardan Norovirus genogrup III ve Nebovirus “Bovine Enteric Caliciviruslar (BEC)” olarak tanımlanmaktadır. Bu etkenler günümüzde buzağı ishallerinin rutin teşhisinde yer almamasına karşın yapılan çalışmalar BEC’lerin tek başına ya da diğer enteropatojenler ile birlikte buzağı ishal olgularının gelişmesinde önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır. Bu derleme ile Bovine Enteric Calicivirusların yapısal özellikleri ve bu virusların neden olduğu enfeksiyonlara ilişkin detaylı bilgilerin sunulması amaçlanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Bovine Norovirus, Buzağı ishalleri, Nebovirus

## Caliciviruses as Important Viral Agents of Newborn Calf Diarrhea

**Summary:** Newborn calf diarrhea, which is one of the important diseases of cattle breeding, could be caused by many infectious agents such as virus, bacteria, protozoon as well as environmental conditions, care, and nutrition. Bovine Rotavirus A, *Cryptosporidium parvum*, Bovine Coronavirus and *E. coli* are the most commonly detected viral infectious agents. Recently, Caliciviruses, which cause important infections in both humans and animals, are accepted as agents responsible for newborn calf diarrhea. Norovirus genogroup III and Nebovirus are identified as “Bovine Enteric Caliciviruses (BEC)”. Although these enteropathogens are not included in the routine diagnosis of calf diarrhea, studies showed that BECs play an important role in calf diarrhea alone or along with the other enteropathogens. In this review, we aimed to present detailed information about structural features of Bovine Enteric Caliciviruses and their infections.

**Keywords:** Bovine Norovirus, Calf diarrhea, Nebovirus

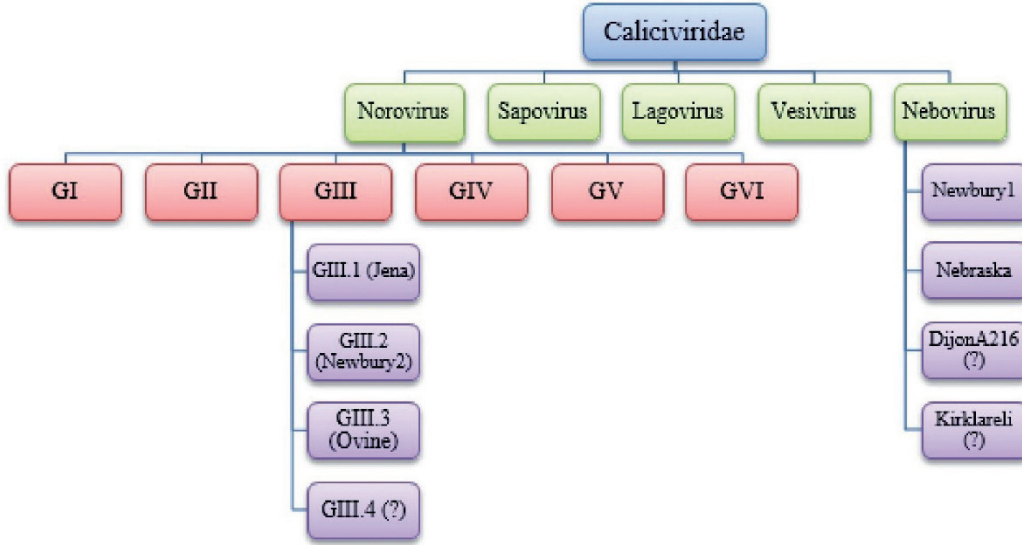
## Giriş

Yenidoğan buzağı ishalleri tüm dünyada gözlenen sığır yetiştiriciliğinin en önemli hastalıklardan birisidir. Doğrudan ya da dolaylı olarak önemli ekonomik kayıplara neden olan bu hastalık virus, bakteri, protozoon gibi birçok enfeksiyöz ajandan kaynaklanabildiği gibi, çevresel koşullar, bakım ve beslenme de bu hastalığa neden olabilmektedir [6]. Enfeksiyöz ajanlar tek başlarına bu hastalığa sebep olabildikleri gibi birden fazla enfeksiyöz ajanın tespit edilebildiği miks enfeksiyonlara da sıklıkla rastlanılmaktadır [9]. Her bir patojen ile oluşan enfeksiyonun prevalansı ve hastalığın insidensi bölgeden bölgeye, çiftliklerin yönetim sistemine ve sürü büyüklüğüne göre farklılık göstermektedir [5].

Yenidoğan buzağı ishallerinde enfeksiyöz etken olarak çoğunlukla Bovine Rotavirus A (BRVA), *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*), Bovine

Coronavirus (BCoV) ve *E. coli* tespit edilmektedir. Ancak günümüzde halen birçok klinik vakanın etiyojisi tespit edilememektedir [35]. Son yıllarda ise “Bovine Enteric Caliciviruslar” yenidoğan buzağı ishallerinden sorumlu ajanlar olarak kabul edilmektedir [5].

Uluslararası Virus Taksonomisi Komitesi’nin 2012 yılında yayımlanan dokuzuncu raporuna (9th Report of International Committee on Taxonomy of Viruses) göre, *Caliciviridae* ailesi, “Vesivirus, Lagovirus, Norovirus, Sapovirus ve Nebovirus” genlerinden oluşmaktadır (Şekil 1) [31]. Bu cinslerden yalnızca Norovirus (genogrup III) ve Nebovirus “Bovine Enteric Caliciviruslar (BEC)” olarak tanımlanmaktadır [15, 39]. Bu derlemede Bovine Enteric Calicivirusların yapısal özellikleri ve BEC nedenli enfeksiyonlara ilişkin detaylı bilgilerin sunulması amaçlanmıştır.



Şekil 1. Caliciviridae ailesi

### Tarihçe

Noroviruslar ilk olarak 1968 yılında, Norwalk, Ohio’da insanlardaki bir gastroenterit salgınında keşfedilmiştir. Bu salgında etiyolojik ajan olarak saptanan norovirus, “Norwalk virus” olarak adlandırılmış ve insan norovirusların prototip suşu olarak tanımlanmıştır [27]. İngiltere’de 1978 yılında ishalleri bir buzağıda saptanan [54] ve Oliver ve ark. [36] tarafından moleküler karakterizasyonu yapılan “Newbury Agent 2 (Newbury2)” suşu ile 1980 yılında Almanya’da izole edilen [20] ve 1999 yılında moleküler karakterizasyonu yapılan [32] “Jena” suşu, günümüzde 2 farklı genotip olarak sınıflandırılan sığır norovirusların (BoNoV) her bir genotipi için “prototip” viruslardır. Bu iki virus Norovirus genusunda Genogrup III içerisinde yer almaktadır [32, 39].

Tanımlanan diğer iki BEC ise “Newbury Agent 1 (Newbury1)” ve “Nebraska” suşlarıdır ve bu suşlar Neboviruslar içerisinde filogenetik olarak iki ayrı “clade” oluşturmaktadır [37, 47]. Newbury1, Newbury2 ile birlikte 1978 yılında İngiltere’de ishalleri bir buzağıdan saptanmış [54] ve 1984 yılında karakterize edilmiştir [3,10]. Amerika’da 1980 yılında tespit edilen Nebraska suşu ise Smiley ve ark. [47] tarafından Nebovirus olarak tanımlanmıştır.

### Calicivirusların Yapısı ve Sınıflandırma

Caliciviruslar isimlerini elektron mikroskop altındaki karakteristik “fincan-şekilli” görüntülerinden

alırlar [7]. Caliciviridae ailesindeki viruslar, ikozahedral simetriye sahip zarfsız viruslardır [18]. Genom yaklaşık 7.4-8.3 kb büyüklüğünde, pozitif polariteli, lineer tek iplikçilikli ssRNA’dan oluşur ve en az iki ya da üç ORF içerecek şekilde organize olmuştur [7]. Lagoviruslar, Sapoviruslar ve Neboviruslar iki ORF içerir ve ORF1 yapısal olmayan proteinleri ve temel kapsit proteinini (VP1) kodlarken; ORF2 minör yapısal proteini (VP2) kodlar. Vesiviruslar ve Noroviruslar ise üç ORF içermektedir ve VP1 ayrı bir ORF olan ORF2 tarafından kodlanırken, VP2 ORF3 tarafından kodlanır [8, 18].

Noroviruslar (NoV) VP1 kapsit proteininin detaylı filogenetik analizlerine göre 6 “genogrup”tan (GI-GVI) oluşmaktadır [56]. GI içerisinde 9, GII’de 22, GIII’te 3, GIV, GV ve GVI’da 2’şer genotip bulunur [52]. Yakın zamanda Hong Kong’da bir köpekte saptanan NoV ise GVII olarak önerilmiştir [52]. BoNoV, kronolojik olarak bakıldığında bu genogruplar içerisinde ilk keşfedilen genogrup olan GIII’te yer almaktadır [32, 39].

NoV GIII içerisinde birbirlerinden antijenik olarak farklı üç genotip (GIII.1, GIII.2 ve GIII.3) bulunmaktadır [53]. GIII.1’in prototip suşu Jena, GIII.2’nin prototip suşu ise Newbury2’dir [36]. Yeni Zelanda’da koyunlardan ve domuzlardan alınan dışkı örneklerinde tespit edilen, GIII ile yakın ilişkili norovirus (Ov/NZL/2007/GIII.3/Norsewood30) GIII.3 olarak tanımlanmıştır [53]. Ayrıca Ar-

jantin'de yapılan bir çalışmada saptanan bir suşun (Bo/AR/2012/B4881) ise muhtemel GIII.4 temsil ettiği bildirilmiştir [17].

Bugüne kadar sadece buzağılarda tespit edilen Neboviruslar, aslında 1980'lerden beri bilinmelerine karşın, Calicivirus ailesinde bir genus olarak nitelendirilmeleri oldukça yenidir [48]. Neboviruslarda iki polimeraz tipi tanımlanmıştır ve saptanan saha suşları, prototip viruslar (Bo/Newbury1/76/UK ve Bo/Nebraska/80/US) dikkate alınarak Newbury1-benzeri ve Nebraska-benzeri olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca Neboviruslar arasındaki genetik farklılıklar nedeniyle yeni genotiplerin varlığına dair bildirimler de bulunmaktadır. Bu iki prototip virus dışında Kaplon ve ark. [29] muhtemel üçüncü bir genotipi temsil eden suşu (Bo/DijonA216/06/FR) bildirmişlerdir. Neboviruslara ilgili tespitler ve moleküler karakterizasyon çalışmaları BoNoV'lara göre çok daha sınırlıdır. Bu nedenle gelecekte yapılacak çalışmalar Nebovirusların sınıflandırılmasına ilgili yeni veri ve yaklaşımları da ortaya koyacaktır. Bu bağlamda 3. bir genotip olarak önerilen Bo/DijonA216/06/FR suşu, ülkemizde Alkan ve ark. [1] tarafından şiddetli ishalleri buzağılardan saptanan bir Calicivirus olan ve tam genom nükleotid benzerliği bakımında en yakın olarak Neboviruslara benzeyen (%48) "Kırklareli virus" suşu ve gelecekte saptanması olası birçok farklı suşun yer aldığı yeni sınıflandırma kriterlerinin oluşturulması da mümkün olabilecektir.

## Epidemiyoloji

Noroviruslarla ilgili epidemiyolojik çalışmalar, örneklenen popülasyon, ülke, örnekleme yapılıdığı mevsim, vb. kriterlerin yanı sıra BoNoV genotiplerinin (GIII.1 ve GIII.2) varlığı/yaygınlığına yönelik verileri de ortaya koymuştur. Bu epidemiyolojik verilere göre; BoNoV GIII.2'nin Avrupa ve Amerika'da endemik olduğu [12, 33, 49] ve genel olarak bakıldığında BoNoV GIII.2'nin GIII.1'den çok daha yaygın olduğu görülmektedir [28, 35, 42, 48, 51]. Günümüzde, Caliciviruslar içerisinde yeni tanımlanan bir genus olan Nebovirusların yaygınlığına dair çok sayıda bildirim bulunmamaktadır. Neboviruslar çoğunlukla Nebraska-benzeri genotip içinde sınıflandırılmış olup, Newbury1-benzeri genotip virus İngiltere dışında sadece Brezilya'da tespit edilmiştir [4].

Türkiye'de BEC enfeksiyonlarına ilgili bilgiler ise çok sınırlı düzeydedir. BoNoV ile ilgili olarak yapılan araştırmalarda [19, 50, 55] ishalleri buzağılarda GIII.2 genotipli BoNoV varlığı %1.7 - 8.5 oranlarında bildirilmiş olmasına karşın; yakın zamanda Karayel Hacıoğlu [30] tarafından yapılan çalışmada hem GIII.1 hem de GIII.2 varlığı belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışma verileri, Türkiye'de daha önceki bildirimlere oranla BoNoV enfeksiyonlarının çok daha yaygın (% 33.5) olduğunu da ortaya koymuştur.

Ülkemizde yenidoğan buzağılarda nebovirusların sorgulandığı iki çalışma da saptanan nebovirusların tümü Nebraska benzeri olarak tanımlanmıştır [30, 50].

Buzağı ishalleri multifaktoriyel bir hastalıktır. Bu faktörlerin etkili olma durumları, doğum öncesi annelerin bakımı, buzağılarda immünite durumları ve çevresel faktörler ile doğrudan ilişkilidir. Hastalığa neden olan patojenlerin bilinmesi, etkilenen çiftliklerin durumlarının belirlenmesi ve daha sonraki müdahalelerin geliştirilmesi için önemlidir [5, 9]. Yapılan çalışmalarda farklı ülkelerde sığırlarda değişen oranlarda BEC tespit edilmesine karşın, bu viruslar buzağı ishallerinin rutin teşhisinde halen birçok ülkede yer almamakta ve bu virusların sığır yetiştiriciliği üzerindeki etkileri tam olarak bilinmemektedir. Ancak her geçen gün elde edilen yeni epidemiyolojik veriler, BEC'lerin rutin tanı kapsamına alınması ihtiyacını ortaya koymaktadır [33, 49].

İshal olgularında BEC'lerin sorgulandığı çalışmalarda farklı yaş aralıklarına ilişkin örneklemin olması, işletmenin yönetim şekli, biyolojik varyasyon, vb. nedenlerle, enfeksiyona duyarlı yaş gruplarına ilgili olarak her ne kadar önemli farklılıklar olmasa da çeşitli bilimsel değerlendirmelerde bulunulmuştur. Bu değerlendirmelerin birçoğu genel olarak doğum sonrasındaki ilk birkaç hafta için duyarlılığa işaret eden veriler olmakla birlikte, yaş faktörünün BoNoV için belirgin bir risk faktörü olmamasına karşın, pozitif örneklerin çoğunlukla genç hayvanlardan tespit edilmesi, yaş arttıkça riskin azaldığını ortaya koymaktadır [30, 35].

Enfeksiyöz etkenlere bağlı olarak yenidoğan buzağı ishallerinin görülme sıklığının bakım ve besleme koşullarının yeterince sağlanamaması, enfeksiyonlara direncin azalması, vb. nedenlerle özellikle soğuk mevsim koşullardan etkilenebileceği

bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda da, mevsimler itibarıyla bazı oransal farklılıklar olmakla birlikte [23, 30, 35, 43] BEC'lerin tüm yıl boyunca tespit edilebileceği, özellikle entansif işletmeler için buzağıların yıl boyunca kapalı ortamda bulunmalarının ve bu ortam koşullarının etkili olabileceği bildirilmiştir [51].

### Bulaşma

Enteric Calicivirusların temel bulaş yolu fekal-oral bulaşmadır [13, 56]. Calicivirusların doğada oldukça stabil ve belli ölçüde inaktivasyona dirençli olmaları, özellikle GIII.2 genotipli virusun dışkıda uzun süre saçılıyor olması [26], BoNoV'un yaygınlığının önemli göstergesi niteliğinde olan "yüksek seroprevalans" oranlarını açıklamaktadır [40, 49].

### Klinik Bulgular ve Patogenez

BEC ile yapılan alışmalar Murine NoV dışında başka bir norovirusun hücre kültüründe üretilememesi sebebiyle sınırlıdır [16]. BoNoV, diğer enteropatojenlerin de katıldığı mik s enfeksiyonların yanı sıra tek başına da buzağılarda ishale neden olmaktadır [54]. Yapılan deneysel alışmalar BoNoV GIII.1 ve GIII.2 prototip suşları arasında antijenik ve serolojik açıdan olduğu gibi enteropatojenik karakterleri açısından da farklılıkların bulunduğunu ortaya koymuştur [26, 41]. BoNoV GIII.2 ile enfekte buzağılarda, GIII.1' e oranla daha uzun süre devam eden bir ishale olduğu gözlenmiş [26]; buna karşın GIII.1 ile oluşan enfeksiyonların GIII.2 ile oluşan enfeksiyonlara oranla daha genç yaştaki hayvanları etkileyebileceği ve kısa süreli yoğun ishale neden olduğu bildirilmiştir [3, 21, 41]. BoNoV prototip suşları olan "Jena" ya da "Newbury2" suşları ile enfekte olan buzağılardaki histopatolojik bulgular, villuslarda atrofi ve ince bağırsağın proksimalinde kriptlerde hiperplazi ile karakterizedir [3, 20]. Ancak, GIII.2 suşu ile yapılan çalışmada devam eden ishal ve uzun bir virus saçılımı gözlenmesine rağmen, Jena suşunun aksine bağırsak epitellerinde nekroz, villuslarda atrofi ve yangı lezyonları gibi belirgin akut bağırsak lezyonlarına rastlanmamıştır [26]. Yapılan bir deneysel çalışmada [41], GIII.1 ile inokulasyondan sonra, bu antijen yönünden pozitif epitel hücrelerine sahip uzun villusların saptanması, GIII.1 suşunun tüm enteroabsorbtif hücreleri enfekte ettiğini, yani Rotaviruslarda olduğu gibi sadece villusların uç kısmındaki hücrelere ya da Bovine

Toroviruslardaki gibi villusların alt kısmına karşı özel bir tropizim göstermediğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte BoNoV ile yapılan çalışmalarda lezyonların yoğun olduğu kısımlar sıklıkla ince bağırsakların orta ve alt kısımları olarak belirlenmiştir.

Nebovirus enfeksiyonlarında ise genel olarak tüm buzağılarda, anoreksi, ileri derecede ishal, villuslarda atrofi, enzim aktivitesinde belirgin bir azalma ve ksiloz malabsorpsiyonu gözlenmektedir [3, 21, 47]. Nebovirus enfeksiyonlarında yoğun olarak ince bağırsağın üst kısımlarında lezyonların varlığı bildirilmiştir [21, 41]. Neboviruslara ilişkin alışmalar, Newbury1 ile gelişen enfeksiyonun BoNoV Newbury2'den daha ağır klinik semptomlara neden olduğunu [3], buzağıların Nebraska virus ile enfeksiyonunun 3-4 günlük bir inkübasyondan sonra uzun süren bir ishale sonuçlandığını göstermektedir [41]. BEC'lerin sistemik enfeksiyona neden olduğuna dair bilindiği kadarıyla bir bilgi bulunmamaktadır.

Norovirusların klinik olarak sağlıklı olan buzağılarda da tespit edildiğine dair bildirimler [25, 34, 45] bulunmasına rağmen, Nebovirusların buzağılar için patojenik olduğu bildirilmiştir [5, 21].

Buzağı ishallerinde mik s enfeksiyonların varlığı sık rastlanan bir durumdur. Her bir patojenin buzağı ishallerinde oynadığı rol ve neden olduğu klinik seyir farklılık göstermektedir. Genellikle RVA ve *C. parvum*, buzağı ishallerinden sorumlu etkenlerin başında gelmektedir [6]. İshalli buzağılarda BEC'lerin kayda değer oranda tespit edilmesi, çiftliklerde enterik hastalıklarla mücadele açısından bu viruslara ilişkin çalışmaların arttırılmasını gerektirmektedir. BEC'lerin yapılan deneysel çalışmalarda her ne kadar ishale neden olduğu kanıtlanmış [21, 26, 39, 41, 47] olsa da bu virusların patojenitesi ve hastalık oluşturma mekanizmaları hakkında sınırlı bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle sahada klinik tabloların gelişmesinde diğer enteropatojenlerin de rol almış olabileceği düşünölmektedir. Nitekim BEC'ler ile diğer enteropatojenlerin mik s enfeksiyonlarına ilişkin tespitler oldukça fazladır [6, 14, 42, 33].

### İmmunoloji

Sığırlarda plasentanın yavruya maternal antikor geçişine izin vermemesi nedeniyle, yenidoğan buzağılar patojenlere karşı savunmasız bir şekilde doç-

maktadırlar. Bu nedenle buzağuların enterik etkenlere karşı dirençli olması, yüksek kalitede antikor içeren kolostrumun zamanında ve yeterli miktarda alınmasıyla yakından ilişkilidir. Genelde çiftlikler, birçok inekten alınan kolostrumu karıştırarak buzağulara vermesine rağmen, ideal olan her buzağının kendi annesinden kolostrumu almasıdır [5].

BoNoV'un her iki genotipinin antijenik farklılığı nedeniyle heterolog antijene karşı çapraz reaksiyonun çok az ya da tespit edilemeyen düzeyde olduğu [38], Norovirus ve Nebovirus prototip virusları (Newbury1 ve Newbury2) ile yapılan çalışmalarda çapraz koruma olmadığı bildirilmiştir [3, 11]. Hayvan türlerine göre immun mekanizma değişmesine karşın insanlarda norovirusa karşı oluşan immun yanıtın benzerinin hayvanlarda da olduğu varsayılmaktadır [46]. NoV ile enfekte edilen insanlarda homolog suşa karşı uzun süreli bir immun yanıtın oluşmadığı, oluşan kısa süreli immun yanıtın da heterolog NoV suşlarına karşı yeterli koruma sağlamadığı bildirilmiştir [24]. Buzağularda deneysel enfeksiyondan sonra oluşan homolog antikor yanıtının inokulasyonu izleyen birkaç hafta içinde maksimum titreye ulaştığı gözlenmiştir [21, 22]. Ancak, gelişen bu immun yanıtın süresiyle ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

BEC için canlı attenüe aşılardan gibi kontrol stratejilerinin geliştirilmesindeki en önemli problem Murine NoV dışındaki NoV'ların hücre kültürlerinde üretilmemesidir. Bu nedenle günümüzde, Virus Benzeri Partiküller (VLP), serolojik testleri geliştirmek ve NoV antijenitesini belirlemek amacıyla kullanılmaktadır [12, 22, 33]. Aynı zamanda VLP'ler NoV aşısı geliştirme çalışmaları için de birer alternatif oluşturmaktadır. BEC enfeksiyonu için, VLP'ler kullanılarak aşısı geliştirilmesi yönünde görüş ve bilimsel çalışmalar [22] olmakla birlikte, halen ticari bir aşısı bulunmamaktadır.

## Tanı

BoNoV ve Nebovirus tanısı için uygun metotların geliştirilmesini zorlaştıran sebeplerin başında, söz konusu etkenlerin hücre kültürlerinde üretilmemesi gelmektedir [16]. Günümüzde, kompleks 3D-hücre kültürü sistemlerinin GI ve GII insan NoV üretilmesinde kullanılmaya başlanmasının sonraki yıllarda BEC tespiti açısından yeni bir bakış açısı sunacağı düşünülmektedir [46].

NoV ve Nebovirusların tespitinde elektron mikroskop (EM) halen en geçerli temel araçlardan birisidir. Ancak, bu yöntemin yüksek miktarda virus yoğunluğuna ihtiyaç duyması (gram başına  $>10^6$  virus partikülü) duyarlılığı azaltan önemli bir faktördür [2]. Ayrıca, bu konuda oldukça tecrübeli araştırmacılara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yöntemin antikor antijen ilişkisine dayanan immunoelektron mikroskopi (IEM) ya da solid faz IEM gibi bir kaç çeşidi de bulunmaktadır [5, 46].

Son yıllarda immunoassay yöntemleri ve RT-PCR hem tanı hem de saptanan virusların moleküler karakterizasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır [13, 46]. Norovirusların kapsit proteininin baculovirus sistemlerinde ekspres edilmesi ile yüksek miktarlarda VLP elde edilmekte ve bunlar immunoassaylarda antijen olarak kullanılmaktadır [33]. ELISA, bu testler içinde en yaygın olarak kullanılan testtir. Bu testler EM ye kıyasla oldukça duyarlıdır. Ancak, çabuk sonuç vermesi ve çok sayıda örneğin kolay işlenmesine olanak sağlaması nedeniyle oldukça kullanışlı olan ELISA sistemlerinin diagnostik laboratuvarlarda kullanımları, düşük spesifikite, bu virusların antijenik farklılıkları nedeniyle duyarlılıkta farklılıkların oluşması gibi faktörlerden etkilenmeleri olasıdır [13]. BoNoV ve Nebovirus çalışmalarında kullanılan antikor ve antijen ELISA geliştirildiğine dair bildirimler [12, 33, 40, 49] bulunmakla birlikte, günümüzde BoNoV ve Nebovirus için ticari bir kit bulunmamaktadır.

Caliciviruslara yönelik ilk moleküler çalışmalar insan NoV'a ilişkin olup, birçok epidemiyolojik çalışmanın yapılmasına kolaylık sağlamıştır. Genetik farklılıklar tüm NoV'ların tek bir primer çifti kullanılarak tespit edilmesini imkânsız kılmaktadır. Bu nedenle, bir hayvan türünde NoV varlığını tespit etmek için buna yönelik spesifik primerlerin kullanılması gerekmektedir [46]. Nitekim NoV ve Nebovirus arasında oldukça korunaklı bir bölge olan RdRp gen bölgesine yönelik tasarlanan primerler kullanılarak uygulanan RT-PCR metodu BEC'leri tespit etmek için son yıllarda yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır [38, 42, 43, 48]. Ayrıca RT-PCR'a oranla daha duyarlı ve hızlı sonuç veren qRT-PCR kullanımının bildirimleri de [6, 25, 44, 55] son yıllarda sıklıkla yapılmaktadır.

## Korunma

Buzağı ishalleri multifaktoriyel bir hastalıktır. Hastalığa neden olan patojenlerin bilinmesi, etkilenen çiftliklerin durumlarının belirlenmesi ve daha sonraki müdahalelerin geliştirilmesi açısından önemlidir. Günümüzde, hastalıkların kontrolü ve önlenmesi, hem hayvan refahı hem de üretici açısından verimin artırılmasını içermektedir [5]. Hastalıklardan korunmada hijyen kurallarının sağlanması, aşı uygulaması, vb. yöntemlere başvurulmaktadır. Günümüzde yenidoğan buzağılarda ishale neden olan BRVA, BCoV, *C. perfringens* ve *E. coli* vb. patojenleri içeren aşilar bulunmaktadır. Ancak BEC içeren bir aşı bulunmamaktadır. Oysa BEC enfeksiyonlarının buzağı ishalleriyle ilgili oldukları kanıtlanmış olup, bu hastalıkta ayırıcı tanıda göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Ayrıca, buzağıların ishale karşı etkin biçimde korunması için, bu virusların aşılarla eklenmesi konusunda birçok araştırmacı hemfikiridir [13, 29]. Bu noktada yapılan bilimsel çalışmalar sonrası geliştirilmesi olası VLP aşıları ya da farklı biyoteknolojik aşilar, BEC enfeksiyonlarından korunmada önemli katkı sağlayacaktır.

## Sonuç

Ülkemizde de BEC'lerin tek başına ya da diğer enteropatojenler ile birlikte buzağı ishal olgularının gelişmesinde önemli bir yer aldığı değerlendirildiğinde, farklı populasyonların örneklendiği çalışmalar ile prevalans, saha viruslarının moleküler karakterizasyonu, ekonomik kayıpların hesaplanmasına yönelik analizlerin yapıldığı çalışmaların yanı sıra halen seroprevalans çalışmaları için geliştirilmiş ticari kitlerin bulunmadığı dikkate alınarak, VLP kullanılarak hazırlanacak ELISA sistemlerinin geliştirilmesi ve aşı hazırlama çalışmalarının yapılması yönünde bilimsel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## Kaynaklar

- Alkan F, Karayel İ, Catella C, Bodnar L, Lanave G, Bányai K, Di Martino B, Decaro N, Buonavoglia C, Martella V, (2015). *Identification of a Bovine Enteric Calicivirus, Kırklareli Virus, Distantly Related to Neboviruses, in Calves with Enteritis in Turkey*. J Clin Microbiol. 53, 3614–3617.
- Atmar RL, Estes MK, (2001). *Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses*. Clin Microbiol Rev. 14, 15–37.
- Bridger JC, Hall GA, Brown JF, (1984). *Characterization of a calici-like virus (Newbury agent) found in association with astrovirus in bovine diarrhea*. Infect Immun. 43, 133–138.
- Candido M, Alencar ALF, Almeida-Queiroz SR, Buzinaro MG, Munin FS, Godoy SHS, Livonesi MC, Fernandes AM, Sousa RLM, (2016). *First detection and molecular characterization of Nebovirus in Brazil*. Epidemiol Infect 144, 1876–1878.
- Cho YI, Yoon KJ, (2014). *An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention*. J Vet Sci. 15, 1–17.
- Cho YI, Han JI, Wang C, Cooper V, Schwartz K, Engelken T, Yoon KJ, (2013). *Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea*. Vet Microbiol. 166, 375–385.
- Clarke IN, Lambden PR, (1997). *The molecular biology of caliciviruses*. J Gen Virol 78, 291–301.
- Clarke IN, Lambden PR, (2000). *Organization and Expression of Calicivirus Genes*. J Infect Dis. 181, 309–316.
- Crouch CF, Oliver SP, Francis MJ, (2001). *Serological, colostral and milk responses of cows vaccinated with a single dose of a combined vaccine against rotavirus, coronavirus and Escherichia coli F5 (K99)*. Vet Rec. 149, 105–108.
- Dastjerdi AM, Green J, Gallimore CI, Brown DW, Bridger JC, (1999). *The bovine Newbury agent-2 is genetically more closely related to human SRSVs than to animal caliciviruses*. Virology. 254, 1–5.
- Dastjerdi AM, Snodgrass DR, Bridger JC, (2000). *Characterisation of the bovine enteric calici-like virus, Newbury agent 1*. FEMS Microbiol Lett. 192, 125–131.
- Deng Y, Batten CA, Liu BL, Lambden PR, Elschner M, Günther H, Otto P, Schnürch P, Eichhorn W, Herbst W, Clarke IN, (2003). *Studies of epidemiology and seroprevalence of bovine noroviruses in Germany*. J Clin Microbiol. 41, 2300–2305.
- Di Felice E, Mauroy A, Pozzo FD, Thiry D, Ceci C, Di Martino B, Marsilio F, Thiry E, (2016). *Bovine noroviruses: A missing component of calf diarrhoea diagnosis*. Vet J. 207, 53–62.
- Di Bartolo I, Ponterio E, Monini M, Ruggeri FM, (2011). *A pilot survey of bovine norovirus in northern Italy*. Vet Rec. 169, 73.
- Di Martino B, Di Profio F, Martella V, Ceci C, Marsilio F, (2011). *Evidence for recombination in neboviruses*. Vet Microbiol. 153, 367–372.
- Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MPG, Estes MK, (2004). *Laboratory efforts to cultivate noroviruses*. J Gen Virol. 85, 79–87.
- Ferragut F, Vega CG, Mauroy A, Conceição-Neto N, Zeller M, Heylen E, Uriarte EL, Bilbao G, Bok M, Matthijssens J, Thiry E, Badaracco A, Parreño V, (2016). *Molecular detection of bovine Noroviruses in Argentinean dairy calves: Circulation of a tentative new genotype*. Infect Genet Evol. 40, 144–150.



18. Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Studdert MJ, Thiel HJ, (2000). *Taxonomy of the caliciviruses*. J Infect Dis. 181, 322–330.
19. Gülaçtı I, Sözdutmaz I, Işıdan H, (2016). *Molecular Characterization of the Bovine Noroviruses from Diarrhoeic Calves in Turkey 2*. Turk J Vet Anim Sci 40: 1–6.
20. Günther H, Otto P, (1987). *Diarrhea in young calves. 7. "Zackenvirus" (Jena agent 117/80)--a new diarrhea pathogen in calves*. Arch Exp Veterinarmed. 41, 934.
21. Hall GA, Bridger JC, Brooker BE, Parsons KR, Ormerod E, (1984). *Lesions of gnotobiotic calves experimentally infected with a calicivirus-like (Newbury) agent*. Vet Pathol. 21, 208–215.
22. Han MG, Wang Q, Smiley JR, Change KO, Saif LJ, (2005). *Self-assembly of the recombinant capsid protein of a bovine norovirus (BoNV) into virus-like particles and evaluation of cross-reactivity of BoNV with human noroviruses*. J Clin Microbiol. 43, 778–785.
23. Hassine-Zaafraane M, Kaplon J, Sdiri-Loulizi K, Aouni Z, Pothier P, Aouni M, Ambert-Balay K, (2012). *Molecular prevalence of bovine noroviruses and neboviruses detected in central-eastern Tunisia*. Arch Virol. 157, 1599–1604.
24. Johnson PC, Mathewson JJ, DuPont HL, Greenberg HB, (1990). *Multiple-challenge study of host susceptibility to norwalk gastroenteritis in US adults*. J Infect Dis. 161, 18–21.
25. Jor E, Myrnel M, Jonassen CM, (2010). *SYBR Green based real-time RT-PCR assay for detection and genotype prediction of bovine noroviruses and assessment of clinical significance in Norway*. J Virol Methods. 169, 1–7.
26. Jung K, Scheuer KA, Zhang Z, Wang Q, Saif LJ, (2014). *Pathogenesis of GIII.2 bovine norovirus, CV186-OH/00/US strain in gnotobiotic calves*. Vet Microbiol. 168, 202–207.
27. Kapikian AZ, (2000). *The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective*. J Infect Dis. 181, 295–302.
28. Kaplon J, Freymy C, Bernard S, Rehby L, Aho S, Pothier P, Ambert-Balay K, (2013). *Impact of rotavirus vaccine on rotavirus genotypes and caliciviruses circulating in French cattle*. Vaccine. 31, 2433–2440.
29. Kaplon J, Guenau E, Asdrubal P, Pothier P, Ambert-Balay K, (2011). *Possible novel Nebovirus genotype in cattle, France*. Emerg Infect Dis. 17, 1120–1123.
30. Karayel Hacıoğlu, (2016). *Buzağılarda Enterik Calicivirus (BEC) Enfeksiyonlarının Moleküler Epidemiyolojisi*. Doktora Tezi, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
31. Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M, (2013). *Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping*. Arch Virol. 158, 2059–2068.
32. Liu BL, Lambden PR, Günther H, Otto P, Elschner M, Clarke IN, (1999). *Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses*. J Virol. 73, 819–825.
33. Mauroy A, Scipioni A, Mathijs E, Saegerman C, Mast J, Bridger JC, Ziant D, Thys C, Thiry E, (2009). *Epidemiological study of bovine norovirus infection by RT-PCR and a VLP-based antibody ELISA*. Vet Microbiol. 137, 243–251.
34. Mijovski JZ, Poljšak-Prijatelj M, Steyer A, Barlič-Maganja D, Koren S, (2010). *Detection and molecular characterisation of noroviruses and sapoviruses in asymptomatic swine and cattle in Slovenian farms*. Infect Genet Evol. 10, 413–420.
35. Milnes AS, Binns SH., Oliver SL., Bridger JC, (2007). *Retrospective study of noroviruses in samples of diarrhoea from cattle, using the Veterinary Laboratories Agency's Farmfile database*. Vet Rec. 160, 326–330.
36. Oliver SL, Asobayire E, Charpilienne A, Cohen J, Bridger JC, (2007a). *Complete genomic characterization and antigenic relatedness of genogroup III, genotype 2 bovine noroviruses*. Arch Virol. 152, 257–272.
37. Oliver SL, Asobayire E, Dastjerdi AM, Bridger JC, (2006a). *Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae*. Virology 350, 240–250.
38. Oliver SL, Batten CA, Deng Y, Elschner M, Otto P, Charpilienne A, Clarke IN, Bridger JC, Lambden PR, (2006b). *Genotype 1 and Genotype 2 Bovine Noroviruses Are Antigenically Distinct but Share a Cross-Reactive Epitope with Human Noroviruses*. J Clin Microbiol. 44, 992–998.
39. Oliver SL, Dastjerdi AM, Wong S, El-Attar L, Gallimore C, Brown DWG, Green J, Bridger JC, (2003). *Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans*. J Virol. 77, 2789–2798.
40. Oliver SL, Wood E, Asobayire E, Wathes DC, Brickell JS, Elschner M, Otto P, Lambden PR, Clarke IN, Bridger JC, (2007b). *Serotype 1 and 2 bovine noroviruses are endemic in cattle in the United Kingdom and Germany*. J Clin Microbiol. 45, 3050–3052.
41. Otto PH, Clarke IN, Lambden PR, Salim O, Reetz J, Liebler-Tenorio EM, (2011). *Infection of Calves with Bovine Norovirus GIII.1 Strain Jena Virus: an Experimental Model To Study the Pathogenesis of Norovirus Infection*. J Virol. 85, 12013–12021.
42. Park SI, Jeong C, Kim HH, Park SH, Park SJ, Hyun BH, Yang DK, Kim SK, Kang MI, Cho KO, (2007). *Molecular epidemiology of bovine noroviruses in South Korea*. Vet Microbiol. 124, 125–133.
43. Park SI, Jeong C, Park SJ, Kim HH, Jeong YJ, Hyun BH, Chun YH, Kang MI, Cho KO, (2008). *Molecular detection and characterization of unclassified bovine enteric caliciviruses in South Korea*. Vet Microbiol. 130, 371–379.
44. Park SI, Park DH, Saif LJ, Jeong YJ, Shin DJ, Chun YH, Park SJ, Kim HJ, Hosmillo M, Kwon HJ, Kang MI, Cho KO, (2009). *Development of SYBR Green real-time RT-PCR for rapid detection, quantitation and diagnosis of unclassified bovine enteric calicivirus*. J Virol Methods. 159, 64–68.

45. Reuter G, Pankovics P, Egyed L, (2009). *Detection of genotype 1 and 2 bovine noroviruses in Hungary*. Vet Rec. 165, 537–538.
46. Scipioni A, Mauroy A, Vinjé J, Thiry E, (2008). *Animal noroviruses*. Vet J. 178, 32-45.
47. Smiley JR, Chang KO, Hayes J, Vinje J, Saif LJ, (2002). *Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus*. J Virol. 76, 10089–10098.
48. Smiley JR, Hoet AE, Traven M, Tsunemitsu H, Saif LJ, (2003). *Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses*. J Clin Microbiol. 41, 3089-3099.
49. Thomas C, Jung K, Han MG, Hoet A, Scheuer K, Wang Q, Saif LJ, (2014). *Retrospective serosurveillance of bovine norovirus (GI.2) and nebovirus in cattle from selected feedlots and a veal calf farm in 1999 to 2001 in the United States*. Arch Virol. 159, 83–90.
50. Turan T, Işıdan H, Atasoy MO, Irehan B, (2018). *Detection and molecular analysis of bovine enteric norovirus and nebovirus in Turkey*. J Vet Res. 62, 129–135.
51. Van der Poel WHM, van der Heide R, Verschoor F, Gelderblom H, Vinjé J, Koopmans MPG, (2003). *Epidemiology of Norwalk-like virus infections in cattle in The Netherlands*. Vet Microbiol. 92, 297–309.
52. Vinjé J (2015) *Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus*. J Clin Microbiol 53: 373–381.
53. Wolf S, Williamson W, Hewitt J, Lin S, Rivera-Aban M, Ball A, Scholes P, Savill M, Greening GE, (2009). *Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms*. Vet Microbiol. 133, 184–189.
54. Woode GN, Bridger JC, (1978). *Isolation of Small Viruses Resembling Astroviruses and Caliciviruses from Acute Enteritis of Calves*. J Med Microbiol. 11, 441–452.
55. Yılmaz H, Turan N, Altan E, Bostan K, Yılmaz A, Helps CR, Cho KO, (2011). *First report on the phylogeny of bovine norovirus in Turkey*. Arch Virol. 156, 143–147.
56. Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS, (2006). *Norovirus classification and proposed strain nomenclature*. Virology. 346, 312–323.

## Ekotoksikoloji Alanında Balık Hücre Hatlarının Kullanımı

Aylin Pehlivan, Enes Atmaca, Abdurrahman Aksoy

Geliş Tarihi / Received: 14.11.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 30.11.2018

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi AD, Samsun

**Özet:** Son yıllarda, pratik ve etik nedenlerle, ekotoksikolojide *in vitro* yöntemlere olan ilgi artmıştır. Sitotoksosite çalışmalarında hücre kültürü uygulamaları, *in vivo* çalışmalardan elde edilen sonuçlara uyumluluğu ve hücresel düzeyde inceleme olanağı gibi avantajlarıyla, diğer *in vitro* yöntemlere göre öne çıkmıştır. Balık hücre kültürleriyle yapılan çalışmalar, kimyasal maddelerin toksik ve çevresel etkilerinin değerlendirilmesine imkan sağlamaktadır. Ekotoksikolojide, kimyasal maddelerin toksik ve çevresel etkilerinin değerlendirilmesinde RTG-2, RTL-W1, PLHC-1 ve EPC gibi çeşitli balık hücre hatları sıklıkla tercih edilmektedir. Bu derlemede, balık hücre hatlarının ekotoksikoloji çalışmalarında kullanımları ve dikkat edilmesi gereken bazı hususlar ele alınmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Çevresel kirleticiler, ekotoksikoloji, balık hücre hattı

### Use of Fish Cell Lines in Ecotoxicological Researches

**Abstract:** In recent years, interest in *in vitro* methods for ecotoxicology has increased considerably for practical and ethical reasons. Cell culture applications have many advantages such as compatibility with the results obtained in *in vivo* studies and the possibility of examination at the cellular level. Ecotoxicological studies with fish cells provide the assessment of toxic effects of both chemical substances as well as environmental samples. A variety of fish cell lines such as RTG-2, RTL-W1, PLHC-1, and EPC are frequently preferred in the evaluation of toxic and environmental effects of chemical substances in ecotoxicology. In this review, the general characteristics of fish cell lines used in toxicology, their use in ecotoxicology studies and the important points in toxicological evaluation are discussed.

**Keywords:** Environmental contaminants, ecotoxicology, fish cell line

### Giriş

Ekotoksikoloji araştırmalarında balık hücre hatları son yıllarda giderek önem kazanmaktadır. Balık hücre hatları ile yapılan ilk çalışmalar ağırlıklı olarak, viroloji araştırmaları için gökkuşağı alabalığı gonadından türetilmiş bir hücre hattı olan RTG-2 ile başlamıştır. Günümüzde ise kaynağını çeşitli tür ve dokulardan alan, çok sayıda balık hücre hattı, immünoloji, toksikoloji (çevre toksikolojisi), endokrinoloji, biyomedikal araştırmalar, hastalık kontrolü, biyoteknoloji, su ürünleri yetiştiriciliği ve radyasyon biyolojisi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır [18, 28].

Rachlin ve Perlmutter [35] 1968'de yassı kafalı golyan balığından (FHM) türetilmiş bir hücre hattında çinkonun sitotoksik etkisini ölçerek, balık hücrelerini toksikoloji alanında kullanan ilk araştırmacılar olmuşlardır. Bununla birlikte, 1980'lerden itibaren balık hücre hatları, toksikoloji alanında daha yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde toksikolojik deney ve testlerde balık

hücre hatlarının kullanımı, hem bazal hem de spesifik (hücreye özgü) sitotoksosite, genotoksosite, biyotransformasyon, biyobelirteçlerin indüksiyonu ve toksisite mekanizmaları ile ilgili çalışmalar da dahil olmak üzere hücreye özgü fonksiyonlar ve parametreler üzerindeki etkilere yoğunlaşmıştır [14]. Bu derlemede, balık hücre hatlarının ekotoksikoloji çalışmalarında kullanımları ve dikkat edilmesi gereken bazı hususlar ele alınmıştır.

### Ksenobiyotikler

Ksenobiyotik bileşiklerin toksisitesinin değerlendirilmesinde RTgill-W1 [17, 38], RTL-W1 [6, 8, 20, 27, 39], RTG-2 [3, 6, 13, 20] ve PLHC-1 [13, 15, 21, 43] sık kullanılan hücre hatları arasındadır. Bunlardan RTG-2 hücre hattı, Wolf ve Quimby [44] tarafından bir yaşındaki dişi ve erkek gökkuşağı alabalığının gonad dokusundan oluşturulan ilk balık hücre hattıdır. [11, 26]. RTgill-W1, yetişkin gökkuşağı alabalığının solungacından türetilmiş bir epitelyal hücre hattıdır. Bu hücre hattı, serum içermeyen, basit tampon maddeleri tolere edebilmekte

ve ekstraksiyon gibi işlemlere gerek duyulmadan doğrudan çevre örneklerine (atık su vb.) maruziyet çalışmalarında kullanılmaktadır. RTgill-W1 hücreleri sıkı bir epitelyum oluşturdukları için, hipo- ve hipertonic koşullara karşı oldukça dayanıklı olup, değişen tuzluluk oranlarına rağmen büyümelerine devam edebilirler. Ancak, hücre çoğalmasını baskılayan ve hücre morfolojisini değiştirebilen kortizol maruziyetine karşı oldukça duyarlıdır [17, 28, 36]. RTL-W1, dört yaşındaki bir yetişkin erkek gökkuşuğu alabalığının normal karaciğerinden türetilmiş, kendiliğinden ölümsüzleşebilen bir karaciğer epitelyal hücre hattıdır. Bu hücre hattı, indüklenebilir etoksiresolufin-O-deetilaz (EROD) etkinliği ve bu etkinliğin toksikolojik araştırmalarda kullanımı için özel olarak geliştirilmiştir. RTL-W1, daha çok aril hidrokarbon reseptör (AhR) agonistlerini ve CYP1A indüksiyonunu test etmek amacıyla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, çeşitli farmasötiklerin ve kozmetik ürünlerinin sitotoksikite ve çevresel numunelerin genotoksikite analizlerinde tercih edilmektedir [36]. Diğer bir devamlı hücre hattı PLHC-1, *Poeciliopsis lucida*'nın hepatoselüler karsinomundan türetilmiştir. PLHC-1, sık kullanılan diğer fibroblast benzeri hücrelere kıyasla, metabolik etkinliklerinin olması ve kolay kültüre edilmeleri gibi pek çok avantaja sahiptir. Bu hücre hattı, çeşitli kimyasal, kirletici ve çevresel örneklerin akut ve kronik toksisitesini değerlendirmek ve kimyasal maddelerin yapı-aktivite ilişkilerini araştırmak için oldukça uygundur [19].

Benzo(a)piren (BaP), ekotoksikoloji araştırmalarında en çok çalışılan ksenobiyotik maddedir. Bazı hücre hatları, BaP'i suda çözünür ara ürünlerle dönüştürmektedir [10]. Bu ara ürünlerden diolepoksitlerin, özellikle pürin bazları olan deoksiguanozin ve deoksiadenozin olmak üzere, DNA'ya bağlanıp genotoksikite ve karsinogeniteye sebep olduğu bildirilmiştir [22]. En çok çalışılan ksenobiyotik enzimi ise, sitokrom P450 üst ailesinin bir üyesi olan CYP1A'dır. Sitokrom P450 gen ailesinin üyeleri, çeşitli ilaçlar ve kirleticiler de dahil olmak üzere lipofilik ksenobiyotiklerin metabolizmasından sorumlu enzimleri kodlamaktadır. CYP1A alt ailesindeki proteinler, prokarsinogenik PAH'lar ve planar-halojenli aromatik hidrokarbonları (PHAH) metabolize eder ve etkisizleştirirler. CYP3A enzimleri ise, steroid 6β-hidroksilasyonun başlıca katalizörleridir, çeşitli

terapötik maddeleri metabolize eder ve aflatoksin B1 ve 7,8-dihidroksi-7,9-dihidrobenzo[a]piren gibi çeşitli prokarsinogenleri etkisizleştirirler [15].

Behrens ve ark. [8], *in vitro* modellerin çevresel toksik etkilere karşı verilen yanıtlardaki hücreye özgü farklılıkları araştırmak amacıyla, primer gökkuşuğu alabalığı hepatositleri ile RTL-W1'in PAH'lara maruziyeti sonucu CYP1A indüksiyonunu incelemişlerdir. CYP1A indüksiyonu, EROD aktivitesi ile değerlendirilmiş ve RTL-W1 hücrelerinin, primer hepatosit hücrelerine göre EROD yanıtında daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. PLHC-1 ve RTG-2 hücre hatlarında yapılan bir çalışmada 34 farklı farmasötik ürünün toksisitesi, metil tetrazolium (MTT) ve Neutral Red testleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, PLHC-1 hücre hattının bu maddelere, RTG-2 hücre hattından daha duyarlı olduğu ve daha küçük konsantrasyonlarda sitotoksikite gösterdiği ortaya konulmuş [13] ve PLHC-1 hücre hattının ksenobiyotik maddelere daha duyarlı olmasının metabolik aktivitesi sebebiyle olduğu bildirilmiştir [19].

### Çevresel Östrojenler

Dioksinler, dikloro difenil trikloroetan (DDT), dietilstilbestrol (DES) ve poliklorlu bifenil bileşikler (PCB) gibi çevresel östrojenler (Environmental Estrogens, EE), doğal yollarla veya insan faaliyetlerinin bir sonucu olarak çevrede ortaya çıkan ve 17β-östradiol'ün (E2) etkisini taklit ederek endokrin sisteme zarar veren, balıkların üreme ve genel sağlık durumunun bozulmasına neden olan maddelerdir. Östrojen reseptörü (ER), EE'lerin hemen hemen tüm önemli faaliyetlerine aracılık etmektedir. Östrojenik maddeler ya ER aracılığıyla ya da bu reseptörün aracılığına ihtiyaç duymadan, E2 tarafından başlatılanlara benzer hücre veya dokuya özgü etkilere sebep olabilmektedir [2].

EE'lerin incelenmesinde genellikle primer balık hepatosit kültürlerinde E2 ile vitellojenin (Vg) indüksiyonu çalışılmıştır. Balık hücre hatlarına genel olarak bakıldığında ise östrojenlere karşı çok duyarlı olmadıkları gözlenmiştir [10].

### Dioksin ve benzeri bileşikler

Dioksin vb bileşikler dermal toksisite, hepatotoksikite, teratojenite, tümörojenite, immüno-toksikite, hormonal ve nörodavranışsal değişiklikler ve ölüme

sebeplene olabilmektedirler. Tüm bu etkilerin, bir prototip uyarıcı olan 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (2,3,7,8-TCDD) aracılığıyla olduğu bilindiğinden, benzer tepkileri ortaya çıkaran bileşikler topluca dioksin benzeri bileşikler (Poliklorlu dibenzodioxinler (PCDD), poliklorlu dibenzofuranlar (PCDF) ve dioksin benzeri PCB'ler olarak adlandırılır [12]. Dioksin vb bileşikler AhR'ye bağlanarak CYP1A geninin ekspresyonunda artışa neden olurlar [10].

Dioksin vb bileşiklerden TCDD (dioksin), çoğu omurgalının sahip olduğu AhR'ne bağlanan en toksik bileşiktir [10]. Dioksinin, yüksek dozlarda balıklar, kuşlar ve memeliler dahil birçok hayvan türünde lenfoid doku ve gonadlarda atrofi, hepatotoksisite, nörotoksisite ve kardiyotoksisiteye yol açtığı bildirilmiştir [9]. Bununla birlikte, dioksinin olumsuz etkilerinin oksidatif stres ile ilişkili olduğu ve CYP1A izoformlarının indüksiyonuna yol açarak oksidatif DNA hasarına sebep olduğu belirtilmiştir [10].

RTG-2, RTL-W1, FG-9307 ve PLHC-1 gibi balık hücre hatları, AhR sinyal iletim sistemi tarafından kontrol edilen genleri ve süreçleri incelemek için kullanılmıştır ve bu hücre hatlarının dioksin vb bileşiklerin toksisitesinin taranmasında uygun bir biyobelirteç olabileceği belirtilmiştir [5, 21, 29, 34].

### Ağır Metaller

Ağır metal kirliliğinin, Minamata hastalığı (organik civa zehirlenmesi), Itai-itai hastalığı (kadmium zehirlenmesi), arsenik zehirlenmesi ve hava kirliliği ile ilişkili astım gibi küresel boyuttaki çeşitli hastalıkların nedeni olduğu bilinmektedir. Deniz ekosistemlerinde, kirlenici maddeler arasında ağır metal birikimi küresel önem taşımaktadır. Ağır metal kirliliği, su ortamının ekolojik dengesi ve su canlıları üzerinde olumsuz etkilere neden olabilmektedir. Ağır metaller, kalıcı ve birikici özellikleri nedeniyle, su canlıları tarafından su ve sedimentten alınmakta ve düşük trofik seviyelerden daha yüksek seviyelere doğru biyomagnifikasyon şekillenmektedir [7].

Metal homeostazında çeşitli molekül sınıfları yer almaktadır. Glutasyon (GSH) ve metallothionein (MT) gibi biyobelirteçler, ağır metal kontaminasyonunu değerlendirmek için sıklıkla kullanılırlar [1]. Glutasyon, hücrelerin zehirli maddelere karşı korunmasında ve ksenobiyotiklerin metabolizmasında yer alan, sülfidriden zengin bir tripeptittir [10].

Glutasyonun ağır metallere karşı koruyucu etkisinin kısmen bir hücre içi metal şelatörü olarak görev yapmasından kaynaklandığı bildirilmiştir [31]. Metallothioneinler ise, memelilerde çinko (Zn) homeostazında işlev gören, organizmayı ağır metal toksisitesi ve oksidatif strese karşı koruyan, sisteinden zengin metal bağlayıcı bir protein ailesidir. MT-1 ve MT-2 izoformlarının oluşumu, çeşitli metal, ilaç ve yangı mediyatörleri tarafından karaciğerde hızlı bir şekilde uyarılır. Beyin izoformu olan MT-3 ise, spesifik olarak nöronal büyüme inhibitörüdür [16]. Yapılan bazı çalışmalarda, MT'lerin serbest radikal temizleyici olarak işlev gördükleri ileri sürülmüştür [24]. Başka bir çalışmada ise tek başına MT indüksiyonuna kıyasla GSH ve MT'nin birlikte oksidatif hasara karşı daha etkili olduğu belirtilmiştir [41].

MT'lerin işlevlerini araştırmak amacıyla RTG-2, GCF (Grass Carp Fin, *Ctenopharyngodon idella*), CIK (Cytokine-induced killer), EPC (Epithelioma papulosum cyprini), CCO (Channel Catfish ovary, *Ictalurus punctatus*), BB (brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*) ve FHM balık hücre hatları kullanılmıştır [10, 24, 42]. CIK, EPC ve CCO hücre hatlarının karşılaştırmalı analizinin yapıldığı bir çalışmada, CIK hücrelerinin bakıra en duyarlı hücre hattı olduğu, EPC hücrelerinin krom ve Zn'ya karşı diğer hücrelere göre daha duyarlı, buna karşılık CCO hücre hattının kadmiyuma karşı en duyarlı hücre hattı olduğu ortaya konulmuştur. Sonuç olarak, CIK, EPC ve CCO hücre hatlarının potansiyel olarak, su ortamında ağır metallerin akut sitotoksitesinin değerlendirilmesi için hassas biyolojik belirteçler olabileceği gösterilmiştir [42].

### Genotoksik Etkili Maddeler

Balık hücre hatları çeşitli kimyasalların *in vitro* genotoksisite araştırmalarında kullanılmıştır. Çoğu ksenobiyotik maddenin genotoksitesisi, hücre metabolizmalardan etkilenmektedir. Bu nedenle, hücre hatları arasındaki biyotransformasyon aktivitesi veya DNA onarım kapasitesi farkları, *in vitro* genotoksisite testlerinin sonuçlarını büyük ölçüde etkileyebilmektedir [32]. Balık hücreleri, memeli hücrelerine kıyasla daha düşük DNA onarım kapasitesine sahiptir. Balıklarda nükleotid eksizyon onarım mekanizmasının aktivitesi memeli hücrelerinde olduğundan daha düşüktür. Bu nedenle DNA hasarına karşı daha duyarlı oldukları düşünülmektedir.

Balık ve kemirgen hücre hatları ile yapılan deneyler, RTG-2 hücrelerinin bir genotoksin olan 4-nitrokinolin-N-oksidi karşı memeli V79 hücrelerinden daha fazla duyarlılık gösterdiğini ortaya koymuştur [14].

Çevresel kirlenmelerin genotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde en sık kullanılan balık hücre hattı RTG-2'dir [30, 33, 34, 37]. Bunun yanında EPC hücrelerinin de, genotoksik etkileri değerlendirmek için uygun bir hücre hattı olduğu belirtilmektedir [23].

Yapılan çalışmalar RTG-2 hücre hattının özellikle çevresel kirlenmelerin genotoksikitesinin doğrudan değerlendirilmesinde yararlı olduğunu ancak BaP gibi etkisini metabolize olarak gösteren maddelerde yetersiz olduğunu göstermektedir. Bu nedenle genotoksikite çalışmalarında daha doğru sonuçlar elde edilebilmesi için balık hücre hattının analizi yapılacak maddenin özelliklerine göre seçilmesi gerekmektedir [32].

Ekotoksikoloji araştırmalarında yaygın olarak kullanılan balık hücre hatları, elde edildikleri türler ve özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Ekotoksikoloji araştırmalarında yaygın olarak kullanılan balık hücre hatları, elde edildikleri türler ve özellikleri [4, 10, 25, 40]

Hücre Hattı	Tür	Doku orijini	Morfoloji	İnkubasyon sıcaklığı	Medium	Kullanım Alanı
R1	<i>Oncorhynchus mykiss</i> Rainbow trout (Gökkuşluğu alabalığı)	Karaciğer	Fibroblastik	20 °C	EMEM, %10 FBS	Organik ve inorganik kimyasallar, ağır metaller, endüstriyel atıklar
RTG-2	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Testis, Ovaryum	Fibroblastik	22 °C	EMEM, %10 FBS	Fenol, benzen, anilin gibi çeşitli kimyasallar, atık sular, dioksin benzeri bileşikler, ağır metaller, genotoksik etkili maddeler
RT-gill W1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Solungaç	Epitelyal	18-20 °C	Leibovitz L-15 medium, %10 FBS	Çevresel örnekler
RTL-W1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Karaciğer	Epitelyal	20-25 °C	Leibovitz L-15 medium, %10 FBS	Çeşitli farmasötik ve kozmetik ürünler, çevre örnekleri, dioksin benzeri bileşikler
PLHC-1	<i>Poeciliopsis lucida</i> Topminnow (Yüzey sazın balığı)	Hepatoselüler karsinoma	Epitelyal	30 °C	EMEM, %5 FBS	Organotin bileşikleri, çeşitli fenoller, sülfonik asitler, çeşitli kimyasallar, çevresel örnekler, dioksin benzeri bileşikler
BB	<i>Ictalurus nebulosus</i> Bullhead brown (Kahverengi yayın balığı)	Bağ doku ve kas (Posterior gövde)	Fibroblastik	23 °C	EMEM, %10 FBS	Ağır metaller
BF-2	<i>Lepomis macrochirus</i> Bluegill (Güneş balığı)	Kaudal gövde	Fibroblastik	23 °C	EMEM, %10 FBS	Ağır metaller, organik toksik bileşikler
CHSE-214	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i> Chinook salmon (Kral somon)	Embriyo	Fibroblastik	21 °C	EMEM, %10 FBS	Çeşitli kimyasallar, antifouling ajanları, sürfaktanlar
EPC	<i>Cyprinus carpio</i> Common carp (Sazan balığı)	Epitelioma papulosum	Epitelyal	25 °C	EMEM, %10 FBS	Ağır metaller, genotoksik etkili maddeler
FG-9307	<i>Paralichthys olivaceus</i> Olive flounder (Dil balığı)	Solungaç	Epiteloid	20-25 °C	Leibovitz L-15 medium, %20 FBS	Dioksin benzeri bileşikler
FHM	<i>Pimephales promelas</i> Fathead minnow (Yassı kafalı golyan balığı)	Bağ doku ve kas	Epitelyal	34 °C	EMEM, %10 FBS	Ağır metaller, çeşitli kimyasallar

EMEM: Eagle's Minimum Essential Medium; FBS: Fetal Bovine Serum

## Sonuç

Çok sayıda yapılan çalışmalarla, ekotoksikoloji araştırmalarında balık hücre hatlarının özellikle çeşitli çevresel kirlenmelerin sitotoksikite, genotoksikite, CYP1A induksiyon potansiyeli ve östrojenik aktivitelerinin değerlendirilmesinde duyarlı ve spesifik *in vitro* sistemler olduğu ortaya konulmuştur.

Bunun yanında balık hücre hatları ile yapılacak olan çalışmalarda daha doğru sonuçlar elde edebilmek için bu sistemlerin hangi kimyasal gruplara yanıt verdikleri, hangi hücre hattının hangi kimyasala daha duyarlı olduğu göz önünde bulundurulmalı ve kimyasal maddelerin toksik etkilerinin değerlendirilmesinde doğru test metodları seçilmelidir.

## Kaynaklar

- Acker LA, McMahan JR, Gawel JE, (2005). *The effect of heavy metal pollution in aquatic environments on metallothionein production in Mytilus sp.* Proceedings of the 2005 Puget Sound Georgia Basin Research Conference.
- Ackermann GE, Brombacher E, Fent K, (2002). *Development of a fish reporter gene system for the assessment of estrogenic compounds and sewage treatment plant effluents.* Environ Toxicol Chem. 21, 1864-1875.
- Araujo CSA, Marques SAF, Carrondo MJT, Gonçalves LMD, (2000). *In vitro response of the brown bullhead catfish (BB) and rainbow trout (RTG-2) cell lines to benzo(a)pyrene.* Sci Total Environ. 247, 127-135.
- ATCC, (2018). Erişim adresi: <https://www.lgcstandards-atcc.org/en.aspx> , Erişim tarihi: 09.11.2018.
- Babin MM, Tarazona JV, (2005). *In vitro toxicity of selected pesticides on RTG-2 and RTL-W1 fish cell lines.* Environ Pollut. 135, 267-274.
- Babin M, Boleas S, Tarazona JV, (2005). *In vitro toxicity of antimicrobials on RTG-2 and RTL-W1 fish cell lines.* Environ Toxicol Pharmacol. 20, 125-134.
- Baby J, Raj JS, Biby ET, Sankarganesh P, Jeevitha MV, Ajisha SU, Rajan SS, (2010). *Toxic effect of heavy metals on aquatic environment.* Int J Biol Chem Sci. 4(4), 939-952.
- Behrens A, Schirmer K, Bols NC, Segner H, (2001). *Polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of cytochrome P4501A enzyme activity in the rainbow trout liver cell line, RTL-W1 and in primary cultures of rainbow trout hepatocytes.* Environ Toxicol Chem. 20(3), 632-643.
- Birnbaum LS, Tuomisto J, (2000). *Non-carcinogenic effects of TCDD in animals.* Food Addit Contam. 17(4), 275-288.
- Bols NC, Dayeh VR, Lee LEJ, Schirmer K, (2005). *Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology.* Mommsen TP, Moon TW. eds. Biochemistry and molecular biology of fishes. Elsevier B.V. p.43-84.
- Bols NC, Pham PH, Dayeh VR, Lee LEJ, (2017). *Invitromatics, invitrome, and invitroomics: introduction of three new terms for in vitro biology and illustration of their use with the cell lines from rainbow trout.* In Vitro Cell Dev Biol. 53, 383-405.
- Brack W, Schirmer K, Kind T, Schrader S, Schüürmann G, (2002). *Effect-directed fractionation and identification of cytochrome P4501A-inducing halogenated aromatic hydrocarbons in a contaminated sediment.* Environ Toxicol Chem. 21(12), 2654-2662.
- Caminada D, Escher C, Fent K, (2006). *Cytotoxicity of pharmaceuticals found in aquatic systems: Comparison of PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines.* Aquat Toxicol. 79, 114-123.
- Castano A, Bols N, Braunbeck T, Dierickx P, Halder M, Isomaa B, Kawahara K, Lee LEJ, Mothersill C, Pärt P, Repetto G, Sintès JR, Ruffi H, Smith R, Wood C, Segner H, (2003). *The use of fish cells in ecotoxicology.* ATLA. 31, 317-351.
- Celander M, Hahn ME, Stegeman JJ, (1996). *Cytochromes P450 (CYP) in the Poeciliopsis lucida hepatocellular carcinoma cell line (PLHC-1): Dose and time-dependent glucocorticoid potentiation of CYP1A induction without induction of CYP3A.* Arch Biochem Biophys. 329(1), 113-122.
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM, (2002). *Metallothionein: The multipurpose protein.* Cell Mol Life Sci. 59, 627-647.
- Dayeh VR, Schirmer K, Bols NC, (2002). *Applying whole-water samples directly to fish cell cultures in order to evaluate the toxicity of industrial effluent.* Water Res. 36, 3727-3738.
- Fent K, (2001). *Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples.* Toxicol In Vitro. 15, 477-488.
- Fent K, (2007). *Permanent fish cell cultures as important tools in ecotoxicology.* ALTEX. 24(8), 26-28.
- Fent K, Batscher R, (2000). *Cytochrome P4501A induction potencies of polycyclic aromatic hydrocarbons in a fish hepatoma cell line: demonstration of additive interactions.* Environ Toxicol Chem. 19(8), 2047-2058.
- Fent K, Hunn J, (1996). *Cytotoxicity of organic environmental chemicals to fish liver cells (PLHC-1).* Mar Environ Res. 42(14), 377-382.
- IARC, (2010). *Benzo[a]pyrene.* <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono100F-14.pdf> , Erişim tarihi: 30.11.2018.
- Kammann U, Bunke M, Steinhart H, Theobald N, (2001). *A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay.* Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 498(1-2), 67-77.
- Kling P, Erkell LJ, Kille P, Olsson PE, (1996). *Metallothionein induction in rainbow trout gonadal (RTG-2) cells during free radical exposure.* Mar Environ Res. 42(1-4), 33-36.
- Lakra WS, Raja Swaminathan T, Joy KP, (2011). *Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: a review.* Fish Physiol Biochem. 37, 1-20.
- Lange M, Gebauer W, Markl J, Nagel R, (1995). *Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish, Brachydanio rerio and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test.* Chemosphere. 30(11), 2087-2102.
- Lee LEJ, Clemons JH, Bechtel DG, Caldwell SJ, Han KB, Pasitschniak-Arts M, Mosser DD, Bols NC, (1993). *Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome P450-dependent monooxygenase activity.* Cell Biol Toxicol. 9(3), 279-294.
- Lee LEJ, Dayeh VR, Schirmer K, Bols NC, (2009). *Applications and potential uses of fish gill cell lines: examples with RTgill-W1.* In Vitro Cell Dev Biol. DOI:10.1007/s11626-008-9173-2.

29. Li H, Zhang S, (2001). *In vitro* cytotoxicity of the organophosphorus pesticide parathion to FG-9307 cells. *Toxicol In Vitro*. 15, 643-647.
30. Llorente MT, Parra JM, Sanchez-Fortun S, Castano A, (2012). *Cytotoxicity and genotoxicity of sewage treatment plant effluents in rainbow trout cells (RTG-2)*. *Water Res*. 46, 6351-58
31. Maracine M, Segner H, (1998). *Cytotoxicity of metals in isolated fish cells: Importance of the cellular glutathione status*. *Comp Biochem Physiol A*. 120, 83-88.
32. Nehls S, Segner H, (2001). *Detection of DNA damage in two cell lines from rainbow trout, RTG-2 and RTL-W1, using the Comet assay*. *Environ Toxicol*. 16, 321-329.
33. Nehls S, Segner H, (2005). *Comet assay with the fish cell line rainbow trout gonad-2 for in vitro genotoxicity testing of xenobiotics and surface waters*. *Environ Toxicol Chem*. (24)8, 2078-2087.
34. Parra J.M, Sanchez-Fortun S, Castano A, (2012). *Assessment of genotoxic effects induced by selected pesticides on RTG-2 fish cells by means of a modified fast micromethod assay*. *Environ Toxicol*. 27, 238-243.
35. Rachlin JW, Perlmutter A, (1968). *Fish cells in culture for study of aquatic toxicants*. *Water Res*. 2(6), 409-414.
36. Roux F, (2015). *Fish cell lines and their potential uses in ecotoxicology: from cytotoxicity studies and mixture assessment to a co-culture model and mechanistic analyses*. Master Thesis, Department of Biological and Environmental Sciences University of Gothenburg, Gothenburg.
37. Sanchez P, Llorente M.T, Castano A, (2000). *Flow cytometric detection of micronuclei and cell cycle alterations in fish-derived cells after exposure to three model genotoxic agents: mitomycin C, vincristine sulfate and benzo(a)pyrene*. *Mutat Res*. 465, 113-122.
38. Schirmer K, Dixon DG, Greenberg BM, Bols NC, (1998). *Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill*. *Toxicology*. 127, 129-141.
39. Schirmer K, Chan AGJ, Bols NC, (2000). *Transitory metabolic disruption and cytotoxicity elicited by benzo[a]pyrene in two cell lines from rainbow trout liver*. *J Biochem Mol Toxicol*. 14(5), 262-276.
40. Schirmer K, (2006). *Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish*. *Toxicology*. 224, 163-183.
41. Schlenk D, Rice CD, (1998). *Effect of zinc and cadmium treatment on hydrogen peroxide-induced mortality and expression of glutathione and metallothionein in a teleost hepatoma cell line*. *Aquat Toxicol*. 43, 121-129.
42. Tan F, Wang M, Wang W, Lu Y, (2008). *Comparative evaluation of the cytotoxicity sensitivity of six fish cell lines to four heavy metals in vitro*. *Toxicol In Vitro*. 22, 164-170.
43. Thibaut R, Porte C, (2008). *Effects of fibrates, anti-inflammatory drugs and antidepressants in the fish hepatoma cell line PLHC-1: Cytotoxicity and interactions with cytochrome P4501A*. *Toxicol in Vitro*. 22, 1128-1135.
44. Wolf K, Quimby MC, (1962). *Established eurythermic line of fish cells in vitro*. *Science*. 135(3508), 1065-10.



## **Biyosensörler ve SELEX (Systematic Evolution of Ligands By Exponential Enrichment)**

**Seyyide Sarıçam, Hamit Kaan Müştak**

*Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Ankara Türkiye*

**Geliş Tarihi / Received:** 12.11.2018, **Kabul Tarihi / Accepted:** 30.11.2018

**Özet:** Biyomoleküller aracılığı ile kimyasal bileşikler tespit etmeye yarayan özel sensörlere biyosensör denmektedir. Biyosensörler, biyolojik ve fiziksel olmak üzere 2 bileşenden oluşmaktadır. Hedef molekül ile spesifik olarak etkileşime giren biyolojik bileşene biyoreseptör adı verilmektedir. Biyoreseptörün ligand ile bağlanmasıyla oluşan etkileşimleri ölçülebilir sinyallere çeviren fiziksel bileşen ise dönüştürücü adını almaktadır. Biyoreseptörler oluştuğu biyomolekül tipine göre, dönüştürücüler ölçüm yaptıkları parametrelere göre ayrılır. Gelişen teknolojiyle birlikte nükleik asit biyoreseptörleri, yüksek spesifikite ve afinite, farklı hedef moleküllere uygulanabilme, hızlı ve güvenilir sonuçlar alabilme gibi avantajları sayesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Nükleik asit tabanlı biyosensör analizlerinden SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) analizi, rastgele seçilmiş oligonükleotit biyoreseptörlerinin biyomoleküllere afinitesinden yararlanılarak hedef biyomolekülün tespit edildiği in vitro seleksiyon ve amplifikasyon analizidir. Bir karışım içerisindeki hedef biyomolekülün kolaylıkla tespitini sağlayan SELEX analizi klinik teşhis, gıda endüstrisi, farmakolojik ve ekolojik çalışmalar başta olmak üzere pek çok farklı alanda başarıyla kullanılmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Aptamer, Biyoreseptör, Biyosensör, SELEX.

### **Biosensors and SELEX (Systematic Evolution of Ligands By Exponential Enrichment)**

**Abstract:** Special sensors for detecting chemical compounds through biomolecules are called biosensors. Biosensors consist of biological and physical components. The biological component that specifically interacts with the target molecule is called a bioreceptor. The physical component that converts the interactions generated by the binding of the bioreceptor to the measurable signals takes the name of the transducer. Bioreceptors are classified according to the biomolecule type, the transducers are separated according to the parameters they are measuring. With developing technology nucleic acid bioreceptors are used frequently due to the advantages of being able to apply to different target molecules, high specificity and affinity, obtain fast and reliable results. One of the nucleic acid-based biosensor analyzes, SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) analysis is an in vitro selection and amplification analysis in which the target biomolecule is detected using the affinity of the randomly selected oligonucleotide bioreceptors to the biomolecules. The SELEX analysis which easily assists the target molecule in a mixture, has been used successfully in many different areas, including clinical diagnosis, food industry, pharmacological and ecological studies.

**Key words:** Aptamer, Bioreceptor, Biosensor, SELEX.

## **Giriş**

### **Biyosensör Nedir?**

Biyokimyasal analizlerde yer alan kimyasal bileşikler biyomoleküller aracılığı ile tespit etmeye yarayan özel sensörlere biyosensör denmektedir [21]. “International Union of Pure and Applied Chemistry” (IUPAC) tarafından, “kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı ölçülebilir sinyallere dönüştüren ekipmanlar” olarak tanımlanmaktadır [15]. Biyosensör; analiz edilecek biyomolekül ile spesifik olarak etkileşime giren biyolojik bir bileşenin, bu etkileşim sonucu ortaya çıkan değişiklikleri ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştüren fiziksel

bileşenle kombinasyonu ile oluşturulur. Biyolojik bileşen biyoreseptör, fiziksel bileşen ise dönüştürücü (transducer) adını almaktadır.

### **Biyosensörlerin Tarihi**

“Biyosensör” terimi ilk kez 1962’de Clark ve arkadaşları tarafından kandan glikoz tespitine yarayan glikoz oksidaz amperometrik enzim biyosensörü ile kullanılmıştır [20]. 1972 yılında ilk kez, geliştirilen bir glikoz biyosensörü ticarileştirilmiştir [9]. İmmüno-sensörler ise 1975 yılında çalışılmaya başlanmış olup, 1980 yılında ilk kez optik biyosensörler, 1990 yılında ise nükleik asit tabanlı biyosensörler geliştirilmiştir [4,12]. Uygulama alanına bağlı ola-

rak biyosensörler için “immünoensör, glikometre, biyoçip” gibi çeşitli terminolojiler kullanılmış olup biyosensör ismi, IUPAC tarafından 1992’de resmileştirilmiştir [17].

### Biyosensörlerin Kullanım Alanları

Mikrobiyal patojenler, antibiyotikler, toksinler, pestisitler, metabolitler, allerjenler, kan bileşenleri ve kanser hücreleri gibi çeşitli hedef biyomolekülleri saptama özelliği ile biyosensörler klinik teşhis, farmakoloji, gıda endüstrisi, tarımsal ve ekolojik uygulamalar, gibi oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir [26].

Klinik teşhis amacıyla biyosensörler metabolik, genetik, hormonal ve enfeksiyon hastalıkları teşhisinde kullanılmaktadır. Biyosensörlerin kullanıldığı hastalıklar ve bozuklukların başında diyabet, osteoporoz, otoimmün hastalıklar, kanser, kalp-damar hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar gelmektedir. Global ölüm nedeni olan kanser, Alzheimer, diyabet gibi hastalıklarda gözlenen biyokimyasal, morfolojik değişimleri saptamada kullanılmakla birlikte hastalığın takibinde de kullanılması önemlerini artırmakta ve yeni teknolojiler ile çeşitlendirilip geliştirilmelerinin önünü açmaktadır [4,5].

Tarımsal uygulamalar kapsamında biyosensörler, yaygın olarak pestisitlerin tespitinde kullanılmaktadır. Tarımsal veya çevresel ürünlerdeki pestisit kalıntılarının besin zinciri, içme suyu ve havaya geçişiyle her yıl 1 milyon insanın kronik hastalık ya da ölümle karşı karşıya kaldığı bilinmektedir. Ayrıca pestisitlerin tarımsal üretimde %45 kayıp oluşturduğu düşünüldüğünde hızlı, selektif ve güvenilir olarak tespitlerinin önemi anlaşılmaktadır. Bu amaç doğrultusunda çevresel örneklerden paraksozon, karbofuran, atrazin, karbamat gibi pestisitlerin tespitinde sıklıkla biyosensörler kullanılmaktadır [29].

Gıdalarda, klinik ya da çevresel örneklerde virüs, bakteri, toksinler gibi biyolojik tehdit ajanlarının tespitinde de biyosensörler sıklıkla kullanılmaktadır. Bu ajanların tespiti, yayılımın önlenmesi ve oluşturdukları hastalıkların tedavi edilmesi bakımından oldukça önemlidir. Yirmi yılı aşkın süredir mikroorganizmaların tespiti ve identifikasyonunda daha hızlı ve daha duyarlı sonuç vermesi nedeniyle biyosensörler tercih edilmektedir [24]. Biyosensörler ile tespit edilen mikroorganizmalara *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum*, *Mycobacterium*

*tuberculosis*, *Salmonella Typhimurium*, *Yersinia pestis*, *Fransiella tularensis*, *Brucella melitensis*, Smallpox virüs, Hepatit C virüs, Human immüno-deficiency-1 virüs, *Aspergillus spp*, *Candida albicans* örnek verilebilir. Biyosensörler ile tespit mikroorganizmaların iç ve dış anatomik yapıları ya da metabolik ürünlerinden yararlanılmaktadır. Örneğin; *Bacillus anthracis* sporları veya toksinleri üzerinden, Smallpox virüsü ise nükleik asiti üzerinden biyosensörler ile tespit edilmektedir [8, 13, 22, 23].

Biyosensörler, diğer analiz yöntemleri ile karşılaştırıldığında çeşitli avantajlara sahiptir. Kullanım kolaylığı, hızlı yanıt alabilme, yüksek sensitivite, yüksek spesifite, yüksek selektivite kolay gözlemleyebilme ve yorumlayabilme bu avantajların başında gelmektedir. Ayrıca taşınabilir ve sahaya uygulamalarına uyarlabilir olması da kullanımını artırmaktadır [11, 29].

### Biyosensörlerin Bölümleri

Biyosensörler temel olarak biyolojik bileşen ve fiziksel bileşen olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır [21]. Prensip olarak herhangi bir biyoreseptör herhangi bir dönüştürücüyle birleştirilerek işleyen bir biyosensör üretilebilir [6,16]. Ancak biyosensörlerin üretiminde biyoreseptörün performansını etkileyecek kimyasal ve fiziksel bileşenlerin (pH, sıcaklık, iyon konsantrasyonu, kontaminant, vb.) kontrolüne dayanan immobilizasyon işlemi oldukça önemlidir [17].

#### 1. Biyoreseptör

Biyoreseptör, hedef biyomolekül (ligand) ile spesifik olarak etkileşime giren biyolojik bileşendir. Biyotanıma elementi olarak da adlandırılır. Analiz edilecek biyomoleküle spesifik olarak etkileşime girme özelliğine sahip yüksek spesifitedeki biyomoleküller, biyoreseptör olarak kullanılmaktadır. Biyoreseptörler, çalışma mekanizmalarına göre biyokatalitik reseptörler ve biyoafinite reseptörler olmak üzere ikiye ayrılır. Biyokatalitik reseptörler; belirli bir reaksiyonu katalizleyebilme özelliğindeki enzim, hücre, doku ve mikroorganizmaları kapsarken belirli biyomoleküllere yüksek afinite ile bağlanabilme özelliğindeki antikör ve nükleik asitler biyoafinite reseptörleri olarak sınıflandırılır [19, 24].

### a. Enzim Biyoreseptörleri

Spesifik bir veya birden fazla substrat içeren belirli bir kimyasal reaksiyonu katalizleyen protein moleküllerine enzim adı verilmektedir [3]. Enzimler, bu özellikleri sayesinde biyosensör teknolojisinde ilk kullanılan biyosensörler olup ayrıca en yaygın kullanıma sahip katalitik biyoreseptörlerdir. Biyosensörlerde enzim kullanımı; difüzyon sorunu olmaması, hızlı analiz süresi ve yüksek spesifite ve sensitivite gibi avantajlara sahipken kullanılan enzimin konformasyonel yapısına bağlı olarak kararlılıklarının düşük olması, saflık tayini gerektirmesi, aktivatör ve kofaktör gerektirmeleri ve pahalı olmaları gibi dezavantajlara da sahiptir. Enzimlere dayalı biyosensörlerin performansının pH, iyon konsantrasyonu, sıcaklık, kofaktörler gibi çeşitli dış parametrelere bağlı olması da bir diğer dezavantajdır. Ayrıca enzimleri uygun formda doğal olarak içeren organel, hücre, doku, mikroorganizmalar gibi diğer biyokatalitik reseptörlerin kullanımda olması da direkt olarak enzim biyoreseptörlerinin kullanımını azaltmıştır [10, 16].

### b. Hücre ve Doku Biyoreseptörleri

1981'de ilk defa bitki dokusu temelli elektrot hazırlanmasından itibaren, birçok hücre ve doku temelli biyosensör geliştirilmiştir [25]. Canlı hücrelerin biyoreseptör olarak kullanılmasıyla biyolojik analitteki ligandın reseptöre bağlanmasıyla hücre içi ve hücre dışı mikroçevresel değişimler kolaylıkla tespit edilir [7]. Doku biyosensörleri ile enzimlerin saflaştırılma gerekliliği ortadan kalkar. Ayrıca doku biyosensörleri bazı enzimler için doğal ortamda artan kararlılık, düşük maliyet, aktivatör ve kofaktör gerektirmemeleri, yüksek aktivite ve kararlılık göstermeleri gibi avantajlara sahiptirler [31]. Ancak hücre ve doku kesitlerinin biyoreseptör olarak kullanılmasında ligand difüzyon sorunu ve analiz süresinin uzun olması gibi çalışmanın performansını ve ilerleyişini uzun vadede olumsuz etkileyecek dezavantajlar bulunmaktadır.

### c. Mikroorganizma Biyoreseptörleri

Mikroorganizmalar kimyasal bileşiklerin tespitinde geniş bir uygulama alanına sahiptir. Mutasyonlar ve rekombinant DNA teknoloji sayesinde mikroorganizmalarda gerçekleştirilen genetik modifikasyonlar ve potansiyel intraselüler enzim kaynağı

olmaları biyoreseptör olarak kullanılabilirliklerini sağlamaktadır. Enzimlerin %90 oranında intraselüler olması ve mikroorganizmaların endüstriyel enzim üretimlerine alternatif kaynak olması mikrobiyal hücrelerin biyoreseptör olarak kullanımını artırmaktadır. Ayrıca canlı hücreler biyosensörlerin üretimi aşamasında önemli avantajlar sağlamaktadır. Bunlardan en önemlisi dönüştürücülerin ortama verdiği amonyak, karbon dioksit ve asitlerin canlı hücrelerce metabolize edilerek ortadan kaldırılması analiz sensitivitesinin artırılmasıdır.

### d. Antikor Biyoreseptörleri

Antikorlar, antijenik moleküllere gösterdikleri spesifik afinite sayesinde 30 yıldır biyoreseptör olarak kullanılmaktadır [21]. İlk kez 1987 yılında immüno-globulin G molekülü biyoreseptör olarak kullanılarak hedef molekül benzopren halkası tespit edilmiştir [30]. Antikor biyoreseptörleri, yüksek spesifite, sensitivite ve selektivite doğrultusunda klinik ve teşhis uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Biyomoleküllerle etkileşimleri direkt ve indirekt olmak üzere iki şekilde olur. Direkt etkileşimde hedef biyomoleküle direkt olarak afinite gösterirken, indirekt immünosensörlerde hedef biyomoleküle bağlanan floresans ya da luminesans antijenik moleküller tespit edilir [19,21].

### e. Nükleik Asit Biyoreseptörleri

Tiyol, dilsülfid bağları, amin ya da biyotin gibi çeşitli moleküller aracılığıyla bir dönüştürücü moleküle immobilize edilen ssDNA ve RNA şeklindeki oligodeoksiribonükleotitler (ODNs), ortamdaki hedef moleküle spesifik olarak tanır ve bağlanır. Bu bağlanma süreci floresan, elektrokimyasal ya da radyoaktif bileşenlerle sinyal oluşmasını sağlar. Oluşan sinyal optik, elektrokimyasal ya da termometrik dönüştürücüler tarafından dönüştürülür. Elektrokimyasal DNA biyosensörler; hızlı, ucuz ve farklı uygulama prosedürlerine uyumlu olması sayesinde gıda endüstrisi ve klinik teşhis uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedir [19, 21].

### 2. Dönüştürücü (Transducer)

Dönüştürücü, ortamdaki hedef biyomolekülün konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak oluşan biyokimyasal/fizikokimyasal etkileşimleri ölçülebilir fiziksel elektrokimyasal, elektriksel optik, kütleli ya

da termometrik sinyallere çeviren fiziksel bileşendir [19]. Dönüştürücüler, ölçüm yaptıkları parametrelere göre sinyallere göre elektrokimyasal, elektriksel, optik, piezoelektrik ve termometrik olmak üzere 5 temel gruba ayrılmaktadır [21].

#### a. Elektrokimyasal Dönüştürücüler

Biyoreseptörün spesifik biyomolekülü tanınmasıyla birlikte ortamda oluşan biyokimyasal reaksiyonlara bağlı oluşan potansiyel elektrik akımı, elektron ya da iyon konsantrasyonundaki değişimleri ölçülebilir sinyallere dönüştüren dönüştürücülerdir [2]. Elektrokimyasal dönüştürücüler, ölçüm mekanizmalarına göre amperometrik ve potansiyometrik olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Amperometrik dönüştürücüler, en yaygın elektrokimyasal dönüştürücü tipi olup hedef molekül varlığında oluşan akım değişimlerini ölçmeye dayanmaktadır. Amperometrik dönüştürücülerden daha az duyarlılığa sahip potansiyometrik dönüştürücüler ise sıfır elektrik akım altında iyon selektif membranla ayrılmış iki farklı ortam arası potansiyel farkı ölçmeye dayanmaktadır.

#### b. Elektriksel Dönüştürücüler

Elektriksel dönüştürücüler, biyoreseptör ile hedef molekülün bağlanmasıyla ortaya çıkan iyon ve elektronlar sayesinde değişen elektrik iletkenliğini veya direncini ölçerek çalışan dönüştürücülerdir. Esas alınan parametre elektrik iletkenliği veya elektrik direncidir. Kondüktometrik dönüştürücüler olarak da bilinmektedir.

#### c. Optik Dönüştürücüler

Optik dönüştürücüler; hedef biyomolekül ile biyoreseptör bağlanmasıyla ortamdaki kromofor, florofor benzeri moleküllerce oluşturulan ışık dalgalarının absorpsiyon, emisyon, geçirgenlik, saçılım, yansıma ve kırılması şeklinde değişikliklerin saptanmasına dayanmaktadır. Optik dönüştürücüler ölçüm mekanizmasına göre adlandırılmaktadırlar. Kolorimetrik dönüştürücüler renk değişimini saptarken florometrik dönüştürücüler florofor etiketleme sayesinde oluşan ışık emisyonunu ölçmektedir. Florofor tabanlı dönüştürücüler yüksek selektivite ve sensitiviteyi sayesinde sıklıkla kullanılmaktadır [21].

#### d. Piezoelektriksel (Kütle Duyarlı) Dönüştürücüler

Kütle duyarlı dönüştürücüler olarak adlandırılan piezoelektriksel dönüştürücüler hedef molekül ve biyoreseptör etkileşimi ile ortaya çıkan moleküler kütle değişikliklerini saptamaya dayanır. Kütlele değişikliklere bağlı olarak etkilenen viskozite, yoğunluk ve akışkanlık parametreleri üzerinden ölçüm yapılır. Kütle duyarlı sensörlerde, genellikle kuvars kristaller kullanılır.

#### e. Termometrik Dönüştürücüler

Biyosensörün spesifik biyomolekül ile bağlandığında oluşan ısı artışı ya da azalışı şeklindeki değişiklikleri ölçülebilir sinyal olarak ortaya koyan dönüştürücü tipidir. Kalorimetrik dönüştürücüler olarak da bilinir. Açığa çıkan ya da emilen toplam ısı, biyosensör ile etkileşime giren hedef molekül sayısı ile doğru orantılıdır. Termometrik dönüştürücüler sensitiviteyi yüksek olduğundan sık sık kalibrasyon gerektirmez. Genellikle gıda analizleri, kozmetik ve farmasötik madde analizleri, tarımsal uygulamalarda pestisit analizlerinde kullanılır [21].

#### İmmobilizasyon Yöntemleri

Biyoreseptörün dönüştürücü ile birleştirilmesine immobilizasyon denilmektedir. Immobilizasyon ile bir biyosensörün iki ayrı bileşen stabilize edilerek bir araya getirilir. Immobilizasyon fiziksel adsorpsiyon, matriks tuzaklama, çapraz bağlama ve kovalent bağlama olmak üzere 4 farklı yöntem ile gerçekleştirilir [29]. Fiziksel adsorpsiyon yönteminde van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler, iyonik etkileşimler ya da hidrojen bağları ile biyolojik bileşen fiziksel bileşene sabitlenir. Matriks tuzaklamada gözenekli bir membran matriks üzerinde iki bileşen sabitlenir. Çapraz bağlama ile immobilizasyonda gluteraldehit, heksametildiamin gibi çok fonksiyonlu bağlayıcı moleküller ile üç boyutlu bağlanma oluşturulur. Kovalent bağlama ile immobilizasyonda, biyoreseptörün aktif grupları fiziksel bileşene bağlanır [4,19, 29].

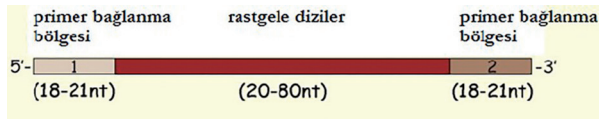
#### SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)

İlk kez 1990 yılında tanımlanan SELEX (Systematic Evolution of Ligands By Exponential Enrichment), biyoreseptör olarak rastgele seçilmiş oligonükleotit

moleküllerinin biyomoleküllere afinitesinden yararlanılarak hedef biyomolekülün tespit edildiği in vitro seleksiyon ve amplifikasyon analizidir [4]. İlk olarak 1990 yılında T4 bakteriyofajı DNA polimeraz enzimi (gp3) RNA molekülleri ile kullanılarak SELEX ile tespit edilmiştir. Gelişen teknolojik uygulamalar ile birlikte SELEX döngüsünde yer alan amplifikasyon ve seleksiyon parametreleri çeşitlenerek çoğalmıştır [12,14].

## 1. Rastgele DNA/RNA Oligonükleotit Kütüphanesi

SELEX'te biyoreseptör olarak kullanılan 2-25 kDa ağırlığındaki tek zincirli yapay ssDNA ya da RNA oligonükleotit moleküllerine aptamer adı verilmektedir. Aptamerler, orta noktada rastgele sıralanmış 20-80 nükleotidin 5' ve 3' ucunda 18-21 nükleotitlik spesifik primer bağlanma bölgesi bulunan oligonükleotitlerdir (Şekil 1). Aptamerdeki rastgele sıralanmış nükleotitler arasındaki bazı özel diziler hedef moleküle yüksek afinite göstererek bağlanmayı başlatır. RNA aptamerleri ve DNA aptamerleri olmak iki çeşit aptamer bulunmaktadır.



Şekil 1. Aptamer yapısı [Stoltenburg ve ark. (2007) yılında yapmış olduğu çalışmadan Türkçeleştirilmiştir (26)].

Aptamerler; hücre, nükleik asit, metal iyonları, organik boyalar, proteinler gibi geniş bir hedef molekül kitlesine yüksek afinite ve spesifite göstermeleri sayesinde bu moleküllerin tespitini sağlayan biyosensörlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Özgül üç boyutlu konformasyonel yapıları sayesinde bir karışım içindeki hedef molekülleri özgül konformasyonel yapıları üzerinden tespit edilmesini sağlarlar. Bu tanıma aşamasında aptamer ile hedef molekül arasında van der Waals bağları, hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler ya da aromatik halkasal bağlanmalar meydana gelir [26].

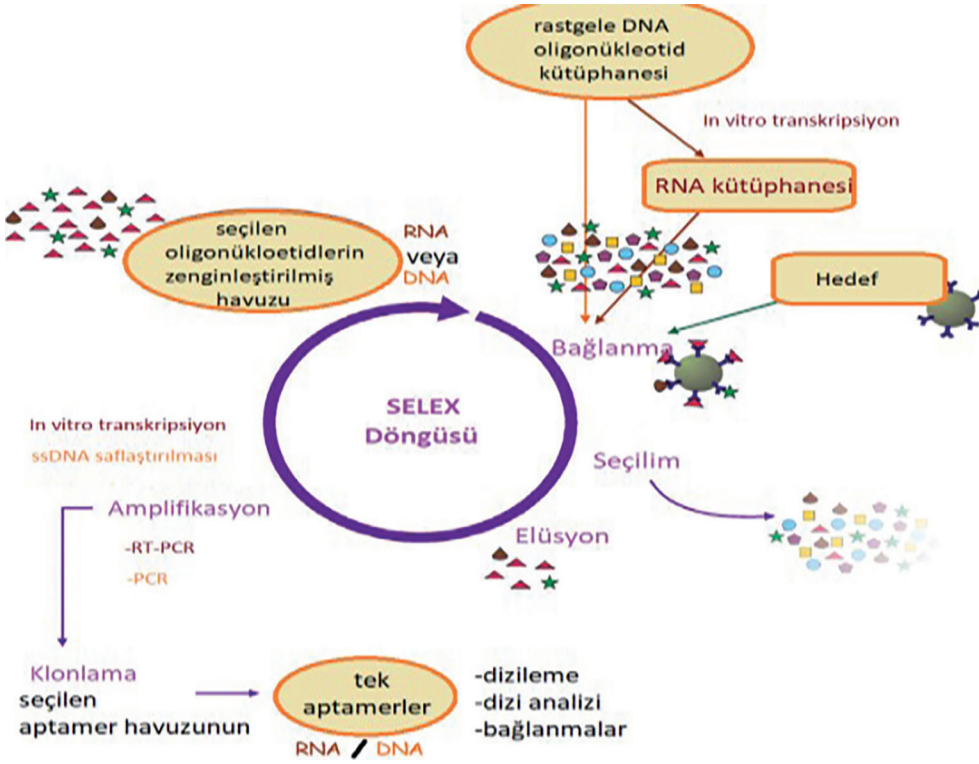
Aptamerler, monoklonal antikorlar ile eşit düzeyde bağlanma afinite gücüne sahipken denatürasyon ve degradasyona karşı daha dirençli olmaları ile antikorlardan avantajlıdır. Antikorlardan farklı olarak kiral moleküller arasında bile ayırım yapabilmeleri önemli bir diğer avantajlarıdır. Anti-

korlar çalışma koşulları göz önüne alındığında çok dar ve sınırlı bir ortam isterken aptamerler için optimal koşullar daha geniş aralıktadır ve fizyolojik koşullardan daha az etkilendiği için optimizasyonu antikorlara kıyasla daha kolaydır [1, 26, 29]. Geniş bir hedef kitlesi için kullanılabilir olması gıda analizlerinde, farmakolojik analizlerde, klinik teşhiste (metabolik hastalıklar, genetik hastalıklar, kanser, enfeksiyon hastalıkları teşhisinde vb.) kullanımına imkan sağlamaktadır. Antikorların aksine aptamerlerin fiziksel stabiliteleri daha fazla olup kolay sentezlenip uzun süre depolanabilirler. Antikorların biyoreseptör olarak kullanımı aptamerler kıyaslandığında bir diğer dezavantaj ise çapraz reaksiyonlar nedeniyle spesifitesini daha düşük olmasıdır [6].

## 2. SELEX Mekanizması

SELEX yöntemi temel olarak; rastgele seçilmiş yaklaşık  $10^{15}$  farklı oligonükleotitten oluşan DNA/RNA kütüphanesi şeklindeki aptamer havuzunun oluşturulmasıyla başlar. Aptamer havuzu ile hedef molekülü içeren karışım inkübe edilir. İnkübasyon ile hedef moleküle afinite gösteren aptamerler ile hedef molekül arasında bağlanma gerçekleşir. Bağlanmayan aptamerler, manyetik boncuklar, kolon kromatografisi ya da nitroselüloz filtrelerle gerçekleştirilen seleksiyon işlemi ile ortamdan uzaklaştırılır. Seleksiyon sonrası hedef moleküle bağlanmış aptamerler, elüsyon işlemi ile çözdürülerek hedef molekülden ayrıştırılır. Seçilen aptamerlerin zenginleştirilmiş havuzunu elde etmek üzere amplifikasyon işlemi gerçekleştirilir. Bu noktada aptamerlerin spesifik uç bölgelerinden bağlanarak amplifikasyonu başlatacak primerlerden yararlanır ve sonrasında SELEX döngüsü başlatılır. Zenginleştirilmiş aptamer havuzu elde edildikten sonra hedef molekül ile inkübasyon, seleksiyon, elüsyon ve amplifikasyon işlemleri döngü halinde (genellikle 8-15 kez) tekrarlanır. Böylelikle en yüksek afinite ve spesifiteye sahip aptamer elde edilir ve dizilenecek belirlenir (Şekil 2).

SELEX ile hedef molekül için  $10^{15}$  farklı aptamer içinden en yüksek afinite olanı veya olanları seçilmiş olur. Bazı farklı hedef moleküller ile etkileşimi incelenerek negatif kontrol grupları oluşturulur. Sonuç olarak hedef biyomoleküle spesifik ve duyarlı olduğu doğrulanan aptamer molekülü, bir karışım ortamında hedef molekülün saptanmasında kullanılabilir hale gelir [26].



Şekil 2. SELEX mekanizması [Stoltenburg ve ark. (2007) yılında yapmış olduğu çalışmadan Türkçeleştirilmiştir (26)].

### 3. Hedef Biyomolekül

SELEX yöntemi oldukça farklı hedef moleküllerinin ayırımında kullanılmaktadır. İnorganik ve organik küçük moleküller, proteinler, karbonhidratlar, antibiyotikler, toksinler ve hücreler bunlardan başlıcalarıdır [1, 26, 28].

Veteriner mikrobiyoloji alanında SELEX oldukça yaygın kullanıma sahiptir. Pek çok bakteriyel, viral ve mikotik etken SELEX ile tespit edilmektedir. Bunlardan bazıları *Staphylococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae*, [1, 28] etkenleridir. Viral etkenlerden Influenza virus 1, Orthopoxvirus, Monkeypox virus ve Smallpox virus SELEX ile tespit edilen viral hedef moleküller arasındadır [27]. Mikotik etkenlerden SELEX ile başarıyla tiplendirilenlere ise *Candida albicans* örnek verilebilir [18].

### Kaynaklar

1. Amraee M, Oloomi M, Yavari A, Bouzari S, (2017). *DNA aptamer identification and characterization for E. coli O157 detection using cell based SELEX method*. Anal Biochem. 536, 36-44.
2. Aykut U, Temiz H, (2006). *Biyosensörler ve gıdalarda kullanımı*. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi.3, 51-59.
3. Berk L, Kaiser K, Bretscher S, Matsudaira P, (2011). *Molecular Cell Biology*. Sixth edition. New York: WH Freeman and Company. 10.
4. Bhalinge P, Kumar S, Jadhav A, Suman S, Gujjar P, Perla N, (2016). *Biosensors: Nanotools of detection-A Review*. International Journal of Healthcare and Biomedical Research. 4, 26-39.
5. Bier FF, Schumacher S, (2013). *Integration in bioanalysis: technologies for point of care testing*. Adv Biochem Eng Biotechnol. 133, 1-14.
6. Chambers JP, Arulanandam BP, Matta LI, Weis A, Valdes JJ, (2008). *Biosensor recognition elements*. Curr Issues Mol Biol. 10, 1-12.
7. Chen S, Shamsi MH, (2017). *Biosensors-on-chip: a topical review*. J Micromech Microeng. 27, 1-15.
8. Darsanaki RZ, Azizzadeh A, Nourbakhsh M, Raeisi G, Aliabad MA, (2013). *Biosensors: functions and applications*. Journal of Biology and Today's World. 2,53-61.

9. Davis F, Higson SPJ (2009). *Biosensors*. Seminars in Cell and Developmental Biology. 20.
10. Dinçkaya E, (1999). *Enzim sensörleri*. Biyosensörler. 81-142.
11. Editorial, (2005). *Biosensor technologies*. Methods. 37, 1-3.
12. Ellington AD, Szostak JW, (1992). *Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures*. Nature. 355, 850-852
13. Gooing JJ, (2006). *Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends*. Anal Chim Acta. 559, 137-151.
14. Gopinath SCB, (2007). *Methods developed for SELEX*. Anal Bioanal Chem. 387, 171-182.
15. IUPAC Compendium of Chemical Terminology 2nd Edition 1997, (1992). International Union of Pure and Applied Chemistry: Research Triangle Park, NC, USA.
16. Junhui Z, Hong C, Ruifu Y, (1997). *DNA based biosensors*. Biotechnol Adv. 15, 43-58.
17. Kissinger PT, (2005). *Biosensors a perspective*. Biosens Bioelectron. 20, 2512-2516.
18. Lacerda CMS, Reis MF, Correa CR, Andrade ASR, (2013). *Development of anti B-glucan aptamers For use as radiopharmaceutical in the identification of fungal infections*. International Nuclear Atlantic Conference. 1-13.
19. Martinkova P, Kostelnik A, Valek T, Pohanka M, (2017). *Main streams in the construction of biosensors and their applications*. Int J Electrochem Sci. 12, 7386-7403.
20. Mohanty SP, Kougianos E, (2006). *Biosensors: A tutorial review*. IEEE Potentials. 25, 35-40.
21. Monosik R, Stredansky M, Sturdik E, (2012). *Biosensors, classification, characterization and new trends*. Acta Chim Slovaca. 5, 109-120.
22. Pohanka M, Skladal P, Kroea M, (2007). *Biosensors for biological warfare agent detection*. Defence Sci J. 57, 185-193.
23. Ray M, Ray A, Dasha S, Mishraa A, Acharyb Kg, Nayaka S, Singh S, (2017). *Fungal disease detection in plants: Traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors*. Biosens Bioelectron. 87, 708-723.
24. Shah J, Wilkins E, (2002). *Electrochemical biosensors for detection of biological warfare agents*. Electroanal. 15, 157-167.
25. Sidwell JS, Rechnitz GA, (1986). *'Bananatrod'—an electrochemical biosensor for dopamine*. Biotech. Lett. 7, 419-422.
26. Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz, (2007). *SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands*. Biomol Eng. 24, 381-403.
27. Tang Z, Parekh P, Turner P, Moyer RW, Tan W, (2009). *Generating aptamers for recognition of virus-infected cells*. Clin Chem. 55, 1-14.
28. Torres Chavolla E, Alocilja EC, (2009). *Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens*. Biosens Bioelectron. 24, 3175-3182.
29. Verma N, Bhardwaj A, (2015). *Biosensor technology for pesticides—A review*. Appl Biochem Biotechnol. 175, 3093-3119.
30. Vodinh T, Tromberg BJ, Griffin GD, Ambrose KR, Sepaniak MJ, Gardenhire EM, (1987). *Antibody-based fiber-optics biosensor for the carcinogen benzo(a)pyrene*. Appl Spesctrosc. 41, 735-738.
31. Woo HM, Kim KS, Lee JM, Shim HS, Cho SJ, Lee WK, Ko HW, Keum YS, Kim SY, Pathnayake P, Kim CJ, Jeong YJ, (2013). *Single-stranded DNA aptamer that specifically binds to the influenza virus NS1 protein suppresses interferon antagonism*. Antivir Res. 100, 337-345.

