

ISSN 1016-3573



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



ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ

JOURNAL OF ETLİK VETERINARY MICROBIOLOGY
ANKARA – TURKEY

Cilt/Volume 26 ♦ Sayı/Number 1 ♦ 2015

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi
Cilt/Volume 26 ♦ Sayı/Number 1 ♦ 2015
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. Özhan Türkyılmaz
Enstitü Müdürü

Editörler Kurulu / Editorial Board

Baş Editör / *Editor-in Chief*

Dr. Özhan Türkyılmaz

Editör Yardımcıları / *Co-Editors*

Dr. Erhan Akçay

Dr. Asiye Dakman

Dr. Ali Erkurt

Dr. Elçin Günaydın

Dr. A. Burak Güngör

Dr. F. İpek Keskin

Dr. Tahsin Onur Kevenk

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

URL : <http://vetkontrol.tarim.gov.tr/merkez/Sayfalar/AnaSayfa.aspx>

E-posta : etlikvetmikrobiyolderg@gmail.com

Hakem Listesi / Referees List*

Prof.Dr. Mustafa Açııcı	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fakültesi Parazitoloji ABD
Dr. Bekir Çelebi	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Ulusal Bakteriye Zoonozlar Referans Lab.
Prof.Dr. T. Haluk Çelik	Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi ABD
Doç.Dr. Alper Çiftçi	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD
Yrd.Doç.Dr. Yavuz Çokal	Balıkesir Üniv. Bandırma Meslek Yüksek Okulu
Prof.Dr. Meryem Eren	Erciyes Üniv. Veteriner Fakültesi Biyokimya ABD
Doç.Dr. Muammer Göncüoğlu	Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi ABD
Doç.Dr. Selçuk Kılıç	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Ulusal Yüksek Riskli Patojenler Referans Merkez Lab.
Prof.Dr. Firuze Kurtoğlu	Selçuk Üniv. Veteriner Fakültesi Biyokimya ABD
Yrd.Doç.Dr. Kaan Müştak	Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD
Doç.Dr. Ertan Emek Onuk	Adnan Menderes Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD
Doç.Dr. Kezban Can Şahna	Fırat Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji ABD
Prof.Dr. Bayram Şenlik	Uludağ Uni Veteriner Fakültesi Parazitoloji ABD
Doç.Dr. Osman Yaşar Tel	Harran Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD
Doç.Dr. Armağan Erdem Ütük	Çukurova Üniv. Ceyhan Veteriner Fakültesi Parazitoloji ABD
Doç.Dr. Yakup Yıldırım	Mehmet Akif Ersoy Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji ABD

** 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 2015, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

Basım Tarihi / Publishing Date: Haziran / June 2015, Baskı adedi / Circulation: 500

Düzeltilme

Dergimizin **cilt 25 sayı 2; sayfa 47-52, 2014** fasikülünde basılan ‘**Enterokokların önemli virulens faktörleri ve gıdalarda bulunuşu**’ isimli makale sehven derleme yerine araştırma makalesi olarak geçmiştir. Okuyucularımızın bilgilerine arz ederiz.

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

Sayfa

VKMAE 2007-2011 Sığır Bruselloz seroloji verileri

2007-2011 VCCRI Bovine Brucellosis serologic data

Elçin GÜNAYDIN, Uğur KÜÇÜKAYAN, Türcan TOSUN, Ufuk ÜLKER, Kaan MÜŞTAK.....1

Koyunlarda Tularemi'nin serolojik olarak incelenmesi ve Brusella ile çapraz reaksiyonunun belirlenmesi

Determination of the cross reaction of Tularemia titer and Brucella on sheep at specific disease focus in Turkey

Derya KARATAŞ YENİ, Müjgan İZGÜR.....7

Ratlarda diyeteye eklenen borun kan bakır ve seruloplazmin düzeylerine etkileri

Effects of dietary boron on blood ceruloplasmin and copper levels in rats

Pınar BULUZ, Nuri Başpınar, Pınar Peker Akalın, Selçuk PEKKAYA 11

Sığırların klinik mastitislerinden *Pseudomonas aeruginosa*'nın izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıklarıAntibiotic susceptibilities and isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical mastitis in cattle

Cemil ŞAHİN, Göksel ERBAŞ 16

Olgu Sunumu / Case Report***Aeromonas hydrophila* isolation from Holland lop (*Oryctolagus cuniculus*) rabbits**Hollanda lop (*Oryctolagus cuniculus*) tavşanlarından *Aeromonas hydrophila* izolasyonu

Meriç Lütfi Avsever, Seza Eskiizmirliler, Serra Tunalıgil.....21

Derleme / Review Article**Türk gıda mevzuatında risk analizi**

Risk analysis in Turkish food legislation

Gizem ÇOPUROĞLU, Aylin KASIMOĞLU DOĞRU, Naim Deniz AYAZ23

Ixodid kenelerle mücadelede kimyasal akarisitlere alternatif yollar

Alternative ways of combating with Ixodidae tick by chemical acaricide

Perçem ATAN, Kader YILDIZ29

Biyolojik Maddelerin Kurutularak Saklanması: Liyofilizasyon

Protection of biological materials by drying: Lyophilization

Züleyha ERGÜN.....35

Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayım Koşulları

1. Dergi, T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Etlık Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün hakemli, bilimsel yayın organı olup, yılda iki defa yayımlanır. Derginin kısaltılmış adı "Etlık Vet Mikrobiyol Derg" dir.
 2. Etlık 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 etlikvetmikrobiyolderg@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.
- Özet**, Türkçe ve İngilizce olarak, tek paragraf halinde ve en fazla 500 sözcük olmalıdır.
- Anahtar kelimeler**, 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 parantez içerisinde yazılmalıdır. Cümle sonunda birden çok kaynak belirtilecek ise kaynak numaraları küçükten büyük

yağ 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;

Sürekli 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:

Flauss JI, (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 digenetic 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-peroksidad 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.weds.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. Etlık 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 karşılaştırılmalarına 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

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.

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

Key words 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 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 Wiley 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 digenetic trematode from the Alosa fallax in Turkey.* Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII), October, 10-14, İzmir-Turkey.

For dissertations:

Aksoy E, (1997). *Sığır Vebası hastalığının histolojik ve İmmüno-peroksidaz 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.

Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi
Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi - Ankara

Aşağıda başlığı bulunan ve yazarları belirtilen makalenin tüm sorumluluğu Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayın Komisyonu Başkanlığı'na ulaşıncaya kadar yazar/larına aittir.

Yayının adı:

Yazar/ların ad/ları:

Aşağıda isim ve imzaları bulunan yazarlar; yayınlamak üzere gönderdikleri makalenin orijinal olduğunu, daha önce başka bir dergiye yayınlanmak üzere gönderilmediğini ve kısmen ya da tamamen yayınlanmadığını, gerekli düzeltmelerle birlikte her türlü yayın hakkının, yazının yayımlanmasından sonra Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'ne devrettiklerini kabul ederler. Yayımlanmak üzere gönderilen bu makalenin tüm sorumluluğunu da yazar/lar üstlenmektedir.

Yukarıdaki makalenin tüm hakları Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'ne devredilmiştir.

Yazar ad/ları	İmza	Tarih
.....
.....
.....
.....

Yazışma Adresi:

Copyright Release

Journal of Etlik Veterinary Microbiology Ankara - TURKEY

The undersigned authors release Journal of Etlik Veterinary Microbiology from all responsibility concerning the manuscript entitled;

Title of paper:

Authors names:

Upon its submission to the publishing commission of the Journal of Etlik Veterinary Microbiology.

The undersigned author/s warrant that the article is original, is not under consideration by another journal, has not been previously published or that if has been published in whole or in part, any permission necessary to publish it in the above mentioned journal has been obtained and provided to the Journal of Etlik Veterinary Microbiology. We sign for and accept responsibility for releasing this material.

Copyright to the above article is hereby transferred to the Journal of Etlik Veterinary Microbiology, effective upon acceptance for publication.

To be signed by all author/s

Authors names	Signature	Date
.....
.....
.....

Correspondence Address:

VKMAE 2007-2011 Sığır Bruselloz seroloji verileri

Elçin GÜNAYDIN¹, Uğur KÜÇÜKAYAN¹, Türcan TOSUN¹, Ufuk ÜLKER¹, Kaan MÜŞTAK²

¹ Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Md. Yetiştirme Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı, ANKARA

² Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 26.05.2015, Kabul Tarihi / Accepted: 30.06.2015

Özet: Bu çalışmada, 2007-2011 yılları arasında Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü (VKMAE) sorumluluğundaki illerde Bruselloz riski taşıyan sürülerden gönderilen 30944 sığırın kan serumu incelendi. Tarım işletmelerinden 13244, ithal sığırlardan 7679 sığır kan serumu da *Brucella* yönünden kontrol amaçlı incelemeye alındı. Serum örneklerinin tümü Rose Bengal Plate Test (RBPT), Serum Aglutinasyon Testi (SAT) ve Komplement Fiksasyon Testi (KFT) ile çalışıldı. Bruselloz riski taşıyan sürülerden gönderilen 30944 sığır kan serumunun 6913'ü (%22.34) *Brucella* antikorları yönünden pozitif bulunmuştur. 2007 ve ardı sıra gelen 4 yıl boyunca, tespit edilen antikor pozitiflik oranları sırasıyla; %30.56, %25.96, %24.17, %18.70 ve %17.28'dir. Kontrol amaçlı incelemeye alınan sığır kan serumu örneklerinde antikor pozitifliğine rastlanmadı. Laboratuvarımız verileri, 5 yıllık periyotta Enstitümüz sorumluluğundaki illerde sığırlarda Brusellozun değerlendirilmesi niteliğinde olacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Brucella*, sığır, seroloji

2007-2011 VCCRI Bovine Brucellosis serologic data

Summary: In this study, between 2007-2011, 30944 bovine blood sera sent from the herds found in brucellosis risky provinces under the responsibility of Veterinary Control Central Research Institute (VCCRI) were examined. 13244 bovine blood sera from Government Farms and 7679 bovine blood sera from imported cattles were also examined for the purpose of *Brucella* control. All the serum samples were investigated by Rose Bengal Plate Test (RBPT), Serum Agglutination Test (SAT) and Complement Fixation Test (CFT). Of 30944 blood bovine sera sent from the *Brucella* risky herds, 6913 (22.34%) sera were found to be antibody positive. 2007 and subsequent 4 years, the rate of antibody positivity was determined as 30.56%, 25.96%, 24.17%, 18.70% and 17.28%, respectively. Antibody positivity was not determined in the bovine blood sera examined for the purpose of *Brucella* control. Our laboratory data will be an evaluation of bovine brucellosis in the provinces under the responsibility of our institute during a 5 years period.

Keywords: *Brucella*, bovine, serology

Giriş

Bruselloz, bir asrı geçkin bir süredir, birçok yerde yaygın olarak gözlenen zoonoz bir hastalıktır. Bruselloz'a birçok *Brucella* spp. türü neden olmakta, gerek evcil gerekse vahşi hayvanların çoğu etkilenmektedir. *B. abortus*, sığırlarda Brusellozun asıl etiyolojik ajanı olmasına rağmen, *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis* çiftlik hayvanlarında ve insanlarda görülen Brusellozdan sorumludur. Bu üç *Brucella* spp. sığırlarda abort, ölü doğum, infertilite ile sonuçlanan çok önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır [4].

Bruselloz, 5 kıtada görülen ve halen birçok gelişmiş ülkede kontrol edilemeyen ciddi bir halk sağlığı problemidir. Bruselloz, İran, Irak, Lübnan, Sudan, Suudi Arabistan, Suriye, Mısır, Fas, Cezayir

ve Türkiye olmak üzere birçok Ortadoğu ve Afrika ülkesinde çok büyük ekonomik kayıplarla rapor edilmektedir [1,10,17,26]. Avusturya, Danimarka, Finlandiya, Almanya, Lüksemburg, İsveç, Hollanda, Norveç ve Büyük Britanya resmi olarak *Brucella* ari statüsü kazanırken, Fransa, Yunanistan, İzlanda, Portekiz, İspanya gibi diğer Avrupa ülkelerinde *Brucella* eradikasyon programı başarıyla sürdürülmektedir [12,21,33]. Ülkemizde de, birçok kontrol ve eradikasyon programı uygulansa da, hastalık hala ruminant ve insanlarda yaygın bir şekilde gözlenmekte ve ciddi sağlık problemlerine yol açmaktadır [2,5,35]. Brusellozla mücadelede, hastalık odaklarının saptanması, epidemiyolojik çalışmalarda ve eradikasyon programlarında atılacak en önemli adımlardan biridir [3,25,29,30].

Türkiye’de sığır brusellozu ile mücadele, 1931-1932 yıllarında ilk tespit edildiği zamandan günümüze devam etmektedir. Türkiye genelinde Ulusal Kontrol ve Eradikasyon Programı, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığınca 1984’te başlatılmıştır. Kontrol ve Eradikasyon Programı ile ilgili projenin süresi, 26 yıl olarak planlanmış ve Türkiye 5 coğrafi bölgeye ayrılıp, 4-8 aylık buzağuların hepsi *Brucella abortus* S-19 aşısı ile aşılanıp, aşılanan her buzağıya kulak küpesi takılıp kayıt altına alınmıştır. 1989 yılında yapılan ulusal surveylansta, sığırlardaki infeksiyon oranı %3.56 olarak tespit edilmiştir. 1990’da, sığırlarda prevalans oranı %1.2 olarak bildirilmiştir. 1991’de yapılan serolojik surveylansta, sığırlarda infeksiyon prevalansı %1.01 olarak rapor edilmiştir [17]. Trakya Bölgesi’nde 1991-1993 yılları arasında planlanan bir pilot çalışma ile Azaltılmış Doz *Brucella* aşılması uygulanmış ve bu pilot çalışma sonrası ‘Ulusal Kontrol ve Eradikasyon Çalışması’na Azaltılmış Doz *Brucella* aşılama uygulaması ilave edilmiştir. 1997’de başlatılan serosurvey ile sığırlarda *bireysel* prevalans %1.43, sürü prevalansı ise %11.4 şeklinde rapor edilmiştir [17,19,35]. 2011 yılında yapılan serosurvey sonuçlarına göre sığırlarda sürü prevalansı %6.9, fert prevalansı %2.6 bulunmuştur [15,36]. Ocak 2012 tarihinden itibaren, ‘*Brucella*’nın Konjunktival Aşı ile Kontrol ve Eradikasyonu’ projesi ülke genelinde uygulanmaya başlamış ve halen devam etmektedir. Sığırlar için planlanan süre 10 yıldır [15].

Enstitümüz sorumluluğundaki İç Anadolu Bölgesi illeri; Ankara, Kırıkkale, Kırşehir, Nevşehir, Kayseri, Yozgat, Çankırı, Çorum, Eskişehir ve Karadeniz Bölgesi illeri; Bolu, Karabük, Zonguldak, Bartın ve Kastamonu’dur. Enstitümüz sorumluluğundaki iller ve çevre illerde de sığırlarda Bruselloz, önemli bir sağlık problemi olmasının yanı sıra hayvancılık sektöründe ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu çalışmada; 2007-2011 yılları arasında laboratuvarımıza Enstitümüz sorumluluğundaki illerden gönderilen serum örneklerinde RBPT, SAT ve KFT ile sığır Brusellozu yönünden surveylans harici bölgesel değerlendirme amaçlandı.

Materyal Metot

Serum: 2007-2011 yılları arasında Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü (VKMAE), Yetiştirme

Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı’na, Enstitümüz sorumluluğundaki illerde (Ankara, Kırıkkale, Kırşehir, Nevşehir, Kayseri, Yozgat, Çankırı, Eskişehir, Bolu, Karabük, Zonguldak, Bartın, Kastamonu) abort yapan veya Bruselloz riski taşıyan sürülerde barındırılan sığırlardan gönderilen toplam 30944 kan serumu *Brucella* antikorları yönünden incelemeye alındı (Tablo 1 ve 2). Ayrıca, 2007-2011 periyodunda, tarım işletmelerinden gönderilen 13244, 2010-2011 arasında ithal sığırlardan alınan 7679 kan serumu da *Brucella* yönünden kontrol amaçlı incelemeye alındı.

Tablo 1. Yıllara bağlı laboratuvarımıza abort yapan sürülerden gönderilen sığır serum örnekleri

Yıl	Serum adedi	Pozitif serum adedi	% Pozitif
2007	3625	1108	%30.56
2008	5921	1529	%25.82
2009	7234	1749	%24.17
2010	5556	1039	%18.70
2011	8608	1488	%17.28
Toplam	30944	6913	%22.34

Rose Bengal Plate Testi (RBPT): Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü’nden (PVKE) temin edilen, RBPT antijeni kullanılarak RBPT yapıldı [4].

Brucella Serum Aglutinasyon Testi (SAT): PVKE’nden sağlanan *B. abortus* S99 suşu ile hazırlanmış tüp aglutinasyon test antijeni kullanıldı. Serumdaki *Brucella* aglutinasyon derecesi, mililitrede IU olarak değerlendirildi. Mililitrede 30 ve daha fazla IU içeren serum pozitif olarak kabul edildi. [4].

Komplement Fiksasyon Testi (KFT): PVKE’nden sağlanan KFT antijeni ile yapıldı. Serumlardan 20 IKFTU/ml veya daha yukarı titrelerde reaksiyon verenler pozitif olarak kabul edildi [4].

Sonuçlar

2007-2011 yılları arasında, Enstitümüz sorumluluğundaki illerden gönderilen toplam 30944 sığır kan serumunun 6913’ü (%22.34) *Brucella* antikorları yönünden pozitif bulunmuştur. Yıllara bağlı KFT ile antikor pozitiflik oranları sırasıyla; %30.56, %25.96, %24.17, %18.70 ve %17.28 bulundu.

Tablo 2. Yıl ve il bazında laboratuvarımıza gönderilen serum örnekleri

İL	YIL											
	2007		2008		2009		2010		2011		2011	
	Numune	Pozitif (%)	Numune	Pozitif (%)	Numune	Pozitif (%)	Numune	Pozitif (%)	Numune	Pozitif (%)	Numune	Pozitif (%)
ANKARA	159	52(%32.70)	553	200(%36.16)	855	171(%20.00)	423	61(%14.42)	1381	134(%9.70)		
BOLU	31	17(%5.48)	91	13(%14.28)	46	15(%32.60)	42	13(%30.95)	421	55(%13.06)		
ÇANKIRI	938	229(%24.41)	1806	415(%22.97)	3699	779(%21.05)	1954	349(%17.86)	4316	682(%15.80)		
ÇORUM	656	214(%32.62)	1230	289(%23.49)	1168	340(%29.10)	1279	325(%25.41)	671	113(%16.84)		
ESKİŞEHİR	99	16(%16.16)	344	48(%13.95)	112	1(%0.89)	279	31(%11.11)	122	0(%0)		
KASTAMONU	206	42(%20.38)	505	255(%50.49)	161	33(%20.49)	96	30(%31.25)	450	99(%22)		
KAYSERİ	735	201(%27.34)	425	55(%12.94)	222	69(%31.08)	70	6(%8.57)	342	170(%49.71)		
KIRŞEHİR	560	239(%42.67)	304	97(%31.90)	236	80(%33.89)	41	2(%4.87)	274	74(%27.00)		
NEVŞEHİR	121	45(%37.19)	35	5(%14.28)	213	95(%44.60)	832	119(%14.30)	177	21(%11.86)		
YOZGAT	79	42(%53.16)	251	82(%32.66)	148	80(%54.05)	312	68(%21.79)	193	100(%51.81)		
ZONGULDAK	0	0(%0)	0	0(%0)	0	0(%0)	0	0(%0)	21	0(%0)		
KIRIKKALE	0	0(%0)	349	67(%19.19)	195	34(%17.43)	26	5(%19.23)	3	0(%0)		
BARTIN	5	0(%0)	6	0(%0)	62	30(%48.38)	117	22(%18.80)	60	0(%0)		
KARABÜK	36	11(%30.55)	22	3(%13.63)	117	22(%18.80)	85	8(%9.41)	177	40(%22.59)		
TOPLAM	3625	1108(%30.56)	5921	1529(%25.82)	7234	1749(%24.17)	5556	1039(%18.70)	8608	1488(%17.28)		

Enstitümüz sorumluluğundaki iller için 2007 ve ardı sıra gelen 4 yıl boyunca *Brucella* antikor pozitifliği; Ankara'da %32.70, %36.16, %20.00, %14.42 ve %9.70; Bolu'da %5.48, %14.28, %32.60, %30.95, %13.06; Çankırı'da %24.41, %22.97, %21.05, %17.86, %15.80; Çorum'da %32.62, %23.49, %29.10, %25.41, %16.84; Eskişehir'de %16.16, %13.95, %0.89, %11.11, %0.00; Kastamonu'da %20.38, %50.49, %20.49, %31.25, %22; Kayseri'de %27.34, %12.94, %31.08, %8.57, %52.63; Kırşehir'de %42.67, %31.90, %33.89, %4.87, %27.00; Nevşehir'de %37.19, %14.28, %44.60, %14.30, %11.86; Yozgat'ta %53.16, %32.66, %54.05, %21.79, %51.81; Karabük'te %30.55, %13.63, %18.80, %9.41, %22.59 bulundu. Kırıkkale'den 2007 yılında hiç numune gönderilmemiş, 2011 yılında ise gönderilen 3 sığır kan serumunda *Brucella*'ya karşı antikor tespit edilmemiştir. Aynı ilin, 2008-2010 yılları arasındaki 3 yıl içerisinde antikor oranı sırasıyla; %19.19, %17.43, %19.23 bulunmuştur. Zonguldak'tan ise 2007-2010 yılları arasında şüpheli serum örneği gönderilmemiş, 2011 yılında gönderilen 21 sığır kan serumunda antikor pozitifliğine rastlanmamıştır.

2007-2011 yılları arasında tarım işletmelerinden kontrol amaçlı laboratuvarımıza gönderilen 13244 sığır serumunda *Brucella* antikor pozitifliği tespit edilmemiştir. Ayrıca 2010 ve 2011 yıllarında yurtdışından ithal edilen sığırların *Brucella* kontrolü amacıyla incelemeye alınan 7679 kan serumu da *Brucella* antikorları yönünden negatif bulunmuştur.

Tartışma

Önemli zoonozlardan biri olan Brusellozun prevalansı ülkeler, ülke bazında bölgeler ve hatta işletmeler arasında farklılıklar göstermektedir [7,8,9,17,22,28,34]. İyisan ve ark. [17], *Brucella* prevalansının bölgelere göre değişmekle birlikte, %0-10 arasında olduğunu bildirmişlerdir.

Ülkemiz adına, Marmara Bölgesi'nde yapılan çalışmalara örnek vermek gerekirse; Demirözü ve ark. [8], Trakya yöresinde Brusellozun seroprevalansını belirlemek için yaptıkları çalışmada, İstanbul, Tekirdağ, Kırklareli ve Edirne illerinde 6089 sığıra ait kan serumunu RBPT ve KFT ile incelemeleri sonucunda, seroprevalansı %1,06 olarak saptadıklarını rapor etmişlerdir. Erdoğan ve ark. [9],

1989-1992 yılları arasında Trakya bölgesinde sığırlarda %11 oranında seropozitiflik saptadıklarını rapor etmişlerdir.

Ege Bölgesi'nde ise; Gökçen ve Eskiizmirli [13], *Brucella* prevalansının %4.1 olduğunu rapor etmişlerdir. Pehlivanoglu ve ark. [24], Burdur'da seropozitif sürülerin büyük bölümünün (%45.8) sürü içi seroprevalansının %1 ile %10 arasında olduğunu bildirmiş ve yavru atma problemleri sürülerde brusellozun yaygın olduğu ve büyük sürülerin bruselloz yönünden daha yüksek risk altında olduğunu rapor etmiştir.

Doğu Anadolu Bölgesi için durum, daha önce abort geçmişi olan 720 sığır kan serumuyla Kars'ta yapılan bir çalışmada RBPT ile 338 (%46.95) serumda, SAT ile 382 (%53.89) serumda pozitiflik tespit edilmiştir [14]. Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde abort yapan sığırlarda *Brucella* seroprevalansını belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda, %55.2 [11] %33 [27] ve %6.25 [32] gibi çok geniş bir yelpazede seropozitiflik tespit edildiği rapor edilmiştir.

Laboratuvarımız verileri dikkate alındığında, 2007-2011 arasında yıllara bağlı sığırlarda *Brucella* seropozitifliği, dalgalı bir seyir göstermekle birlikte yaklaşık %25 civarındadır (Tablo 1). Enstitümüz sorumluluk alanındaki birçok ilde geçmiş yıllarda yapılan çalışmalar sığırlarda Brusellozun oldukça yaygın olduğunu göstermektedir. Kenar ve ark. [20], Kayseri, Niğde, Konya, Nevşehir illerinde *Brucella* seropozitifliğini %0.92-%24.15 arasında bir skalada bulduklarını bildirmişlerdir. Hodul ve Gümüşsoy [16], Kayseri-Develi ilçesinde sığırlarda %15, İnci ve ark. [18], Kayseri'de abort yapan sığırlarda %16.66 pozitiflik tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Apan ve ark. [5], Kırıkkale ve çevresinde sığırlarda %2.67 olduğunu bildirirken, aynı bölgede Öcal ve ark. [23] süt sığırlarında Bruselloz oranının %19 olduğunu rapor etmiştir. Aşkar ve ark. [6], Kırıkkale ve çevresinde süt sığırlarının %43'ünde *Brucella* seropozitifliği belirlediklerini bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda İç Anadolu Bölgesi'ndeki sığır Brusellozunda antikor pozitifliğinin %0.92-%43 gibi geniş bir yelpazede bulunduğu görülmektedir. 1998 ve 2011 yılları surveylans ve Enstitümüz 2007-2011 sonuçları, Zonguldak ilinin, *Brucella* yönünden risk taşımadığını göstermektedir.

1998 yılında Bakanlık tarafından yurt genelinde yürütülen serosurveylansta Enstitümüze bağlı illerde %0-%7.6 (Tablo 3), 2011'de ise %0-%9.1 bulunmuştur. Serosurveylans sonuçları ile karşılaştırıldığında, laboratuvarımız 2007-2011 verilerinde tespit edilen oranın yüksek olmasının; gönderilen sığır serum örneklerinin atık yapan hayvanlara ve atık yapan sürülerde barındırılan ve risk altında olduğu düşünülen sığır sürülerinden alınmış olması kaynaklı olduğu düşünülmüştür.

Tablo 3. 1998 ve 2011 Sığır Bruselloz Sero-Surveylans Sonuçları [17,31]

İL	1998 Surveylans		2011 Surveylans	
	Serum Sayısı	(% Pozitif)	Serum Sayısı	(% Pozitif)
ANKARA	467	(%1.1)	247	(%0.8)
BOLU	456	(%0.2)	184	(%0.5)
ÇANKIRI	447	(%0.0)	280	(%5.4)
ÇORUM	462	(%0.6)	180	(%6.1)
ESKİŞEHİR	460	(%7.6)	317	(%2.2)
KASTAMONU	461	(%0.2)	219	(%0.0)
KAYSERİ	439	(%2.1)	187	(%9.1)
KIRŞEHİR	455	(%1.1)	206	(%1.9)
NEVŞEHİR	420	(%0.2)	207	(%2.9)
YOZGAT	467	(%0.9)	163	(%5.5)
ZONGULDAK	291	(%0.2)	120	(%0.0)
KIRIKKALE	452	(%0.2)	172	(%1.7)
BARTIN	459	-	148	(%0.0)
KARABÜK	442	(%0.0)	163	(%0.6)

Bu yayındaki sonuçların, Enstitümüzün görev yaptığı iller bazında yetiştirilen sığırların *Brucella* antikorları açısından değerlendirilmesi niteliğinde olup, bundan sonra yapılacak çalışmalara retrospektif bir bakış açısı kazandıracığı düşünülmüştür.

Teşekkür

Laboratuvarımız Teknikeri Ali Aykut TEKİN ve Biyolog Züleyha ERGÜN'e laboratuvar çalışmalarındaki yardımlardan dolayı teşekkürü bir borç biliriz.

Kaynaklar

1. Akbarmehr J, Ghiyamerad M, (2011). *Serological survey of brucellosis in livestock animals in Sarab City (East Azarbaijan province), Iran*. African J of Microbiol Res. 5(10), 1220-1223.
2. Al-Ani FK, El-Qaderi S, Hailat NQ, Razziq R, Al-Darraj AM, (2004). *Human and animal brucellosis in Jordan between 1996 and 1998: a study*. Revue Sci Tech (International Office of Epizootics). 23(3):831-840.
3. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM, (1988). *Techniques for the brucellosis laboratory INRA*, Paris, pp. 13-60.
4. Anon (2009). Bovine Brucellosis. Erişim: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCCELL.pdf. Son Erişim Tarihi: 03.05.2014.
5. Apan T, Yıldırım M, İstanbulluoğlu E, (2007). *Seroprevalence of brucellosis in human, sheep, and cattle populations in Kırıkkale (Turkey)*. Turk J Vet Anim Sci. 31(1), 75-78.
6. Aşkar Ş, Mumcu F, Ünal N, Yıldırım, (2013). Kırıkkale ve Yöresindeki Süt Sığırı ve Koyunlar ile Bunların Yetiştiricilerinde *Brucella* Antikoru Varlığının Araştırılması. YYU Vet Fak. Derg, 24 (3), 113-116. *Brucellosis'in sero-epidemiolojisi*. Pendik Vet Mikrobiyol Derg. 27, 79-100.
7. Corbel MJ, (1997). *Brucellosis in overview. 1st International Conference on Emerging Zoonoz Jarussalem*. Emerg Infect Dis. 3, 213-221.
8. Demirözü K, Çelik M, İyisan S, Özdemir Ü, Erdenliç S, (1996). *Trakya bölgesindeki Brucellosis'in sero-epidemiolojisi*. Pendik Vet Mikrobiyol Derg. 27, 79-100.
9. Erdoğan İ, Gürel A, Tekin C, Uyanık F, Bitgel A, (1993). *Trakya bölgesinde koyun, keçi ve sığırlarda bakteriyel abortların tesbiti ve dağılımı*. Pen Vet Mikrobiyol Derg. 24, 23-35.
10. Fatma HMA, Mahdey EA, (2010). *Incidence of Brucella Species in Slaughtered Food Animals and its Edible Offal at Beni-suef, Egypt*. Global Veterinaria . 5 (5), 248-254.
11. Genc O, Otlu S, Sahin M, Aydın F, Gokce HI, (2005). *Seroprevalence of brucellosis and leptospirosis in aborted dairy cows*. Turk J Vet Anim Sci. 29, 359-366.
12. Godfroid J, Käsbohrer A, (2002). *Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century*. Vet Microbiol. 90, 135-145.
13. Gökçen S, Eskiismirli S, (1998). *Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'ne 1988-1997 Yılları Arasında Ege Bölgesi İllerinden Gönderilen Sığır, Koyun Ve Keçi Kan Serumlarında Brucella Pozitiflik Oranı*. Bornova Vet Kont Enst Derg. 23, 1-10.
14. Güllüce M, Leloğlu N (1993). *Kars ve çevresinde sığır serumlarında brucella antikorlarının araştırılması için ELISA ve diğer metotların karşılaştırılması*. Vet Hekim Derg. 64, 27-34.

15. Hayvan Hastalıkları ve Zararlıları ile Mücadele Programı, Sığır ve Koyunlarda Brucella, (2013), TC Gıda Tarım ve hayvancılık Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, 49-51, Ankara.
16. Hodul M, Gümüşsoy KS, (2009). *Develi Yöresinde Sığır Brusellozunun Serolojik Testlerle (RBPT, SAT, C-ELISA, CFT) Teşhisi*. Erciyes Üniv Sağlık Bil Derg. 18(3), 167-174.
17. İyisan AS, Akmaz O, Duzgun SG, Ersoy Y, Eskiizmirliler S, Guler L, Gunduz K, Isik N, İcyerioglu AK, Kalender H, Karaman Z, Kucukayan U, Ozcan C, Seyitoglu S, Tuna I, Tunca T, Ustunakin K, Yurtalan S, (2000). *Türkiye’de sığır ve koyunlarda Brucellosis’in seroepidemiolojisi*. Pen Vet Mikrobiyol Derg. 31, 21- 75.
18. İnci A, Aydın N, Babür C, Çam Y, Akdoğan, C, Kuzan Ş, (1999). *Kayseri yöresinde sığır ve koyunlarda Toksoplazmozis ve Brusellozis üzerine seroepidemiolojik araştırmalar*. Pen Vet Mikrobiyol Derg. 30 (1), 41-46.
19. İyisan S, (2006). Hayvanlarda brusellosisin epidemiyolojisi. I. Ulusal Zoonoz Kongresi, TOOB Konferans Salonu, Ankara.
20. Kenar B, Kuyucuoglu Y, Seker E, Kose Z, *Studies on the abortions from dairy farms in Afyonkarahisar*. Proceedings of VIII. National Congress of Veterinary Microbiology, Van-Turkey, pp. 114-115, 2008.
21. Mailles A, Rautureau S, Le Horgne JM, Poignet-Leroux B, d’Arnoux C, Denetiere G, Faure M, Lavigne JP, Bru J P, Garin-Bastuji B, (2012). *Re-Emergence of Brucellosis in Cattle in France and Risk For Human Health*. Euro Surveill. 26;17(30). pii: 20227.
22. Mitrov D, Naletoski I, Kirandziski T, Dzadzovski I, Krstevski K, Acevski S, (2010). *Seroprevalence of Cattle Brucellosis in the Republic of Macedonia (2005-2009)*, Macedonian J Med Sci. 3(3), 233-238.
23. Öcal N, Babür C, Yağcı BB, Macun HC, Çelebi B, Kılıç S, Pir-Yağcı İ, (2008). *Kırıkkale Yöresinde Süt Sığırlarında Brusellozis, Listeriozis ve Toksoplazmozis’in seroprevalansı ve birlikte görülme sıklığı*. Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 14 (1), 75-81.
24. Pehlivanoğlu F, Öztürk D, Günlü S, Güldah Y, Türütoğlu H, (2011). *Prevalence of Brucellosis in Dairy Herds with Abortion Problems*. Kafkas Üniv Vet Fak Derg, 17 (4), 615-620.
25. Radostitis OM, Blood DC, Gay CC, (1994). *Veterinary Medicine* 8th edition, Bailliere Tindall Ltd. London pp: 787-813.
26. Refai M, (2002). *Incidence and control of brucellosis in the Near East Region*. Vet Microbiol. 90, 81 -110.
27. Sahin M, Atabay Hi, Otlu S, Unver A, Celebi O, (2004). *Serological and cultural investigation of the prevalence of brucellosis in cattle, sheep and humans in Kars and its surrounding area*. Proceedings of VI. National Congress of Veterinary Microbiology. Elazığ-Turkey, pp. 132-133.
28. Sahin M, Genc O, Unver A, Otlu S, (2008). *Investigation of bovine brucellosis in the Northeastern Turkey*. Trop Anim Health Pro, 40, 281-286.
29. SANCO, 2001. *European commission scientific committee on animal health and animal welfare, Brucellosis in sheep and goat*. C2/AH/R23/2001
30. SANCO/11482/2014. *European Commission Health & Consumers Directorate-General. Report Of The Meeting Of The “Bovine, Sheep And Goats Brucellosis” Sub-Group Of The Task Force For Monitoring Disease Eradication*.
31. Sayı O, (2013). *Sığır ve Koyun Abortlarından Brucella spp. İzolasyonunda Farklı Selektif Besiyerlerinin Karşılaştırılması*. Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
32. Solmaz H, Tütüncü M, Gülhan T ve Ekin İH, Taşal İ, (2002). *Van yöresi süt sığırlarında brusellozis’in insidansı üzerine incelemeler*. Yüzüncü Yıl Üniv Vet Fak Derg. 13, 54-56.
33. Taleski V, Zerva L., Kantardjiev T, Cvetnic Z., Erski-Biljic M, Nikolovski B, Bosnjakovski J, Katalinic-Jankovic V, Pante liadou A, Stojkoski S, Kirandziski T, (2002). *An overview of the epidemiology and epizootiology of brucellosis in selected countries of Central and Southeast Europe*. Vet Microbiol. 90,147- 155.
34. Türütoğlu H, Mutluer B, Uysal Y, (2003). *Burdur yöresinde toplanan sütlerin Brucella*
35. WHO (1999). *Human And Animal Brucellosis. Epidemiological Surveillance in the MZCP Countries*. MZCP/Bruc/98.1. Report of a WHO/MZCP Workshop, Damascus, Syrian Arab Republic, 4 - 5 May 1998.
36. Yazıcıoğlu N (2012). *Brucella Eradikasyon Programı*. IV. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu (Gıda Kaynaklı Zoonozlar), Sempozyum kitabı, 99-106.

Koyunlarda Tularemi'nin serolojik olarak incelenmesi ve *Brucella* ile çapraz reaksiyonunun belirlenmesi

Derya KARATAŞ YENİ¹, Müjgan İZGÜR²

¹ Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Md. Bakteriyolojik Teşhis Laboratuvarı, Ankara

² Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 24.01.2015, Kabul Tarihi / Accepted: 27.07.2015

Özet: Bu çalışmada önemli bir zoonoz enfeksiyon olan Tularemi'nin tespiti için koyunların serolojik olarak incelenmesi ve *Brucella* ile çapraz reaksiyonunun belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada, Tularemi enfeksiyonunun insanlarda endemik olarak görüldüğü ve son çalışmalarda yaygın olduğu tespit edilen bölgelerden (Ankara; Altındağ, Beypazarı, Bursa; Kemalpaşa, Zonguldak; Kurtköy) koyun kan serumları toplandı. Bu serumlardaki Tularemi antikor varlığını belirlemek için safranin-O ile boyalı *Francisella tularensis* subsp. holartica LVS suşundan hazırlanmış antijeni (*F. tularensis* 10857 NTCC) ile mikroaglutinasyon testi yapıldı. Test sonucunda incelenen 207 koyun kan serumundan 50'sinde (%24.1) 1:10-1:80 arasında titre saptanırken 157 (%75.9) serumda *F. tularensis* özgül antikorlar belirlenemedi. *F. tularensis* antikorları pozitif bulunan 50 serumun 36 (%72)'sında ise hayvanlar da Tularemi için çeşitli araştırmalarda pozitif kabul edilen $\geq 1/20$ titresi tespit edildi. Titre veren 50 serumdan 6'sında ise, *Brucella* Mikro Aglutinasyon Test (MAT) antijeni (*B. abortus* S99 suşu safranin- O ile boyalı) ile çapraz reaksiyon (1:40-1:160) varlığı saptandı.

Anahtar kelimeler: *Brucella* spp, Çapraz Reaksiyon, Koyun, Seroloji, Tularemi.

Determination of the cross reaction of Tularemia titer and *Brucella* on sheep at specific disease focus in Turkey

Abstract: As Tularemia is an important zoonosis infection the determination of Tularemia titer serologically on sheep and its cross reaction with is aimed in this study. For this study sheep blood sera collected from the regions (Ankara; Altındağ-Beypazarı, Bursa; Kemalpaşa, Zonguldak; Kurtköy) where Tularemia infection is seen endemically and widespread. In order to indicate Tularemia titer in these sera Tularemia antibody, which is painted with safranin-O, and microagglutination test were done. 207 sheep blood sera were checked and at test result 1:10-1:80 titer indicated in 50 blood sera (%24,1) but it wasn't indicated any titer in 157(%75,9) sera. In 36 serum from 50, in which titer indicated, $\geq 1/20$ titer, which is accepted in several studies positive for Tularemia was seen. It was seen cross reaction with *Brucella* in 6 blood sera from 50 in which titer indicated.

Key Words: *Brucella*, Cross reaction, Serology, Sheep, Tularemia.

Giriş

Tularemi, kemiriciler öncelikli olmak üzere, hayvanların bir patojeni olan insanlara da bulaşarak çeşitli klinik tablolara sebep olan *Francisella tularensis*'in etken olduğu zoonotik bir hastalıktır [4,10,9]. Ülkemizde son yıllarda pınar suları ile ilişkilendirilen salgınlara yol açması, dünya genelinde ise biyolojik silah olma özelliği nedeniyle güncelleşmiştir [3,7].

Tularemi hastalığı, *F. tularensis*'in etken olduğu kuzey yarım kürede görülen bir zoonoz hastalıktır. Hastalık Japonya ve Rusya'da 1800'lü yıllarda bilinmesine rağmen, 1911 San Francisco depremin-

den sonra McCoy tarafından Kaliforniya'nın Tulare bölgesinde sincaplarda görülen veba benzeri bir hastalık olarak tanımlanmıştır [14].

Dünyada ve ülkemizde riskli bölge yerleşim birimi hızla artan ve güncelliğini koruyan bu hastalığın rezervuarı tam olarak bilinmemektedir. Son yıllarda ülkemizde tularemi vakalarında artış olmasında, iklim değişikliklerin büyük oranda rol oynadığı bildirilmektedir [12]. Yağışlı sezonlardan sonra kemirici popülasyonundaki artışın tularemi vaka sayısının artmasına neden olduğu düşünülmektedir [1]. Tularemi, 2005 yılı öncesinde Marmara ve Batı Karadeniz Bölgelerinde yaygın olarak görülen, 2009-2010 yıllarının ilk yarısında özellikle

İç Anadolu Bölgesi olmak üzere diğer bölgelerden yeni vakalar bildirilmiştir [1]. Kemirici hayvanların çıkartıları ve dokularıyla temas, kontamine su ve gıdaların tüketilmesi avcılık ve vahşi tavşan etinin yenmesi, hijyenik olmayan gıdaların tüketilmesi, ev ve çevresinde kemirici sayısında belirgin artış gözlenmesi ile doğayla ilişkili aktiviteler gibi bağımsız değişkenler hastalığın epidemiyolojik risk faktörleri arasında yer almasına neden olmuştur [1].

Tularemi keskin tanı bakterinin çeşitli örneklerden izolasyonu ile konur. Ancak üretmek için özel besiyeri gerektiğinden tanı daha çok serolojik olarak konur.

Evcil hayvanlar arasında koyunlar tularemiye duyarlıdır, ancak hastalık kedi, tavşan, köpek, domuz ve atlarda da bildirilmiştir. Sığırların ise genellikle hastalığa karşı dirençli olduğu bilinmektedir. Enfeksiyonun prevalansını belirlemeye yönelik, evcil hayvanlarda klinik hastalıkların sunumu ve prevalansına dair bilgiler oldukça kısıtlıdır [13].

Tularemi tanısında en sık kullanılan yöntemler hasta serumunda antikor aramaya yönelik aglütinasyon (mikropleyt aglütinasyon testi veya tüp aglütinasyonu) ve ELISA'dır. Tularemi antikorları genellikle ikinci haftadan sonra pozitifleşir, 4-5. haftalarda en yüksek düzeye ulaşır [8].

Tularemi antikorları *Brucella*, *Yersinia* ve *Proteus OX19* ile çapraz reaksiyon verebilir. *Brucella* spp. ile *Francisella tularensis* arasında ortak antijenik yapılar nedeniyle serolojik testlerde çapraz reaksiyonların varlığı tularemi hastalığının ilk tanımlandığı yıllarda dikkat çekmiştir [6,8,15]. Hayvanlar üzerinde tularemi yönüyle yapılan çalışmaların kısıtlılığı göz önüne alınarak, bu çalışmada Tularemiye duyarlılığı ile bilinen koyunların serolojik olarak incelenmesi ve *Brucella* ile *Francisella tularensis* arasındaki çapraz reaksiyonların sıklığının belirlenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metod

Bu çalışmada, Tulareminin tespiti için koyunların serolojik olarak incelenmesi ve *Brucella* spp. ile çapraz reaksiyonunun belirlenmesi amacıyla enfeksiyonun insanlarda endemik olarak görüldüğü ve son çalışmalarda yaygın olduğu tespit edilen bölgelerden

(Ankara; Altındağ, Beypazarı, Bursa; Kemalpaşa, Zonguldak; Kurtköy) toplamda 207 adet koyun kan serumu incelenmiştir. Koyunların vena jugularisinden 9 ml. lik vakumlu jelli tüplere kanlar alındı. Kan numuneleri, 1500 devirde 5 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serumlar 2 ml. lik tüplere aktarıldı. Bu serumlardaki Tularemi antikor varlığını belirlemek için safranin- O ile boyalı *Francisella tularensis* subsp. holartica LVS suşundan hazırlanmış antijeni (*F. tularensis* 10857 NTCC) ile mikroaglütinasyon testi yapıldı (kılıç çapraz reaksiyon). Her iki etkene karşı gelişen antikorları saptamak amacıyla MA testi için U-tabanlı mikropleytlere serum örneklerinin iki katlı seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Serum içermeyen son godeler ise antijen kontrol için kullanılmıştır. Godelerdeki serum dilüsyonlarının üzerine eşit miktarda boyalı antijenler eklenecek şekilde serum dilüsyonları elde edilmiştir. Mikropleytin üzeri kapakla kapatılarak 37°C'de nemli ortamda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Değerlendirme; pozitif ve negatif kontroller ile antijen kontrolüne göre yapıldı. Antijen-antikor kompleksinin dantela tarzında çökmesi ve süpernatantın tümüyle berrak olması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi. Açık kırmızı renkli dilüentin çevrelediği merkezde toplanmış düzgün kenarlı düğme şeklinde çökme negatif reaksiyon şeklinde değerlendirildi [8]. Çapraz reaksiyonları görmek amacıyla, çeşitli literatürlerde tularemi yönünden anlamlı kabul edilen 1/20 üzeri titre veren koyun kan serumu örneklerini, *Brucella* Mikro Aglütinasyon Teste tabi tutarak (*B. abortus* S99 suşu safranin O ile boyalı) çapraz reaksiyon yönünden incelendi (Tablo 1).

Bulgular

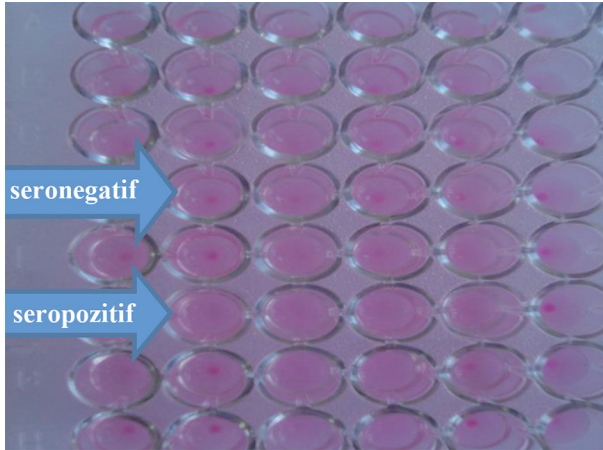
Tularemi açısından incelenen 207 koyun kan serumundan 36 (%17.3)'ünde çeşitli araştırmalarda hayvanlarda Tularemi için pozitif kabul edilen $\geq 1/20$ titresini belirledi. Toplanan 207 koyun kan serumunun titre dağılımı; 11'inde 1:10, 31'inde 1:20, 3'ünde 1:40 2'sinde 1:80 olarak saptandı (Tablo 2). Tularemi seropozitif 50 kan serumundan 6 (%12)'ünde 1:40-1:80 arasında titreler saptanmış, *Brucella* Mikro Aglütinasyon Test (MAT) antijeni (*B. abortus* S99 suşu safranin O ile boyalı) ile çapraz reaksiyon bulunmuştur (Tablo 2).

Tablo 1. Çalışmadaki koyunlarda belirlenen mikroaglutinasyon test yöntemi ile belirlenen tularemi titreleri sonuçları.

Yerleşim Birimi	Örnek Sayısı	Pozitif	Tularemi Seropozitif Titreleler							
			%	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640
Ankara/Altındağ	46	20	36.95	3	15	1	1	-	-	-
Ankara/Beyazır	101	17	16.83	7	10	-	-	-	-	-
Zonguldak/Kurtköy	20	1	5	1	-	-	-	-	-	-
Bursa/M.Kemal Paşa	40	12	30	3	6	2	1	-	-	-
Total	207	50	22.7	14	31	3	2	-	-	-

Tablo 2. Çalışmadaki koyunlarda Tularemi yönünden seropozitif titrelerin Brusella ile çapraz reaksiyon sonuçları.

Yerleşim Birimi	Örnek Sayısı	Tularemi Seropozitif Örnek Sayısı (>1/20)	Brusella ile çapraz reaksiyon veren örnek sayısı	1/40	1/80	1/160
Ankara/Altındağ	46	15	3	-	2	1
Ankara/Beyazır	101	10	1	1	-	-
Bursa/ M.Kemal Paşa	40	6	2	1	1	-
Total	207	31	6	2	3	1

**Şekil 1.** Mikroaglutinasyon test yönteminde *F. tularensis* seronegatif ve seropozitif görüntüsü

Tartışma

Tularemi enfeksiyonunun koyunlarda ve diğer yabani hayvanlarda serolojik olarak incelenmesi ve Brusella ile çapraz reaksiyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda farklı bulgular elde edilmiştir.

Gwatkin ve ark. [5], 1942 yılında yaptıkları bir çalışmada, 850 başlık bir koyun sürüsünü tularemi hastalığı yönünden takibe almışlardır. Bu sürüdeki 850 koyundan 24'ünün öldüğü, 5-6'sının ise hastalık sonunda iyileşmiş olduğunu görmüşler-

dir. İncelenen tüm hayvanlarda muayene sırasında çok yoğun kene enfestasyonu olduğu belirtilmiştir. Etkenin varlığını ortaya koymak için ölü koyunlardan 1 koyunda *F. tularensis* izolasyonu gerçekleştirilmişlerdir. Ayrıca iyileşen 2 koyundan serolojik olarak aglutinasyon teste tabi tutmuşlar, serolojik olarak incelemeye alınan 2 koyundan 1'inde 1/400 aglutinasyon titresi bulmuşlardır. Sürüyle ilgilenen bir çobanın hastalandığını, hastalanan çobanın hastalığından 8-9 gün öncesinde sürüdeki koyunlardan 3'ünü yzduğunun bilgisini almışlardır. Bu çalışmalar, tularemi hastalığında insanlarla koyunlar arası teması belirlemeye örnek teşkil etmiştir.

Şeyda [16], Kars Yöresinde 1600 koyuna ait kan serumu örneğinin mikroaglutinasyon yöntemiyle incelenmesi sonucu 50 hayvanda 1:20 titre üzerini seropozitif olarak bildirmiştir.

Jellison ve ark. [6], ABD'de yaptıkları bir çalışmada, 148 kuzuda %25 oranında *F. tularensis* yönünden seropozitiflik bulmuşlardır. Bu çalışmaya göre 1:20 ve üzeri titre veren kuzular *F. tularensis* seropozitif kabul edilmiştir. Aynı dönemde meradan dönen yetişkinler üzerinde de aynı çalışma yapılmış, 283 koyunda %28.3 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir. Çapraz reaksiyonun tespiti amacıyla, Tularemi seropozitif olan 83 koyunun Brusella titre tayininde ise yalnız bir koyunda Brusella yönünden seropozitif titre vermiştir.

Mathew ve ark. [11], ABD’de koyunlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, dokuz koyun, sekiz tavşan ve sekiz köpek tularemi hastalığı yönünden serolojik olarak incelenmişlerdir. Koyunlarda tamamında 1:40-1:320 arası titre verirken, aynı hayvanlara ait kan serumlarından Brusella ile çapraz reaksiyonu belirlemek amacıyla yapılan serolojik incelemede 7 hayvanda 1:40-1:160 arası titre izlenmiştir. Tavşanlarda yalnız üçünde 1:40 tularemi titresi verirken, Brusella yönünden titre saptanmamıştır. Köpeklerde ise yedisinde 1:40-1:160 tularemi titresi vermiş, Brusella çapraz reaksiyon titresi 6 sında 1:40 oranında saptanmıştır.

Berrada ve ark. [2], Tularemi enfeksiyonun hayvanlarda serolojik çalışmalar yapmışlardır. Bunlardan geyik, köpek, rakun, rat, kokarcada çeşitli yüzdelerde tularemi seropozitiflik saptanırken, tavşan fare ve sincapta tespit edilmemiştir. En yüksek seropozitiflik yüzdeleri kokarca ve rakunlarda belirlenirken, sadece 1 kokarcada ise yüksek oranda tularemi ve aynı zamanda Brusella titresi saptanmıştır.

Sonuç

Tularemi hastalığının epidemiyolojisinde, koyunlarda seropozitifliğin belirlenmesi önemli bir kriterdir. İnsanlarla hayvanlar arası teması belirleme amacıyla, insan salgınlarının olduğu bölgelerde, hastalığa en çok duyarlı olduğu bilinen koyunlarda seroprevalans çalışmalarının insan hayvan odaklı paralel olarak yürütülmesi gerekmektedir. Ayrıca sıklıkla görülen Bruselloz hastalığı ile ayırıcı tanısının yapılabilmesi için, Tularemi yönünden seropozitiflik saptanan yerleşim birimlerinin Brusella ile çapraz reaksiyon verebileceği göz önünde bulundurularak incelenmelidir. Ayrıca, her iki etkene karşı aglütinlerin saptandığı durumlarda hangisinin çapraz reaksiyon hangisinin gerçek pozitiflik olduğunun gösterilmesi için antikor titre artışının da araştırılması gereklidir [8]. Bundan sonraki çalışmalarda pilot bölgelerin seçilerek, periyodik yoklamaların yapılması, özellikle bu çalışmada da görüldüğü üzere, çapraz reaksiyon veren enfeksiyonlar yönüyle de incelenmesinin, hastalığın seroepidemiolojisine ışık tutacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. **Anonim**, (2011). *T.C. Sağlık Bakanlığı, Tularemi Hastalığının Kontrolü İçin Saha Rehberi*, Ankara.
2. **Berrada Z L, Goethert H K, Telford S R**, (2006). *Raccoons and Skunks as Sentinels for Zoonotic Tularemia*. *Emerg Infect Dis*, 12(6), 1019-1021.
3. **Çelebi B, Selçuk KILIÇ, Murat YEŞİLYURT, Bülent ACAR**, (2014). *Francisella tularensis’in Moleküler Tanısında Yeni Geliştirilen Kullanıma Hazır Ticari PCR Kitinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi*. *Mikrobiyol Bul*, 48(1), 135-142.
4. **Ellis J, Oyston PC, Green M, Titball RW**, (2002). *Tularemia*. *Clin Microbiol Rev*, 15(4), 631-46.
5. **Gwatkin R, Painter R H, Moynihan I W**, (1942). *Tularemia in Sheep*. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 6,163-168.
6. **Jellison Wl, Kohls Gm**, (1950). *Persistence of agglutinins against Pasteurella tularensis in serums of naturally infected sheep*. *J Am Vet Med Assoc*, 117(884),405-408.
7. **Kılıç S**, (2006). *Bacteria As Agents of Biological Weapons: "Category A Agents"*. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 63(1), 21-46.
8. **Kılıç S, Çelebi B, Bayram Y, Çitil B**, (2013). *Francisella tularensis antikorları ile Brucella çapraz reaksiyonlarının araştırılması*. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 70(2), 65-70.
9. **Kilic S, Celebi B, Acar B, Ataş M**, (2013). *In vitro susceptibility of isolates of Francisella tularensis from Turkey*. *Scand J Infect Dis*, 45(5),337-41.
10. **Kilic S**, (2013). *Epidemiological Characteristics of Tularemia in Turkey*. *International Symposium on Francisella tularensis and Tularemia*, 19-23 June, Urgup, Nevşehir, Turkey.
11. **Matthew L, Clifford M, H Donald**, (1978). *A Serological Study of Tularemia in Domestic Animals and the Potential Threat to Humans*. *Ohio j Sci*, 78(2), 92.
12. **Olgen K, Kilic S, Kurtcebe O, Celebi B, Torunoglu M A, Doganay M**, (2013). *Effects of Climate Variability on Tularemia Outbreaks in Turkey: A preliminary Study*. (Poster presentation no: 019) *International Symposium on Francisella tularensis and Tularemia*. 19-23 June, Urgup, Nevşehir, Turkey.
13. **Otlı S**, (2009). *Hayvanlarda Tularemi araştırmaları ve dünyadaki durum*. In: *Francisella tularensis ve Tularemi*. Ed.: Gürcan Ş, *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 161-168.
14. **Sjöstedt A**, (2007). *Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations*. *Ann NY Acad Sci*, 1105, 1-29.
15. **Şeyda T**, (1996). *Kars Bölgesinde Koyunlarda Tularemi Enfeksiyonunun İnsidensi Üzerinde Serolojik ve Kültürel Çalışmalar*. Doktora Tezi, Kafkas Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Ratlarda diyete eklenen borun kan bakır ve seruloplazmin düzeylerine etkileri

Pınar BULUZ¹, Nuri Başpınar¹, Pınar Peker Akalın², Selçuk PEKKAYA³

¹ Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Konya

² Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Hatay

³ Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Md. Biyokimya Laboratuvarı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 08.12.2014, Kabul Tarihi / Accepted: 09.07.2015

Özet: Bu çalışmada; diyete eklenen borun plazma bakır ve seruloplazmin düzeylerine etkileri araştırıldı. Çalışmada 8 haftalık 200-250 g canlı ağırlıkta erişkin, 36 adet erkek Sprague-Dawley ırkı rat kullanıldı. Ratlar 22±3°C de 12:12 saat aydınlık-karanlık siklusunda tutularak standart rat yemi ve su ile ad libitum beslendi. Ratlar kontrol, deneme 1 (D1), deneme 2 (D2) olmak üzere 12'şerli 3 gruba ayrıldı. Standart rat yemi öğütüldü; D1 grubuna 50 ppm, D2 grubuna 100 ppm bor olacak şekilde sodyumtetra borax ilave edilip karıştırıldı ve tekrar pellet haline getirildi. Üç aylık deneme süresince 3 haftada bir ratların canlı ağırlıkları tartılıp kuyruk venasından heparinli polietilen tüplere alınan kan örneklerinde plazma seruloplazmin ve bakır analizleri yapıldı. Çalışmada kontrol ve deneme grupları plazma bakır konsantrasyonlarının zamanla değiştiği (P<0,001), ancak gruplar arası farkın önemsiz (p>0,05) olduğu belirlendi. Örneklemeye zamanına göre seruloplazmin düzeylerindeki değişimler, bakır düzeylerindeki değişimlerle paralellik göstermekle birlikte deneme grupları plazma seruloplazmin düzeyleri kontrole göre daha düşük olup, gruplar arası fark önemli (P<0,05) bulundu. Sonuç olarak; borun plazma bakır düzeylerini etkilemeksizin seruloplazmin düzeylerini düşürdüğü; bu sebeple borun, seruloplazmin sentezini azaltarak ya da seruloplazminin yapısına bakırın bağlanmasını engelleyerek etkili olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Bor, Seruloplazmin, Bakır

Effects of dietary boron on blood ceruloplasmin and copper levels in rats

Summary: In this study, effects of bor supplementation of diet on plasma copper and ceruloplasmin levels were investigated. Eight weeks old, male Sprague-Dawley (n=36, 200-250 g) rats were used. They were maintained in a temperature-controlled room (22°C± 3) in a 12:12 h light-dark cycle. Food (Purina rat chow) and water was provided ad libitum. Rats were divided into 3 groups as Control, Experimental 1 (E1) and Experimental 2 (E2), including 12 animals of each. Fifty (E1) and 100 ppm (E2) bor was added into the ration for 3 months. Blood samples were collected from the tail vein once with a 3 weeks interval and transferred into heparinized tubes for the determination of ceruloplasmin and copper levels. Body weight of each rat was also recorded at the same time points. Plasma copper levels in Control and Experimental groups changed significantly by time (P<0,001), but the difference between the groups were not statistically significant (p>0,05). Plasma ceruloplasmin levels decreased in groups E1 and E2 (P<0,05) compared to the control group. It was concluded that, bor might reduce plasma ceruloplasmin levels without any effect on copper, probably by decreasing synthesis of ceruloplasmin or preventing the copper content of ceruloplasmin.

Key Words: Bor, Ceruloplasmin, Copper

Giriş

Bor yarımetal ve yarı iletken bir element olup periyodik cetvelin 13. grubunda yer alır. Dünyada az bulunan elementlerdendir ve borik asit ve boraks gibi bileşiklerle birlikte bulunur. Borun hayvan ve insan beslenmesinde esansiyel olduğu; mineral metabolizması, beyin fonksiyonları, hormon regülasyonu,

osteoporoz ve osteoartritiste önemli olduğu ileri sürülmektedir [8,19,23,25]. Borun, leptin, insülin, glikoz düzeylerini düşürdüğü, T3 hormon düzeylerini yükselttiği bildirilmiştir [17]. Bor, cis-hidroksil grubu taşıyan organik bileşiklerle, şekerler, polisakaritler, adenozin 5 fosfat, pridoksin, riboflavin, dehidroaskorbik asit, piridin nükleotidleri, fosfoinoziditler, glikoproteinler ve glikolipidler ile kompleks

oluşturabilmektedir [3]. Bor yetersizliğinde mineral metabolizması, algılama fonksiyonları ve kemik yoğunluğu bozulmakta ve vitamin düzeyleri değişmektedir [8,19,23,25]. Bor toksikasyonu üreme sistemini etkilemektedir. Burukoğlu ve Bayçu [5], 70 gün süreyle içme sularında 300 mg/L boraks verilen ratlarda 70. gün sonunda spermatogoniumlarda vakuolizasyon ve rezidüel yapıların sayıca arttığını gözlemlemiştir. Ayrıca yüksek dozda borun böbrek ve testislerde hasara neden olduğu da bildirilmiştir [22].

Borun enerji metabolizmasıyla ilgili olmak üzere 26 enzimin aktivitesinde etkili olduğu ileri sürülmektedir [14]. İnsanlarda bor ilavesi bakır ve bakıra bağımlı enzimlerin seviyelerini etkiler. Diyetle 0,25 mg B/2000 kcal/gün düşük borla 63 gün süreyle beslenen 45 yaş üstü 5 erkek ve menapoz sonrası östrojen tedavisi gören 5 kadında eritrosit süperoksit dismutaz, serum seruloplazmin ve plazma bakırının yükseldiği [25], menapoz sonrası bor ilavesinin östrojen ve testosteron konsantrasyonlarını artırdığı bildirilmektedir [22].

Ratlarda diyetle alınan borun; kardiyak bakır, kalsiyum, manganez, molibdenum ve fosfor konsantrasyonlarını etkilediği bildirilmiştir [15].

Bakır oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında görev alan bazı metalloenzimlerin fonksiyonları için gerekli olan bir eser elementtir. Bu enzimlerin en önemlileri seruloplazmin, sitokrom C oksidaz, süperoksit dismutaz (SOD), askorbat oksidaz, lizil oksidaz, tirozinaz [6,21], katalaz, ürikaz, delta amino levülinik asit dehidrat (ALA-D), bağ dokusunda amino oksidaz, dopamin beta hidrosilaz ve mono amin oksidaz (MAO)'dır [4,28]. Seruloplazmin, molekül ağırlığı 132 000 olan, her bir molekülünde 6 bakır atomu içeren ve % 7-8'i karbonhidrat olan bir glikoproteindir. Yapısındaki karbonhidrat içeriğini sialik asit oluşturur [1,8]. Başlıca karaciğerde sentezlenen seruloplazmin aynı zamanda inflamasyon ve doku hasarı gibi durumlarda ılımlı yanıt gösteren bir akut faz proteinidir [10,18]. Seruloplazmin, organizmada antioksidan olarak da görev yapmaktadır. Yara, infeksiyon, inflamasyon boyunca seruloplazmin aktivitesindeki artış, serum seruloplazmininin bir akut faz reaktanı ve bir antioksidan gibi hareket ettiğini göstermektedir [9,11]. Bor, seruloplazmin düzeylerinin arttığı

inflamasyonda, immün sistem hücrelerince salınan serin proteazlarını baskılayarak, lökotrien sentezini inhibe eder ve reaktif oksijen türlerini azaltır. İnsanlarda oral bor uygulaması sonrasında, yapısında bakır bulunan δ -Amino Levülinik Asit Dehidrat (ALA-D) ve eritrosit SOD'ın plazma düzeyleri azalmakta, ayrıca bor, menapoz sonrası kadınlarda bakır, seruloplazmin ve östradiol düzeylerini etkilemektedir [13]. Önemli iz elementlerden biri olan bakır seruloplazminin yapısına katılarak kana salınır. Seruloplazmin antioksidan savunma, demir metabolizması, bakır taşınması, koagülasyon ve angiogenesisinde de etkilidir [10,18].

Yapılan literatür taramalarında ratlarda rasyonla alınan bor ile plazma bakır ve seruloplazmin düzeyleri arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sebeple bu çalışmada ratlarda farklı dozlarda diyetle katılan borun, plazma bakır ve seruloplazmin düzeylerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmada 8 haftalık 200-250 g canlı ağırlıkta erişkin, 36 adet erkek Sprague-Dawley ırkı rat kullanıldı. Ratlar $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ de 12:12 saat aydınlık karanlık siklusunda tutularak standart Purina rat yemi (Optima Besin Maddeleri San. Ve Tic. A.Ş.) ve su ile deneme öncesinde 1 hafta boyunca ad libitum beslendi.

Ratlar kontrol, deneme 1 (D1) ve deneme 2 (D2) olmak üzere 12'şerli 3 gruba ayrıldı. Her 3 gruba standart rat yemi öğütülerek D1 grubuna 50 ppm, D2 grubuna 100 ppm bor olacak şekilde sodyumtetra borat dekahidrat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ M=381 379 g/mol, Merck A716303 %99,0-103,0) ilave edilip karıştırıldı ve tekrar pellet haline getirildi. Pelletler etüvde kurutuldu ve ratlara verildi.

Üç aylık deneme süresince 3 haftada bir ratların canlı ağırlıkları tartılıp kuyruk venasından heparinli (sodyum içerikli Nevparin 5000 IU/ml) polietilen tüplere alınan kan örnekleri 3000 g'de 10 dk'da santrifüj edilerek plazmaları çıkarıldı, seruloplazmin ve bakır analizleri için -20°C 'de saklandı.

Plazma Seruloplazmin Analizi

Optimum pH ve ısı koşullarında asetat tamponunda hazırlanan P-fenilen diamin diklorid (PPD) plazma

örnekleri ile inkube edildiğinde oluşan renkli ürünün absorbanansı spektrometrede 546 nm’de okundu ve okunan absorbanstan seruloplazmin konsantrasyonları Colombo ve Richerich [7]’in formülüne göre hesaplandı.

Bakır Analizi

Standart ve test örneklerindeki bakır düzeyleri Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre ile ölçüldü.

İstatistiksel Değerlendirme

Sonuçların istatistiksel değerlendirmeleri SPSS paket programı kullanılarak; gruplar arası farklar ANOVA ve Duncan testleriyle tespit edilmiştir.

Bulgular

Çalışmada elde edilen bakır, seruloplazmin düzeyleri ile ilgili sonuçlar tablo 1, 2 ve canlı ağırlıktaki değişimler tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 1. Kontrol ve deneme grupları plazma bakır düzeyleri (n=12, Ort±SH)

Gruplar	Bakır (µg/dl)					p
	Başlangıç	3.hafta	6.hafta	9.hafta	12.hafta	
Kontrol	124,2±0,006 ^{ax}	85,2±0,006 ^{bc}	93,9±0,005 ^{bc}	74,4±0,05 ^c	95,3±0,003 ^b	**
Deneme 1	97,9±0,006 ^{ay}	93,0±0,003 ^a	92,8±0,003 ^a	63,8±0,002 ^b	90,2±0,005 ^a	**
Deneme 2	87,8±0,005 ^{by}	127,8±0,012 ^a	88,3±0,004 ^b	76,0±0,005 ^b	91,9±0,004 ^b	**
p	*	-	-	-	-	

**p<0.001, * : p<0.05, - : Önemsiz

a, b, c: Aynı satırda farklı harfler birbirinden istatistiki açıdan önemlidir.

x, y: Aynı sütunda farklı harfler birbirinden istatistiki açıdan önemlidir.

Tablo 2. Kontrol ve deneme grupları plazma seruloplazmin düzeyleri (n=12, Ort±SH)

Gruplar	Seruloplazmin (mg/dl)					p
	Başlangıç	3.hafta	6.hafta	9.hafta	12.hafta	
Kontrol	68,5523±5,04 ^a	65,3725±4,26 ^{ab}	61,8965±4,07 ^{abx}	43,3315±4,22 ^c	55,2013±2,41 ^{bx}	**
Deneme 1	57,196±5,61 ^a	52,614±3,96 ^{ab}	49,7305±2,62 ^{aby}	45,1683±3,84 ^{ab}	42,7785±3,07 ^{by}	*
Deneme 2	59,487±3,32 ^{ab}	67,071±8,81 ^a	51,7648±3,36 ^{bcy}	36,972±3,51 ^c	44,9115±4,1 ^{bcy}	**
p	-	-	*	-	*	

** : p<0.001, * : p<0.05, - : Önemsiz

a, b, c: Aynı satırda farklı harfler birbirinden istatistiki açıdan önemlidir.

x, y: Aynı sütunda farklı harfler birbirinden istatistiki açıdan önemlidir.

Tablo 3. Kontrol ve deneme grupları canlı ağırlık değerleri (n=12, Ort±SH)

Gruplar	Canlı Ağırlık (g)					p
	Başlangıç	3.hafta	6.hafta	9.hafta	12.hafta	
Kontrol	207,67±5,10 ^a	248,25±3,44 ^b	276,50±3,03 ^c	306,75±4,35 ^d	324,4167±5,2 ^e	*
Deneme 1	206,17±4,48 ^a	245,42±4,42 ^b	270,67±6,4 ^c	300,58±6,94 ^d	322,83±10,48 ^e	*
Deneme 2	208,83±5,27 ^b	242,42±5,29 ^b	273,92±5,68 ^b	301,25±6,06 ^a	315,83±4,71 ^a	*
p	-	-	-	-	-	

* : p<0.001, - : Önemsiz

a, b, c, d, e: Aynı satırda farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir.

Tartışma ve Sonuç

Sunulan çalışma canlı ağırlıklardaki değişim yönünden incelendiğinde (Tablo 3) kontrol grubunda başlangıç canlı ağırlıkları 207,67± 5,1 g’den 324,42±

5,2 g’a (fark 116,75 g), deneme 1’de 206,17± 4,5 g’dan 322,83 ± 10,5 g’a (fark 116,66 g), deneme 2’de 208,83± 5,3 g’dan 315 ± 4,7 g’a (fark 107 g) yükselmiştir. Deneme sonunda canlı ağırlık düzeyleri arasındaki farklılık önemsiz olmakla birlikte bor

düzeyleriyle ilişkili olarak düşmüştür. Küçükkurt ve ark [17], Sprague Dawley ratlarda 100 mg B/kg dozda 28 gün boyunca diyetle eklenen borun 28 günün sonunda canlı ağırlığı düşürdüğünü bildirmişlerdir. Weir ve Fisher [24], günlük; 2,6; 8,8; 26,3; 87,5 ve 263 mg bor/kg canlı ağırlık olacak şekilde 90 gün boyunca boraks ve borik asit içeren diyetle beslenen Sprague Dawley ırkı ratlarda yaptıkları araştırma sonucunda; 87,5 mg bor/kg canlı ağırlık olacak şekilde beslenen ratlarda; vücut ağırlığında düşmeler olduğunu bildirmişlerdir. Heindel ve ark. [12], 13,6; 28,5; 57,7; 94,2 mg / kg canlı ağırlık/ gün bor olacak şekilde borik asit içeren diyetle beslenen gebe Sprague Dawley ratlarda, yüksek dozda (57,7-94,2 mg / kg canlı ağırlık/ gün) canlı ağırlık artışında düşme olduğunu bildirmektedirler. Armstrong ve ark. [2] 21 günlük erkek ve dişi domuz yavrularında yapılan çalışmada 5- 15 mg/kg diyet (5- 15 ppm) borun canlı ağırlık artışını etkilemediğini gözlemişlerdir.

Yapılan literatür taramalarında, borun ratlarda plazma bakır ve seruloplazmin düzeylerine etkileriyle ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. İnsanlarda bor ile yetersiz beslenme sonrasında bor takviyesinin serum SOD, seruloplazmin ve bakır düzeylerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, bor eksikliği sonrası bor takviyesinin eritrosit SOD, serum seruloplazmin ve bakır düzeylerini yükselttiği, tek başına bor yetersizliğinde ise bir değişim gözlenmediği rapor edilmiştir [24]. Huel ve ark. [13], fazla miktarda bora maruz kalan hamile annelerde (n=197) doğumda plasental dokuda ve göbek kordonu kanında bor seviyesinin normalin üç kat olduğunu, bakırlı bir enzim olan δ -Amino Levülinik Asit Dehidratat (ALA-D) düzeylerinin önemli oranda düştüğünü; kan bor seviyesi ile ALA-D düzeyleri arasında negatif bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar bir Lewis asidi olan borun, hidroksil grubu taşıyan organik moleküllerle kompleks yaparak ALA-D'yi inhibe edici etkisiyle açıklanmıştır.

Sunulan çalışmada kontrol ve deneme 2 grubuna ait seruloplazmin düzeyleri 4. örneklere kadar düşmüş fakat 5. örneklerde tekrar yükselmiş buna karşın deneme 1 grubunda başlangıçtan itibaren azalma göstermiştir. Her üç grupta da 5. örnek seruloplazmin düzeyleri başlangıç düzeylerine göre önemli oranda azalmış ve deneme 1 ve deneme 2

gruplarındaki düşmeler kontrol grubuna göre önemli (P<0,05) bulunmuştur (Tablo 2). Deneme gruplarındaki seruloplazmin düzeylerindeki düşüşün borun insanlarda bakırlı enzimlerden olan ALA-D [13] ile negatif korelasyon göstermesi ile uyumlu görünürken, sonuçlar Nielsen ve ark. [25]'in bulgularıyla uyumsuz olmuştur; borun türler ve cinsiyetler arasında farklı etkilerinin olduğu düşünülmektedir.

Sunulan çalışmada plazma bakır düzeyleri örnekleme zamanlarına göre önemli (P<0,001) düzeyde farklılıklar göstermesine karşın gruplar arası fark önemsiz bulunmuştur. Hunt ve Herbel [15], STZ diyabetik ratlarda diyetle alınan borun (0,06 mg B/kg) kardiyak bor konsantrasyonlarını etkilemediğini ancak kardiyak bakır, kalsiyum, manganez, molibdenum ve fosfor konsantrasyonlarını etkilediğini ileri sürmüşlerdir. Sunulan çalışmada borun bakır düzeylerini etkilemeksizin serum seruloplazmin düzeylerini düşürücü etkisi, bakırın seruloplazmin dışında başka proteinler tarafından taşındığını gösterebilir. Seruloplazmin, plazma bakırının %70-90'lık kısmının taşınmasından sorumlu kabul edilen bir protein olmasına karşın albümin ve transkuprein de bakır taşınmasında etkili proteinlerdir. Ayrıca memelilerde bakır taşınmasından sorumlu multicopper oksidazlar, hephaestin, zyklopen gibi birçok protein rapor edilmiştir [26]. Meyer ve ark. [20] aseruloplazmik farelerde bakırın emilim, taşınım ve dağılımında değişim olmadığını bildirmiştir. Sunulan çalışmada bakır düzeyleri değişmeksizin seruloplazmin düzeylerinin bor tarafından düşürülmesi, ratlarda bakır taşınımında seruloplazmin dışında başka proteinlerin varlığını desteklemektedir.

Sonuç olarak ratlarda rasyonla alınan 50 ve 100 ppm borun plazma bakır düzeylerini etkilemeksizin seruloplazmin düzeylerini düşürdüğü; bu sebeple borun, seruloplazmin sentezini azaltarak ya da yapısına bakırın bağlanmasını engelleyerek etkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu konu üzerinde yapılacak benzer çalışmalarda kan bor seviyelerinin de belirlenmesinin ve uygulama süresinin daha uzun tutulmasının uygun olacağı kanısına varılmıştır.

Teşekkür

Sunulan çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje No: 07 202 030).

Kaynaklar

1. Aouffen M, Paquin J, De Grandpre E, Nadeau R, Mateescu MA, (2001). *Deglycosylated ceruloplasmin maintains its enzymatic, antioxidant, cardioprotective, and neuroprotective properties. Biochem Cell Biol.* 79: 489-497.
2. Armstrong TA, Spears JW, Crenshaw TD, Nielsen FH, (2000). *Boron supplementation of a semipurified diet for weanling pigs improves feed efficiency and bone strength characteristics and alters plasma lipid metabolites. J Nutr.* 139: 2575-2581.
3. Bolanos L, Lukaszewski K, Bonilla I, Blevins D, (2004). *Why Boron? Plant Physiol and Biochem.* 42: 907-912.
4. Bremmer I, (1979). *The toxicity of cadmium, zinc and molybdenum and their effects on copper metabolism. Pro Nutr Soc.* 38: 325.
5. Burukoğlu D, Bayçu C, (2009). *Borun sıçan testis dokusuna etkisi. Anadolu University Journal of Science and Technology.* 10: 145-150.
6. Chan S, Gerson B, Subramaniam S, (1998). *The role of copper, molybdenum, selenium, and zinc in nutrition and health. Clin Lab Med.* 18: 673-85.
7. Colombo JP, Richterich R, (1964) *Zur bestimmung des caeruloplasmin im plasma. Schweiz Med Wschr.* 94:715-720.
8. Dupre JN, Keenan MJ, Hegsted M, Brudevold AM, (1994). *Effects of dietary boron in rats fed a vitamin D deficient diet. Env Health Perspect.* 102: 55-58.
9. Fleming RE, Whitman IP, Gitlin JD, (1991). *Induction of ceruloplasmin gene expression in rat lung during inflammation and hyperoxida. Am J Physiol.* 260: 68-74.
10. Fox PL, Mukhopadhyay C, Ehrenwald E, (1995). *Structure, oxidant activity and cardiovascular mechanisms of human ceruloplasmin. Life Sci.* 56: 1749-58.
11. Gitlin JD, (1988). *Transcriptional regulation of ceruloplasmin gene expression during inflammation. J Biol Chem.* 263: 6281-6287.
12. Heindel JJ, Price CJ, Field EA, Marr MC, Myers CB, Morrissey RE, Schwetz BA, (1992). *Developmental toxicity of boric acid in mice and rats. Fund Appl Toxicol.* 18: 266-277.
13. Huel G, Yazbeck C, Burnel D, Missy P, Kloppmann W, (2004). *Environmental Boron Exposure and Activity of δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase (ALA-D) in a Newborn Population. Toxicol Sci.* 80: 304-309.
14. Hunt CD, (1998). *Regulation of enzymatic activity: one possible role of dietary boron in higher animals and humans. Biol Trace Elem Res.* 66: 205-225.
15. Hunt CD, Herbel JL, (1992). *Boron affects energy metabolism in the streptozotocin-injected, vitamin D3-deprived rat. Magnesium Trace Elem.* 10: 374-386.
16. Hunt CD, Nielsen FH, (1981). *Interaction between boron and cholecalciferol in the chick. McHowell J, Gawthorne JH, White CL. eds. Trace Elements in Man and Animals. Australian Academy of Science, Canberra, Australia p. 597-600.*
17. Kucukkurt I, Akbel E, Karabag F, Ince S, (2013). *The effects of dietary boron compounds in supplemented diet on hormonal activity and some biochemical parameters in rats. Toxicol Ind Health.* 31: 255-260.
18. McPearson RA, (1996). *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Method Henry JB. eds. Philadelphia: W.B. Saunders Company. p. 237-257.*
19. Meacham SL, Taper LJ, Volpe SL, (1994). *Effects of boron supplementation on bone mineral density and dietary, blood, and urinary calcium, phosphorus, magnesium, and boron in female athletes. Environ Health Perspect.* 7: 79-82.
20. Meyer LA, Durley AP, Prohaska JR, Harris ZL, (2001). *Copper transport and metabolism are normal in aceruloplasminemic mice. J Biol Chem.* 39: 36857-36861.
21. Milne DB, Burtis CA, Ashwood ER, (1999). *Trace Elements. In: Environ Health Perspect. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders. p. 1029-1055.*
22. Nacar A, Yasin Selçuk Y, Okuyan HM, Sefil NK, Deligönül E, Nacar E, (2014). *Borik asit uygulamasının sıçan böbrek ve testis dokusunda oluşturduğu hasara karşı Omega-3 yağ asitlerinin koruyucu etkisinin histopatolojik olarak incelenmesi. Dicle Tıp Dergisi.* 41: 385-390
23. Nielsen FH, Hunt CD, Mullen LM, (1987). *Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women. FASEB J.* 1: 394-397.
24. Nielsen FH, (1992). *Biochemical and physiological consequences of boron deprivation in humans. North Dakota International Symposium on Health Effects of Boron and Its Compounds, University of California, Irvine, California. pp: 9-63.*
25. Nielsen FH, (1994). *Biochemical and physiologic consequences of boron deprivation in humans. Environ Health Perspect.* 102: 59-63.
26. Prohaska JR, (2011). *Impact of Copper Limitation on Expression and Function of Multicopper oxidases (Ferroxidases). Adv Nutr.* 2: 89-95.
27. Weir RJ Jr, Fisher RS, (1972). *Toxicologic studies on borax and boric acid. Toxicol Appl Pharmacol.* 23: 351-364.
28. Yorbik Ö, (1999). *Otistik bozukluğu olan çocuklarda antioksidan enzimlerin ve bunlarla ilgili eser elementlerin araştırılması. Uzmanlık tezi. Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Ankara.*

Sığırların klinik mastitislerinden *Pseudomonas aeruginosa*'nın izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkları

Cemil ŞAHİN¹, Göksel ERBAŞ²

¹ Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye,

² Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Işıklı, Aydın, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 28.01.2015, Kabul Tarihi / Accepted: 20.07.2015

Özet: Bu çalışmada Aydın ilinde görülen sığır klinik mastitislerinden çevresel mastitis etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa*'nın izolasyonu ve izole edilen etkenlerin antibiyotiklere duyarlılıklarının saptanması amaçlanmıştır. Çalışmada Aydın ili ve çevresinde bulunan çeşitli odaklardan toplam 200 adet klinik mastitisli (CMT +3) süt örneği incelenmiştir. Alınan örnekler soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Rutin Teşhis Laboratuvarı'na getirilmiş ve ekimleri yapılmıştır. Daha sonra 37°C'de 24 saat inkubasyona bırakılmıştır. *Pseudomonas* türlerinin ayırımında etkene yönelik selektif besiyerleri kullanılmış ve izole edilen bakterilerin biyokimyasal yöntemlere göre identifikasyonu yapılmıştır. Araştırmada kullanılan toplam 200 mastitisli süt örneğinden 7 (%3.5) adet *P. aeruginosa* suşu izole ve tanımlanmıştır. İzole ve tanımlanmış *P. aeruginosa* suşlarına yapılan antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda 7 adet suşun tamamı danofloksasin, linkomisin/neomisin, sefaperazon ve kolistin sülfat'a duyarlı (%100), penisilin/novobiosin, amoksisilin klavulanik asit, kanamisin/sefaleksim ve eritromisin'e ise dirençli (%100) bulunmuştur. Florfenikol'e 2 suş dirençli (%29), 3 suş orta düzeyde duyarlı (%42.0) ve 2 suş ise duyarlı (%29.0), sülfamethaksazol-trimethoprim'e 5 suş orta düzeyde duyarlı (%71.0), 2 suş dirençli (%29.0) ve Oksitetrasiklin açısından ise 2 suş orta düzey duyarlı (%29.0) 5 suş dirençli (%71.0) olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak Aydın ilinde görülen çevresel mastitis vakalarında *P. aeruginosa*'nın izolasyonu ve identifikasyonları yapılmış ve danofloksasin, linkomisin/neomisin, sefaperazon ve kolistin sülfat kullanımının sağaltımda başarı getireceği ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik duyarlılık, Mastitis, *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiotic susceptibilities and isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical mastitis in cattle

Summary: The aims of this study were isolation of environmental mastitis agent -*Pseudomonas aeruginosa*- from clinical mastitic cattles in Aydın and determination of antibiotic susceptibilities of isolates. Totally 200 clinical mastitic milk samples (CMT +3) collected from different centers have been analyzed. Collected samples were brought to The Routine Diagnostic Laboratory of Microbiology Department, Veterinary Faculty, Adnan Menderes University under cold chain. The samples were allowed to incubate for 24 h at 37°C. For differentiation of *Pseudomonas* species, selective media were used and isolated bacteria were identified based on biochemical assays. Seven *P. aeruginosa* strains (3,5%) were isolated and identified from 200 analyzed mastitic milk samples. All the studied strains were found as sensitive to danofloxacin, lincomycine/neomycin, cefoperazone, colistin sulphate (100 %) and resistant to penicillin/novobiocin, amoxycillin clavulanic acide, ceftiofur, kanamycin/cephalexin, erythromycin (100%). Resistant two strains, moderately sensitive 3 strains and sensitive two strains were being present against florfenicol. Five strains were found moderately sensitive (71.0%) to sulfamethoxazole-trimethoprim, while two strains were resistant to same antibiotic. Resistance to oxytetracycline occurred in 5 strains (71%), as two strains were moderately sensitive (29.0%). In this study, isolation and identification of *P. aeruginosa* from environmental mastitis cases were performed in Aydın province. As a conclusion, usage of danofloxacin, lincomycine/neomycin, cefoperazone and colistin sulphate were proved to bring success in treatment.

Key words: Antibiotic susceptibility, Mastitis, *Pseudomonas aeruginosa*

Giriş

Pseudomonas aeruginosa sığırlarda mastitise, solunum ve intestinal sistemde gelişen sistemik enfeksiyonlara, atlarda genital sistem hastalıklarına,

koyunlarda yeşil yün (green wool) hastalığına neden olarak ekonomik kayıplara neden olmaktadır [3,13]. Etken, sağım sırasında kullanılan sıcak ve soğuk sulardan, ıslak zeminlerden, yeterince dezenfekte edilmemiş sağım ekipmanlarından, çevreden,

toprak ve dışkıdan, kontamine enjektör ve antibiyotiklerden izole edilebilmektedir [22]. Aerobik, genellikle kapsülsüz ama bazen kapsül oluşumu görülebilen, taze kültürlerdeki flagellaları ile çok hızlı hareket edebilen, kültürlerde bazen ikişerli fakat çoğunlukla tek olarak görülen ve Gram negatif bir basil olan *P. aeruginosa*; 0,5-0,8 mikrometre en ve 1,5-3.0 mikrometre uzunluğundadır [3,11]. *P. aeruginosa* genel besi yerlerinde kolaylıkla ürer. Koyun kanlı agarda (%5) beta hemoliz yaparlar ve petri kutusu açıldığında üzüksü koku duyulur [3]. Optimal üreme ısısı 37 °C'dir, ancak tolere ettiği ısı 42°C'ye kadar yükselebilir [19].

Sığırlarda *P. aeruginosa* enfeksiyonları çoğunlukla mastitise neden olmaktadır ve buna bağlı olarak sistemik enfeksiyonlar gelişmektedir. Etken solunum sisteminde ve intestinal sistemde de enfeksiyona neden olabilmektedir [3]. Buna karşın *P. aeruginosa*'nın sütçü sığırlarda hastalık yapma oranının çok yüksek olmadığı (%1-3) bildirilmektedir. Klinik bulgular çoğunlukla erken laktasyon döneminde ve süt verimi çok yüksek hayvanlarda görülmektedir. Ancak salgınlar laktasyonun her döneminde görülebilir. Hastalık perakut, hiç belirti vermeyen subklinik olaylardan, hayati tehlike yaratan hatta ölümlerle sonuçlanan klinik olaylara kadar geniş bir klinik tablo gösterebilmektedir [13].

P. aeruginosa sığırlarda da fırsatçı patojen olup, meme dokusu ya da meme bezlerinde yaralanma olduğunda aktif hale geçmektedir. Ayrıca diğer bakterilerin ve bakım - beslenme hatalarının hayvanı zayıf düşürdüğü durumlarda hastalık kendini belli etmektedir. Bakteri plastik yüzeylere, hortumlara, çeliğe yapışabilme yeteneğindedir. Bu nedenle iyi dezenfekte edilmemiş sağım makinaları yüzeylerine kolayca lokalize olur. Bu özellik inekten ineğe etkenin kolaylıkla bulaşmasını sağlamaktadır. Üstlerini saran koruyucu madde (biyofilm) bakteriyi metal yüzeylerin zararlı etkilerinden korurken, sanitasyon amacı ile kullanılan klorin, iyodin gibi dezenfektanlara da dirençli olmasını sağlamaktadır. Bakteri genel olarak sağlam dokularda dokuların doğal direnci nedeniyle hastalığa yol açmamaktadır [22].

P. aeruginosa, antibiyotiklere dirençli olduğundan dolayı tehlikeli bir patojendir. Bakteri doğal olarak sahip olduğu lipopolisakkarit (LPS) yapısındaki dış membran ile (permeabilite bariyerleri mevcut olduğundan) birçok antibiyotiğe direnç kazanmak-

tadır. Terapötik dozlardaki antibiyotik konsantrasyonlarına karşı, yüzeylerinde, hücrelerin içine girişi engelleyen, hava ve su geçirmez özellikte biyofilm oluşturma eğilimindedirler [9].

Bu araştırma ile Aydın ilinde görülen sığır mastitislerinden *Pseudomonas aeruginosa* etkeninin izolasyonu ve izole edilen etkenlerin antibiyotiklere duyarlılıklarının saptanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Örnekler

Araştırmada, 200 adet klinik mastitisli süt örneği [CMT (3 +)] incelenmiştir. Alınan örnekler incelenmek üzere Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarı'na soğuk zincir altında getirilmiştir.

Örneklerden *P. aeruginosa* İzolasyonu ve identifikasyonu

Soğuk zincir altında laboratuvara getirilen örnekler, nutrient buyyona inokule edilerek 37°C'de yaklaşık 24 saat süre ile inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon süresi sonunda kanlı agara ekimleri yapıldı [3,4,15]. Kanlı agarlardaki şüpheli kolonilerden *Pseudomonas* Selektif Agarlara ekimler yapıldı. *Pseudomonas* selektif agarda üreyen, üzeri floresan ışıltı gösteren koloniler Gram boyama metodu ile boyandı. Gram negatif, oksidaz ve katalaz testi pozitif olan kolonilerden pasajlar yapıldı ve saf kültürler elde edildi. Bu suşlara *P. aeruginosa* yönünden biyokimyasal testler (Tablo 1) yapıldı [4,5,14,15]. Bu kolonilerden TSB'a (Tryptone Soya Broth) inokule edilip 24-48 saat 37°C'de ve 25°C'de inkubasyonun sonunda sarı-yeşil renkli pyosiyanın pigment varlığının görülmesi ile *P. aeruginosa* izole edildiği sonucu doğrulandı.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

İzole edilen suşların antibiyotik duyarlılık testleri Kirby Bauer Disk Diffüzyon yöntemine göre yapıldı [4]. Ticari firmalardan temin edilen; trimethoprim- sulfamethoksazol (STX), florfenikol (FFC), ceftiofur (CFT), eritromisin (E), colistin sülfat (CT), cefaperazon (CFP), linkomisin neomisin (LN), kanamisin sefaleksis (KCX), oksitetrasiklin (OT), amoksisilin klavulonik asit (AMC), danofloksasin (DFX), penisillin/novobiosin (Pen/Novo),

etken maddelerini içeren antibiyotik diskleri kullanıldı. Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin standart zon çapları Tablo 2’de verilmiştir [6,7].

Bulgular

Araştırmada toplam 200 mastitisli süt örneğinden 7 (%3,5) adet *P. aeruginosa* suşu izole ve identifiye edilmiştir. İzole ve identifiye edilen *P. aeruginosa* suşlarına yapılan antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda 7 adet suşun tamamı danofloksasin, linkomisin/neomisin, sefaperazon ve kolistin sülfat’a duyarlı (%100), penisilin/novobiosin, amoksisilin klavulanik asit, kanamisin/sefalekssin, seftifor ve eritromisin’e dirençli (%100) bulunmuştur. Florfenikol’e 2 suş dirençli (%29.0), 3 suş orta düzeyde duyarlı (%42.0) ve 2 suş ise dirençli (%29.0), sülfamet-haksasol-trimethoprim’e 5 suş orta düzeyde duyarlı (%71.0), 2 suş duyarlı (%29.0) ve oksitetrasiklin açısından ise 2 suş orta düzey duyarlı (%29.0), 5 suş dirençli (%71.0) olarak tespit edilmiştir (Tablo 3).

Tartışma ve Sonuç

Sütçü işletmeleri etkileyen gerek süt verimindeki azalmalar, gerekse yüksek tedavi masrafları bakımından en yüksek maliyetli hastalığın mastitis olması, konunun önemini ortaya koymaktadır [12]. Sığır mastitisiyle ilgili birçok araştırma ve çalışma yapıldığı halde, hastalık halen süt endüstrisinin ekonomik bir problemi olmaya devam etmektedir [8,10]. Yetiştiricilerin koruyucu hekimlik uygulamalarına gereken önemi vermemesi ve genel hijyen kurallarını prosedürüne uygun biçimde yerine getirememesi mastitisin işletmelerden eradike edilememesinin en büyük sebebi olmaktadır.

P. aeruginosa, çevresel mastitise sebep olan etkenlerden biridir. Etken, sağım sırasında kullanılan sıcak ve soğuk sular, ıslak zeminlerden, yeterince dezenfekte edilmemiş sağım ekipmanlarından, çevreden, toprak ve dışkıdan, kontamine enjektör ve antibiyotiklerden izole edilebilmektedir [22]. Ülkemizde de yetiştiricilerimizin büyük çoğunluğunun da hijyen hususunda gerekli önlemleri almaması, çevresel mastitis etkenlerinin meme dokusunda enfeksiyon oluşturmaya davetiye çıkarmaktadır.

Arda ve ark. [3] *P. aeruginosa* nın genel besi yerlerinde kolaylıkla ürediğini, %5 koyun kanlı

agarda beta hemoliz yaptığını ve petri kutusu açıldığında üzüksü koku duyulabileceğini bildirmişlerdir. Bu bilgi, identifikasyon aşamasında bize yol gösterici olmuş ve mikroorganizmanın yaptığı hemoliz ile spesifik üzüm kokusu tarafımızdan da tespit edilmiş, identifikasyon aşamasında kullanılmıştır [3].

Trakya bölgesinde 77 mastitisli süt örneği ile yürütülen bir çalışmada 105 etken izole edilmiş, bu örneklerin %4,8’i de *P. aeruginosa* olarak tanımlanmıştır [1].

Türütoğlu ve ark. [20] Marmara bölgesinden elde edilen 1594 mastitisli süt örneğini inceledikleri araştırmalarında izole edilen 1126 etkenden %0,2’sinde (3 adet), Burdur yöresinde yaptıkları çalışmada ise [21] klinik ve subklinik seyreden mastitisli 249 inekten alınan süt örneklerinde %1,03 oranında *P. aureginosa* identifiye etmişlerdir [20,21].

Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü teşhis laboratuvarına getirilen mastitisli 566 süt örneğinin sadece 5’inden *P. aeruginosa* (%0,8) izole edilebildiği ve enrofloksasin’e (4+), sefkuinom ve sefasetrile (3+) duyarlı olduğu bildirilmiştir [2].

Şanlıurfa yöresinde bulunan ineklerde, subklinik mastitis olgularının prevalansının belirlenmesi, mastitise neden olan etkenlerin izolasyonu, identifikasyonu ve bunların antibiyotiklere duyarlılıklarının saptanmasının amaçlandığı bir çalışmada [18] %1.1 (3 adet) oranında, aynı şekilde Diyarbakır yöresinde yapılan çalışmada 268 adet mastitisli süt örneği incelenmiş, üreme olan 239 süt örneğinden 5 adet (%1.87) *P. aeruginosa* izole ve identifiye edilmiştir [23].

Mısır’da Zhang ve Taylor [24] tarafından yapılan bir araştırmada, 400 süt örneğinde %15 oranında *Escherichia coli*, %5 *Streptococcus agalactiae*, %3,5 *P. aeruginosa*, %1,5 *Staphylococcus aureus* izole edilmiştir.

Kirk ve Mellenberger [13], yaptıkları bir araştırmada *P. aeruginosa*’nın sütçü sığırlarda hastalık yapma oranının çok yüksek olmadığını (%1-3) bildirmişlerdir.

Araştırmamızda ise 200 adet Mastitisli süt örneğinde (CMT 3+) 7 adet *P. aeruginosa* etkeni izole edilmiş ve oran araştırmalara paralel %3.5 olarak tespit edilmiştir.

Hindistan’da yapılan bir çalışmada, CMT pozitif sonuç veren sütlerde toplam 107 bakteriyel izolat elde edilmiş, 30 *S. aureus*, 16 *S. galactia*, 12 *S. dysgalactia*, 14 *Bacillus subtilis*, 13 *P. aeruginosa*, 22 *E. coli* olarak bulunmuştur. Disk diffüzyon yöntemi ile yapılan antibiyogram testlerinde, *P. aeruginosa*, kloramfenikol, seflizomine duyarlı bulunmuş, bunun yanında birçok antimikrobiyale ise çok dirençli olduğu görülmüştür [17].

Japonya’da sığırların mastitisli sütleri ile yapılan bir çalışmada 171 *P. aeruginosa* izolatının antibiyotiklere olan duyarlılıkların incelenmiştir [16]. Araştırma sonuçlarına göre siprofloksasin, imipenem, meropenem, piperasilin, seftazidim, sefepim, sefärerazon sulbaktam, amikasin, tobramisin ve gentamisin’e karşı yüksek duyarlılık, seftriakson, enrofloksasin, sefotaksim ve moksalaktam’a karşı ise yüksek dirençlilik tespit edilmiştir.

Çalışmamızda ise, antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda 7 adet suşun tamamı danofloksasin, linkomisin/neomisin, sefärerazon ve kolistin sülfat’a duyarlı (%100), penisilin/novobiosin, amoksisilin klovlulanik asit, kanamisin/sefalekssin ve eritromisin’e dirençli (%100) bulunmuştur. Florfenikol’e 2 suş dirençli (%29.0), 3 suş orta düzeyde duyarlı (%42.0) ve 2 suş ise duyarlı (%29.0), sülfamet-haksasol-trimethoprim’e 5 suş orta düzeyde duyarlı (%71.0), 2 suş dirençli (%29.0) ve oksitetrasiklin açısından ise 2 suş orta düzeyde duyarlı (%29.0), 5 suş dirençli (%71.0) olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak mastitisli inek sütlerinde çevresel mastitis etkeni olan *P. aeruginosa*’nın Aydın ili ve çevresinde varlığının araştırıldığı bu çalışmada, 200 adet mastitisli süt örneğinde %3.5 oranında bulunduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç genel olarak *P. aeruginosa*’nın mastitis etiolojisinde düşük düzeyde rol aldığını göstermektedir. Bununla birlikte izole edilen bu çevresel mastitis etkenlerinin, penisilin/novobiosin, amoksisilin klovlulanik asit, kanamisin/sefalekssin ve eritromisin gibi veteriner sahada mastitis tedavilerinde sıklıkla kullanılan antibiyotiklere karşı %100 gibi bir oranda dirençli tespit edilmelelerinin çok önemli bir sonuç olduğu düşünülmektedir.

Araştırmamız sonucunda, veteriner sahada görülen mastitis vakalarında direkt olarak antibiyotik kullanımına geçilmeden, süt numunelerinin alınarak mikrobiyoloji laboratuvarında kültüre edilmeleri ve

antibiyoqramlarının yapılmasının doğru antibiyotik seçimi ve dolayısı ile tedavinin başarısına yardımcı olacağı tekrar ortaya konmuştur.

Teşekkür

Çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri tarafından VTF-14030 kodlu proje olarak desteklenmiştir. Araştırma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun 64583101/2013/091 sayılı kararı ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma Veteriner Hekim Cemil ŞAHİN’in Yüksek Lisans Tez Çalışması’ndan özetlenmiştir.

Kaynaklar

1. Ak S, (2000). *Trakya Yöresinde Sığır Mastitisinden Sorumlu Bulaşıcı ve çevresel Bakteriyel Etkenler ve Antibiyotiklere Duyarlılıkları*. İst Üniv Vet Fak Derg, 26(2), 353-365
2. Anonim, (2003). Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Kişisel Görüşme.
3. Arda M, Aydın N, Ilgaz A, Minbay A, Kahraman M, İzgür M, Leloğlu N, Akay Ö, Diker KS, (1997). *Özel Mikrobiyoloji*, 4.Baskı, Medisan Yayınevi. p: 91-96
4. Bilgehan H, (1995). *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. Fakülteler Kitapevi. 2. Basım
5. Chakraborty M, Roy JP, (2001). *Prevalance Biochemical Characterisation and Pathogenicity of P. aeruginosa Isolated from Human and Animal Sources*. Indian Vet J, 78 (12), 1079-1081
6. CLSI, (2002). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standard, CLSI Document M31-A2, second ed. Clinical and Laboratory Standards Institute*. Wayne, PA
7. CLSI, (2003). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard CLSI Document M2-A8*. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA
8. DeGraves FJ, Fetrow J, (1993). *Economics of Mastitis and Mastitis Control*. Vet Clin North Amer: Food Anim Pract, Nov;9(3):421-34
9. Gül B, (2002). *Biyofilm, Tolerans ve İnfeksiyon Bölgesinde Direnç*. 30. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı, S.196
10. Hillerton JE, (1996). *Control of Mastitis*. In Progress in Dairy Science, Edited by C.J.C. Phillips, CAB International, Wallingford, Oxon, UK. 171-190
11. Iglewski BH, (2002). *Pseudomonas*. Medical Microbiology 4th edition. Chapter 27. 2002. **Erişim adresi:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8326/>, **Erişim Tarihi:** 05. 2014.
12. Jayarao BM, Donaldson SC, Straley A, Sawant AA, Hegde NV, Brown JL, (2006). *A survey of foodborne*

- pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. *J Dairy Sci*, 89:2451-2458.
13. **Kirk J, Mellenberger R**, (2013). *Mastitis control program for Pseudomonas mastitis in dairy cows*. Accessed August 30, **Erişim adresi:** http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/mastitis-control-program_pseudomonas-mastitis.pdf, **Erişim tarihi:** 05.2014
 14. **Koneman E, Allen DS, Jonda WM, Schreckenberger PC, Winn WCJ**, (1997) *Color Atlas and Textbook of Diagnostik Microbiology*. 5. Edi., pp. 268
 15. **Moore MD**, (1997). *Pseudomonas and the Laboratory Animal*, CRL Reference Paper 10, 4, **Erişim adresi:** www.criver.com/techdocs/pseudomonas.html, **Erişim Tarihi:** 20.08.2014
 16. **Ohnishi M, Sawada T, Hirose K, Sato R, Hayashimoto M, Hata E, Yonezawa C, Kato H**, (2011). *Antimicrobial susceptibilities and bacteriological characteristics of bovine Pseudomonas aeruginosa and Serratia marcescens isolates from mastitis*. *Vet Microbiol*, 154(1-2):202-207
 17. **Ross RG, Balakrishnan G, Anbiah SV**, (2001). *Antibiogram of Bacteria Isolated from Mastitis Cases of Cattle in Idukki District*. *Indian Vet J*, 78(11), 1066-1067
 18. **Tel OY, Keskin O, Zonturlu AK, Arserim Kaya NB**, (2009). *Şanlıurfa yöresinde subklinik mastitislerin görülme oranı, aerobik bakteri izolasyonu ve duyarlı antibiyotiklerin belirlenmesi*. *Fırat Üniv Sağlık Bil Derg*, 23(2): 101-106
 19. **Todar K**, (2002). *Bacteriology at UW*. Madison, University of Wisconsin –Madison, Online Textbook of Bacteriology (Bact330/lecturepseudomonas). **Erişim adresi:** <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>, **Erişim tarihi:** 22.07.2014
 20. **Türütoğlu H, Ateşoğlu A, Salıhoğlu H, Öztürk M**, (1995). *Marmara bölgesi süt ineklerinde mastitise neden olan aerobik etkenler*. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg*, 26: 125-137
 21. **Türütoğlu H, Mudul Ş, Türkmen M**, (2002). *Mastitisli İnek Sütlerinden İzole edilen S. auerus Etkenlerinde Beta-Laktamaz Enzimi Varlığı*. Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Raporu. Burdur 1-15.
 22. **Wolska K, Bukowski K, Anusz Z, Jakubczak A**, (1999). *Bacterisidal Activity of Human, Swine and Cattle Serum Against P. aeruginosa Strains*. *Med Dosw Microbiol*, 51 (3-4), 399-445
 23. **Yeşilmen S, Özyurtlu N, Bademkiran S**, (2012). *Diyarbakır Yöresinde Subklinik Mastitisli İneklerde Etken İzolasyonu ve Duyarlı Antibiyotiklerin Belirlenmesi*. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 1 (4):24-29
 24. **Zhang NA, Taylor JL**, (1994). *Biofilms: A Review*. *Microbil Mol Biol Rev*, 21, 486-505

***Aeromonas hydrophila* isolation from Holland lop (*Oryctolagus cuniculus*) rabbits**

Meriç Lütfi Avsever, Seza Eskiizmirliler, Serra Tunalıgil

Bornova Veterinary Control Institute, Bacteriology Laboratory, Izmir

Geliş Tarihi / Received: 25.03.2015, **Kabul Tarihi** / Accepted: 08.07.2015

Summary: Five dead Holland lop breed rabbits bought from a pet shop and reared in a garden were presented to our laboratory with diarrhea and mortality as symptoms. *Aeromonas hydrophila* was isolated from the internal organs and fecal samples of these rabbits and the case is presented.

Key words: *Aeromonas hydrophila*, Holland lop, *Oryctolagus cuniculus*, Rabbit

Hollanda lop (*Oryctolagus cuniculus*) tavşanlarından *Aeromonas hydrophila* izolasyonu

Özet: Bir pet shop'tan alınıp bahçe ortamında yetiştirilen beş ölü Holland lop türü tavşan ishal ve mortalite şikayetiyle laboratuvara getirildi. Bu tavşanların iç organlarından ve dışkılarından *Aeromonas hydrophila* izole edilmiş olup, bu olgular sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: *Aeromonas hydrophila*, Holland lop, *Oryctolagus cuniculus*, Rabbit

Introduction

The rabbit breed named Holland Lop, Netherland Lop, or Dwarf Lop was declared by the Dutch government as a national breed in 1964. These rabbits are of a popular companion animal breed and also are used for show purposes. These animals have a significant place in the companion animal sector which is rapidly growing in Turkey. Their non-aggressive temperament, small and attractive physical properties and their aptitude to training make them a popular choice. As other rabbits, Holland lops are susceptible to *A. hydrophila* [1,7]. But still, natural *A. hydrophila* infections in Holland Lop rabbits were not commonly reported. The aim of this case presentation is to report a natural *A. hydrophila* infection in Holland lop rabbits and to draw attention to the significance of disease in rabbits.

Case presentation

Disease symptoms consisted of severe green-yellow diarrhea in 6- 8 week old rabbits, a failed treatment scheme against coccidiosis was performed and as a result 20 rabbits were dead within 3 weeks (Total mortality 20%). Five rabbits presented to the labo-

ratory were examined bacteriologically. For this purpose, fecal samples were inoculated on Nutrient broth, Rappaport Vassiliadis Soy Broth and Muller-Kauffmann Tetrathionate Broth. From internal organs (liver, spleen, heart and lungs) inoculations were made on Blood Agar and McConkey Agar. Inoculated media were incubated in 37°C for 24 hours. Colonies on Blood and McConkey agar plates were subcultured while initial inoculations on liquid media were streaked on McConkey Agar and further subcultures were carried out.

Twelve isolates five from fecal samples and 7 from internal organs) were identified as *A. hydrophila* with conventional microbiological methods [3,4] and Vitek- 2 Compact identification device. Phenotypic characteristics of these isolates which showed growth on MacConkey agar were homologous and they were also found to be Gram negative, haemolytic, motile, oxidase positive, catalase positive, Voges-Preskauer positive and lactose negative.

Antibiotic susceptibility testing was performed with disc diffusion method and inhibition zones were measured and compared to reference values [2,6]. Florfenicol (30 µg), gentamycin (10 µg), lincomycin + spectinomycin (10 µg), enrofloxacin

(5 µg), ceftiofur (30 µg), colistin sulphate (10 µg), amoxicillin + clavulonic acid (30 µg), erythromycin (15 µg), oxytetracycline (30 µg), sulfamethoxazole-trimethoprim (25 µg) (Oxoid) were used in the disc diffusion test. The isolates were seen to be susceptible to ceftiofur and gentamycine. The figure showing the living conditions of rabbits is in Figure 1.



Figure 1. Holland Lop rabbits kept on a concrete floor covered with wood cuttings and dirt.

Vitek 2 compact can differentiate *A. hydrophila* from *Aeromonas sobria* perfectly, but cannot differentiate from *Aeromonas caviae*. This lack can be remedied with the conventional Voges-Priskauer (V-P) test. *A. hydrophila* is positive for V-P whereas *A. caviae* is negative. Besides, *A. caviae* is not haemolytic on blood agar [4,5,8].

Although rabbits are generally susceptible to *A. hydrophila* infections, the disease rarely escalates into a severe outbreak. Peniagua et al. [7], reported an outbreak caused by *A. hydrophila* in a rabbit farm in Spain. Researchers reported isolation of pure *A. hydrophila* cultures from the livers, lungs, spleens and heart blood samples of rabbits. Similarly, in this work, *A. hydrophila* was isolated as a pure culture from internal organs (liver, lungs, spleen and heart). Coliform group bacteria accompanied the isolations made from fecal samples.

Abdel Gwad and Abdel Rahman [1], in a previous study, aseptically took fecal swabs from 135 rabbits and as a result of bacteriological examina-

tions isolated *A. hydrophila* at a rate of 24.4 % in rabbits with diarrhea and 1.5 % in healthy rabbits. In an experimental study with these isolates they reported a mortality rate of 20 % and re-isolated the agent from the internal organs of dead rabbits.

In the antibiotic susceptibility testing they [1] performed; they found the isolates to be susceptible to these antibiotics; gentamycine (100 %), nalidixic acid (100 %), chloramphenicol (95 %), cephoxetin (90 %). Isolates were also found to be resistant to penicillin and ampicillin. In this work, *A. hydrophila* was isolated from all 5 rabbits' fecal samples (100 %) but morbidity was found to be higher than that of Abdel Gwad and Abdel Rahman [1]'s report. However, extensive studies with more samples are needed for a definite conclusion. On the other hand, the mortality rate and antibiotic susceptibility patterns were found to similar to the findings reported by Abdel Gwad and Abdel Rahman [1].

References

1. **Abdel-GwadAM, Abdel-Rahman AA**, (2004). *Isolation and significance of Aeromonas hydrophila group in farmed rabbits. Assiut University B EnvironRes.* 7 (1), 85-93.
2. **Alderman DJ, Smith P**, (2001). *Development of draft protocols of Standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. Aquaculture.* 196, 211-243.
3. **Arda M, Minbay A, Aydın N**, (1982). Özel Mikrobiyoloji, bakteriyel enfeksiyöz hastalıklar, A.O. Basimevi, AU Veteriner Fakültesi, Yayın No. 386, Ankara.
4. **Forbes B, Sahn D, Weissfeld A**, (2002). *Bailey Scott's Diagnostic Microbiology. MosbyInc., St. Louis, MO, ed. 11.* 423-433.
5. **Janda JM, Abbott SL**, (2010). *The Genus Aeromonas: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. Clin MicrobiolRev.* 23(1), 35-73.
6. **National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)**, (2000). *Methods For Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests For Bacteria That Grow Aerobically-Fifth Edition: Approved Standard M7-A5, Nccls, Wayne, Pa, Usa.*
7. **Paniagua C, Argüello-Villares JL, Arias MA, Herreros M**, (1998). *Aeromonas hydrophila associated with a severe outbreak of infection in farmed rabbits. Zentralbl Hyg Umweltmed.* 201 (4-5), 423-30.
8. **Parker JL, Shaw JG**, (2011). *Aeromonas spp. Clinical microbiology and disease. J Infect.* 62 (2), 109-18.

Türk gıda mevzuatında risk analizi

Gizem ÇOPUROĞLU¹, Aylin KASIMOĞLU DOĞRU¹, Naim Deniz AYAZ¹

¹ Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Kırıkkale

Geliş Tarihi / Received: 26.01.2015, Kabul Tarihi / Accepted: 31.07.2015

Özet: Avrupa’da yaşanan bazı önemli gıda krizleri, Avrupa Birliği’ni mevzuatında gıda güvenliği konusunda bir takım köklü düzenlemeler yapmaya itmiştir. Türkiye’nin Avrupa Birliği (AB)’ne uyum süreci kapsamında Türk Gıda Mevzuatı yeniden düzenlenmiş olup, bu sürecin bir getirisi olarak 2010 yılında 5996 sayılı “Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu” yürürlüğe girmiştir. 5996 sayılı Kanun, pek çok yeni kavramla birlikte risk analizini de mevzuatımıza kazandırmıştır. Risk analizi; risk değerlendirmesi, risk yönetimi ve risk iletişimi olmak üzere birbirleriyle bağlantılı üç bileşenden oluşan bir süreçtir. Bu süreç, gıda ve yem güvenilirliğinin sağlanması, tüketici sağlığı, hayvan sağlığı ve refahı ile bitki sağlığı konularında bilimsel esaslara dayanmakta ve gıda güvenliği politikasının temel bileşenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Bu makalede, AB ve Türk Gıda Mevzuatı’nın gelişim süreci, gıda güvenliği için risk analizi yaklaşımı ve risk analizi süreci ile ilgili bilgiler derlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Risk analizi, Gıda mevzuatı, 5996 sayılı kanun, AB uyum süreci

Risk analysis in Turkish food legislation

Abstract: European Union (EU) was forced to make some fundamental regulations on food safety legislation due to some major food crisis in Europe. Within the scope of Turkey’s EU accession process, Turkish food legislation was rearranged and Law no. 5996 on “Veterinary Services, Plant Health, Food and Feed Law” came into force in 2010. With this law, risk analysis was brought into Turkish food legislation along with a lot of new subjects. Risk analysis is a process harboring three interconnected components; risk assessment, risk management and risk communication. This process is based on scientific principles to ensure food and feed safety, consumer health, animal health and welfare, and plant health issues, being some of the main components of the food safety policy. In this review, the development of European Union and Turkish Food Legislations, risk analysis approach to food safety and risk analysis process have been compiled.

Key words: Risk analysis, Food legislation, Law no. 5996, Compliance with EU

Giriş

Son yirmi yılda yaşanan Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), kuş gribi ve dioksin krizi gibi halk sağlığını etkileyen bir takım önemli olaylar, gıda mevzuatında gıda güvenliğinin önemini gözler önüne sermiş ve Avrupa Birliği (AB)’nin, etkin bir gıda denetimi mekanizması ile tüketicinin güvenilir gıda temin etmesini hedefleyen “çiftlikten sofraya gıda güvenliği” anlayışını benimsemesine neden olmuştur [15,21,31].

AB-Türkiye ilişkileri 1959 yılında başlayıp, 2000’li yılların başında ivme kazanmış [4] ve bu süreç içerisinde Avrupa Komisyonu, aday ülkelerin Topluluğa katılma sürecinde AB standartlarını yeteri kadar karşılayamadıkları takdirde üyeliklerinin kabul edilmeyeceğini açık bir şekilde ortaya

koymuştur [22]. AB’ye uyum süreci müzakereleri kapsamında görüşülen 35 fasıldan 12.’si olan “Gıda Güvenliği, Veterinerlik ve Bitki Sağlığı” faslı, 13 Haziran 2010 tarihinde 27610 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanan 5996 sayılı “Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu”nun kabul edilmesiyle açılmıştır [6,9]. Bu Kanun’un ilkelerinden biri olan “risk analizi”, Türk Gıda Mevzuatı’nda temel konulardan biri olarak yerini almıştır.

AB’de gıda mevzuatı gelişim aşamaları: Avrupa’da gıda mevzuatının geliştirilmesine ilişkin ilk adım, 1997 yılında yayımlanan “Yeşil Kitap” ile başlamıştır. Ardından 2000 yılında, gıda güvenliğine ilişkin tüm konuların ilk kez bir arada ele alındığı “Beyaz Kitap” yayımlanmıştır. AB’nin çiftlikten sofraya gıda güvenliği anlayışının temel prensiple-

rine ışık tutan bu dokümanda tüketicinin korunması, insan sağlığı, hayvan sağlığı, hayvan refahı ve bitki sağlığı gibi pek çok konu ele alınmış, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) kurulması gerekliliği üzerinde durulmuştur [19,20,21,34]. 2002 yılında “Avrupa Birliği Genel Gıda Yasası” olarak da adlandırılan 178/2002/EC sayılı regülasyonun yayımlanması ile gıda zincirinin her aşamasında gerek gıda gerek yem işletmecilerinin ürünlerinin çiftlikten sofraya uluslararası standartlara uygun bir şekilde olması gerekliliği yasal bir zemine oturtulmuştur. Gıda güvenliği konusunda bağımsız bilimsel tavsiyeler sunan EFSA bu tüzüğe dayandırılarak kurulmuştur [2,35].

Türkiye’de gıda mevzuatının tarihsel gelişimi: Türkiye’de gıda ile ilgili ilk uygulamalar 1930 yılında çıkarılan 1580 sayılı “Belediye Yasası”nda yer alan hükümler ile başlamış ve sonrasında aynı yıl yürürlüğe giren 1593 sayılı “Umumi Hıfzıssıhha Kanunu”nda daha kapsamlı olarak yer bulmuştur. Umumi Hıfzıssıhha Kanunu’na dayanılarak, 1942 yılında “Gıda Nizamnamesi”, daha sonra da 1952 yılında “Gıda Maddeleri Tüzüğü” çıkarılmıştır. 1995 yılında, 560 sayılı “Gıdaların Üretimi, Tüketimi ve Denetlenmesine Dair Kanun Hükmünde Kararname” yayımlanana kadar Türkiye’de tüm gıda mevzuatı Gıda Maddeleri Tüzüğü ve ilgili birkaç yönetmelikten oluşmuştur. Çerçeve niteliğinde bir düzenleme olan 560 sayılı Kanun Hükmünde Kararname (KHK), gıda hizmetlerine yönelik temel ve yapısal değişiklikler getirmiş, gıda üretimi yapan işletmelerin ruhsatlandırma yetkisi ve tüm gıda denetim hizmetleri Sağlık Bakanlığı’na bırakılmıştır [15,33,37].

Türkiye’nin 1963 yılında Avrupa Ekonomik Topluluğu ile ortaklık anlaşması imzalaması ile başlayan, 1987 yılında tam üyeliğe başvurması ile “Geçiş Dönemi”ne giren ve 1999 yılında adaylığının resmen onaylanması ile dönüm noktasını yaşayan Türkiye’nin AB’ye uyum sürecinde [4], 2004 yılında yürürlüğe giren 5179 sayılı “Gıdaların Üretimi, Tüketimi ve Denetlenmesine Dair Kanun Hükmünde Kararnamenin Değiştirilerek Kabulü Hakkında Kanun” ile gıda güvenliğinde AB mevzuatına uyum sağlayacak yeni bir yön çizilmeye çalışılmıştır [15]. AB’ye katılım sürecinde müzakere fasıllarından 12.si olan “Gıda Güvenliği, Veterinerlik ve Bitki Sağlığı” faslı, çiftlikten sofraya kadar tüm

süreçte gıda güvenliğinin teminini öngören kapsamlı bir mevzuat oluşturulmasını amaçlamaktadır [7]. 5179 sayılı Kanun, her ne kadar AB gıda mevzuatı temel alınarak oluşturulsa da 12. faslın açılması için gerekli olan altı açılış kriterinden “Gıda, Yem ve Veterinerlik Çerçeve Mevzuatı” kriteri için yeterli olamamıştır [22,35]. Bu kapsamda çalışmalara başlanmış ve 2010 yılında gıda güvenliği konusunda AB mevzuatına uyumlu bir Kanun olan 5996 sayılı “Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu” çıkartılarak kabul edilmiştir. Bu Kanun ile gıda ve yem güvenilirliği, halk sağlığı, bitki ve hayvan sağlığı ile hayvan ıslahı ve refahı, tüketici menfaatleri ile çevrenin korunması alanlarında düzenlemeler getirilmiş, daha önce bu konuları düzenleyen Kanunlar ile bu Kanunlara bağlı çıkarılan ikincil mevzuatlar tek çatı altında toplanmıştır. 5996 sayılı Kanun ile gıdaların denetimine ilişkin konularda tek yetki Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı’na verilmiştir [3,5].

Gıda mevzuatında risk analizi: 5996 sayılı Kanunun getirdiği en önemli yeniliklerden biri, gıda zinciri ve yem ile ilgili işlemlerde, insan sağlığı ve yaşamının en yüksek düzeyde korunması genel hedefinin sağlanması için risk analizine dayanılması zorunluluğudur [10]. 5179 sayılı Kanun risk analizinin yasal çerçevede ele alınmasında öncülük yapsa da, ulusal gıda mevzuatında risk analizine dayalı sistemin kurulması gerekliliğinin hükme bağlanması 5996 sayılı Kanun ile sağlanmıştır. Bu kapsamda gıda güvenliği alanında uluslararası kuruluşların Türkiye’deki irtibat noktası olan Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü bünyesinde Risk Değerlendirme Dairesi Başkanlığı kurulmuştur [1,3,5].

Risk analizi: Risk analizi, gıda ile ilişkili olası kimyasal, biyolojik veya fiziksel tehlikeler hakkında bilimsel bilgilerin sistematik ve şeffaf bir şekilde toplanması, analiz edilmesi ve değerlendirilmesini amaçlayıp, tanımlanan çeşitli alternatif seçeneklerinin en iyisinin seçilerek uygulanmasını sağlayan bir süreçtir [27]. Mühendislik, ekonomi ve sağlık gibi alanların yanı sıra [14,16] gıda güvenilirliği için de uygulanan risk analizi, hiyerarşik sıra olmaksızın birbirine bağlı olan risk değerlendirmesi, risk yönetimi ve risk iletişimi bileşenlerinden oluşmaktadır [3]. Risk tanımını oluşturan/kullanan kurumların görev kapsamına bağlı olarak risk ile ilgili tanımlarda bazı farklılıklar olsa da Türkiye’de [3] ve

dünya genelinde [25] gıda zincirinde fikir birliğine varılan tanımlara göre, risk; sağlık üzerinde olumsuz etki yaratma ihtimali bulunan tehlike ile şiddeti arasındaki fonksiyonel ilişkiyi ifade etmektedir. Tehlike ise; sağlık bakımından olumsuz etki yaratma potansiyeli bulunan, gıda ve yemdeki biyolojik, kimyasal veya fiziksel etmenler ile gıda ve yemin durumunu ifade etmektedir.

1. Risk Değerlendirmesi: Risk değerlendirme, bilimsel olarak tehlikenin tanımlanması, tehlikenin niteliklerinin belirlenmesi, tehlikeye maruz kalmanın değerlendirilmesi ve risk unsurlarının belirlenmesini kapsayan dört basamaklı bir süreçtir [3]. Bu tanımlama kantitatif ve kalitatif risk değerlendirmesini de kapsamaktadır [27]. Uluslararası standartlara uygun bir şekilde çiftlikten sofraya gıda güvenliğinin sağlanması, tüketime sunulan gıdalarda tehlike ajanlarının tamamen ortadan kaldırılması veya kabul edilen seviyelere getirilebilmesi için her türlü tedbirlerin alınması gerekliliğini getirmektedir. Risk değerlendirme, sistematik ve bilimsel tabanlı bir süreç olup, riskin bilinmeyenlerini mantıklı, şeffaf ve doğru belgelerle açıklamayı hedeflemektedir [30].

Gıda güvenilirliğinde risk değerlendirme kimyasal ve mikrobiyolojik olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Kimyasal risk değerlendirme gıda katkı maddeleri, gıda kontaminantları veya veteriner ilaç kalıntıları için yapılırken, mikrobiyolojik risk değerlendirme gıdalarla alınan patojen mikroorganizmaların insan üzerinde oluşturabileceği olumsuz etkileri incelemektedir [27]. Risk değerlendirmesinde detaylı bilimsel verilere ulaşmak için risk sıralamasından veya epidemiyoloji tabanlı metodolojilerden yararlanılmaktadır [28]. Risk sıralama araçları olarak; risk faktörlerini göz önüne alarak riskleri derecelendirmek ve düzenlemeleri önceliklendirmek için, çeşitli ülkeler ve kuruluşların geliştirdikleri modeller ve yazılım programları kullanılmaktadır [13,32]. Bu araçlar sayesinde birbiri ile ilişkili olan tehlikeler ve riskler karşılaştırılarak, kritik ve öncelikli olarak araştırılması gereken konuların belirlenmesi kolaylaşmaktadır [18]. Epidemiyoloji ise, özellikle tehlikenin tanımlanması ve karakterizasyonu aşamalarında oldukça önemli ve güvenilir bir bilgi kaynağı olup, bu amaçla vaka çalışmalarından, sürveyans analizlerinden ve ilgili araştırmalardan yararlanılmaktadır. Risk sıralama araçları ve

epidemiyolojik çalışmalar genellikle beraber kullanılmaktadır [8,12,28].

1.1. Tehlikenin tanımlanması: Gıda güvenilirliğinde tehlike ajanları biyolojik, kimyasal ve fiziksel olmak üzere üç grupta toplanır. Sağlık üzerinde olumsuz etki yaratacak bu tehlikelerin bilimsel sonuçlara dayalı olarak tanımlanması, risk yönetimi sürecinde yöneticilere yol göstermektedir [27].

1.2. Tehlikenin karakterizasyonu: İlgili tehlikeye maruz kalındığında oluşan olumsuz etkinin kalitatif ya da kantitatif olarak değerlendirilmesidir. Biyolojik, kimyasal ve fiziksel ajanlara maruz kalma sonucunda, tüketicide oluşan tepkiler doz-yanıt ilişkisine dayandırılarak karakterize edilmektedir [27].

1.3. Maruziyet değerlendirme: Maruziyet değerlendirme, tüketilen gıdada bulunan tehlikeler hakkında bilimsel fikir edinilmesini sağlamaktadır. Gıdadaki tehlike ajanı ve gıdanın tüketici tarafından tüketim sıklığı göz önüne alınarak, tüketicinin tehlike ajanına ne derece maruz kaldığı değerlendirilir. Sorunun niteliğine bağlı olarak gıda zincirinde üretim, depolama ve dağıtım aşamaları da dikkate alınarak değerlendirme yapılmalıdır [27]. Genellikle uygulandığı ülke veya bölgenin özel üretim, işleme ve tüketim desenine bağlı olarak oldukça spesifikdir [29].

1.3.1. Kalitatif maruziyet değerlendirme: Kalitatif maruziyet değerlendirme, riske ilişkin tüm verilerin toplanıp, derlenip, birbirleri ile ilişkilendirilip sunulduğu bir değerlendirme türüdür. Tüm olasılıkların objektif ve titizlikle ilişkilendirilebilmesi bu değerlendirme süreci için oldukça önemlidir. Kalitatif risk değerlendirme, risk yöneticilerinin hazırlık niteliğinde olan risk yönetimi faaliyetlerinin belirlenmesinde ve risklerin ileri düzeyde araştırılmasının gerekip gerekmediğine karar verme sürecinde kullanılmaktadır [27,29,30].

1.3.2. Kantitatif maruziyet değerlendirme: Kantitatif maruziyet değerlendirme, risk ve riske ilişkin belirsizliklerin sayısal veriler ve analizlerle açıklandığı değerlendirme türüdür. Bu amaçla “belirleyici” veya “olasılıksal” olmak üzere iki farklı matematiksel model kullanılmaktadır. Kantitatif risk değerlendirme, risk yönetimi sorularına kalitatif risk değerlendirmesine kıyasla daha ayrıntılı cevaplar sunar [27,29].

1.3.3. Yarı-kantitatif maruziyet değerlendirme: Yarı-kantitatif risk değerlendirmesi, kalitatif ve kantitatif risk değerlendirmesi arasında yer alan, riske ilişkin tüm verilerin elde edilemediği durumlarda riski skorlayarak değerlendirmeye yarayan bir yöntemdir. Kantitatif risk değerlendirmesindeki matematiksel modellere ya da kalitatif risk değerlendirmesindeki gibi çok detaylı veriye ihtiyaç duyulmamaktadır. Bununla birlikte tüm risk değerlendirme şekillerinde olduğu gibi bunda da erişilebilen her türlü verinin eksiksiz ve titizlikle toplanması gerekmektedir [29,36].

1.4. Risk karakterizasyonu: Risk karakterizasyonunda, tüm risk değerlendirme basamaklarında elde edilen sonuçlar birleştirilerek risk tahmini yapılmaktadır. Risk tahmini ve tehlikeye maruz kalma sonuçları, olumsuz etkilerin oluşma olasılığı tahmini ile birlikte ele alınır. Bu sayede risk yöneticilerinin, risk ile gerçekte mevcut olan problemin ne derece yakından ilişkili olduğunu görmesi sağlanmaktadır [18,27].

2. Risk yönetimi: Risk yönetimi, risk değerlendirmesi ve yasal faktörler göz önünde tutularak ilgili taraflarla istişare ile uygun olabilecek kontrol önlemlerine ilişkin alternatiflerin değerlendirilmesi, tercih edilmesi ve uygulanması sürecidir [3]. Bu sebeple, gıda güvenliği problemlerinin en iyi şekilde idare edilebilmesi için risk yönetimi anahtar rolü oynamaktadır [27]. Risk yönetimi, gıda güvenliğini tehdit eden bir durumda risk değerlendirme sonuçlarını baz alarak bir risk profili oluşturmayı, bu profile dayalı alternatif politikalar üretmek için en uygun olanını seçip uygulamayı gerektirir [23, 24]. Alternatif politikaların değerlendirilmesi risk yönetiminde kritik bir nokta olup, bu politikalar değerlendirilirken risk değerlendirmesinde elde edilen bilimsel sonuçlar ve tüketici için önemli olan ekonomik, yasal, etik, çevresel, sosyal ve siyasi faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. İlgili politikalar değerlendirilirken mutlaka ilgili kişilere danışılmalı ve risk iletişimi ile sinerji içerisinde olunmalıdır [27].

Risk yönetimi birbiriyle ilişkili dört temel aşamadan oluşmaktadır.

i) Hazırlık Niteliğinde Olan Risk Yönetimi Faaliyetleri: Gıda güvenilirliği sorununun tanımlanması, gıda güvenilirliği sorunlarının derecelen-

dirilmesi ve önceliklendirilmesi, risk değerlendirme için gerekli olup olmadığına karar verilmesi, risk değerlendirme talebinde bulunulması,

ii) Risk Yönetimi Seçeneklerinin Tanımlanması ve Seçimi: Uygulanabilir yönetim seçeneklerinin tanımlanması, tanımlanan yönetim seçeneklerinin değerlendirilmesi, risk yönetimi opsiyonlarının seçilmesi, tercih edilen risk yönetim seçeneklerinin üzerinde karara varılması,

iii) Risk Yönetimi Seçenekleri Değerlendirilmesi: Olası seçeneklerin belirlenmesi ve tercih edilenin seçilmesi,

iv) İzleme ve Gözden Geçirme: Sonuçların derlenmesi ve alınan tedbirlerin başarısının değerlendirilmesi konularını kapsamaktadır [26].

3. Risk iletişimi: Risk iletişimi, risk analizi sürecinde risk değerlendiricileri, risk yöneticileri ve diğer ilgili tarafların tehlike, risk, riskle ilgili faktörler ve riskin algılanmasına ilişkin bilgi ve görüşler ile risk değerlendirmesi bulguları ve risk yönetimi kararlarının açıklamalarını da kapsayan bilgi ve düşüncelerin paylaşımıdır [3].

Risk iletişimi, tüm paydaşlarla istişare içinde bulunarak risk yöneticilerinin gıda güvenilirliğine ilişkin sorunları en doğru şekilde tanımlamasına ve alternatif politikalar geliştirmesine katkıda bulunmaktadır [24]. Risk değerlendiricileri, risk yöneticileri, tüketiciler, endüstri, akademik kurumlar ve ilgili paydaşlar arasında sürekli ve etkileşim içinde bilgi alışverişinde bulunarak yürütülen risk iletişimi sayesinde [27]; tüketicinin risklerden haberdar olması, halkın gıdalardaki riskleri ve gıda güvenliğine yönelik standartları anlamasına katkıda bulunulması ve gıda güvenliğini sağlayan kuruluşlar bazında halkın güveninin kazanılması sağlanır [24].

Gıda güvenliğine ilişkin risklerin ve risk yöneticilerinin kararlarının açık, kesin ve tüm paydaşların kolay bir şekilde anlayacağı biçimde açıklanması oldukça önemlidir. Etkili risk iletişimi için risk değerlendirmesinin kullanılabilir ve anlaşılır olması amacıyla bilirkişiler tarafından hedef kitlelere aktarılmalıdır. Bu amaçla web siteleri, basılı yayımlar, dijital yayımlar, toplantılar ve çalıştaylar, halk istişareleri, ortak/paydaş ağları, sosyal ağlar, bloglar gibi kitle iletişim araçları kullanılabilir [11].

Sonuç

AB ile müzakere sürecinin bir getirisi olan 5996 sayılı Kanun'un yürürlüğe girmesi ile birlikte Türkiye kendine, "çiftlikten sofraya gıda güvenliği" anlayışını benimseyerek AB standartlarına uyum sağlayacak yeni bir yön çizmiştir. İlgili Kanunun uygulama sürecinde gıda mevzuatımıza giren en önemli kavramlardan biri risk analizidir. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı bu konu ile ilgili adımları atmış, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü bünyesinde hayvan sağlığı ve refahı, bitki sağlığı, yem ve gıda güvenilirliği konularında bilimsel esaslara dayalı risk değerlendirmesi yapmak üzere Risk Değerlendirme Daire Başkanlığı'nı kurmuştur [3,5]. Ancak, risk değerlendirmesi ve risk yönetimi birbirinden bağımsız olarak yürütülmesi gereken konulardır. Türkiye'de henüz Avrupa'da olduğu gibi yönetim ve değerlendirmenin birbirinden ayrı tutulduğu EFSA gibi bir kuruluş bulunmamaktadır. Bununla birlikte, "Aday ve Potansiyel Aday Ülkelerin EFSA'ya Hazırlanması Projesi"nde 2006 yılından bu yana yer alan Türkiye [17], EFSA'nın yürütmekte olduğu faaliyetlere etkin bir şekilde dahil olarak, ileride risk değerlendirmesinde EFSA gibi bağımsız bilimsel tavsiye sunan bir kuruluşun oluşturulması için gerekli çalışmaları sürdürmektedir. Böyle bir kuruluşun var olması, Türkiye'nin gıda güvenliğinde çok daha sağlam adımlar atmasına yardımcı olacaktır.

Kaynaklar

1. **Anonim**, (2004). *Gıdaların Üretimi, Tüketimi ve Denetlenmesine Dair Kanun Hükmünde Kararnamenin Değerlendirilerek Kabulü Hakkında Kanun*. T.C. Resmi Gazete, 27 Mayıs 2004, Kanun no: 5179.
2. **Anonim**, (2009). *AB gıda güvenliği anlayışı ve Türkiye'de gıda güvenliği*. Avrupa İşletmeler Ağı, İstanbul.
3. **Anonim**, (2010). *Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu*. T.C. Resmi Gazete, 13 Haziran 2010, Kanun no: 5996.
4. **Anonim**, (2011a). *Türkiye-AB ilişkilerinin tarihçesi*. Erişim adresi: <http://www.abgs.gov.tr/index.php?p=111&l=1>, Erişim tarihi: 27.08.2014.
5. **Anonim**, (2011b). *Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının Teşkilat ve Görevleri Hakkında Kanun Hükmünde Kararname*. T.C Resmi Gazete, 8 Haziran 2011, Kanun no: 639.
6. **Anonim**, (2012a). *Gıda güvenliği, veterinerlik ve bitki sağlığı politikası faslı*. Erişim adresi: http://www.ab.gov.tr/files/Bas%C4%B1nMusavirlik/haberler/gıda_guvenligi.pdf, Erişim tarihi: 24.09.2014.
7. **Anonim**, (2012b). *Katılım sürecinde müzakere fasılları*. Erişim adresi: http://www.ab.gov.tr/files/rehber/07_rehber.pdf, Erişim tarihi: 30.09.2014.
8. **Anonim**, (2012c). *Foodborne diseases active surveillance network (FoodNet)*. Erişim adresi: <http://www.cdc.gov/foodnet/studies/index.html>, Erişim tarihi: 16.09.2014.
9. **Anonim**, (2013). *Katılım müzakereleri*. Erişim adresi: <http://www.abgs.gov.tr/index.php?p=37&l=1>, Erişim tarihi: 28.11.2014.
10. **Anonim**, (2014a). *T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı risk değerlendirme hizmetleri*. Erişim adresi: <http://www.tarim.gov.tr/Konular/Risk-Değerlendirme-Hizmetleri>, Erişim tarihi: 12.08.2014.
11. **Anonim**, (2014b). *Risk iletişimi*. Erişim adresi: http://tarim.gov.tr/GKGM/Belgeler/Risk_Değerlendirme_Hizmetleri/Risk_İletişimi.pdf, Erişim tarihi: 30.11.2014.
12. **Anonim**, (2014c). *Foodborne diseases active surveillance network (FoodNet)*. Erişim adresi: <http://www.cdc.gov/foodnet/data/reports.html>, Erişim tarihi: 16.09.2014.
13. **Anonim**, (2014d). *Australia's food safety information portal-Risk Ranger*. Erişim adresi: <http://www.foodsafetymatters.com.au/riskranger.php>, Erişim tarihi: 16.09.2014.
14. **Ayyub BM**, (2014). *Risk analysis in engineering and economics, Second edition*. New York: CRC Press.
15. **Buzbaş N**, (2010). *Türkiye ve AB'de gıda güvenliği: ortaklığın sinerjisi*. 28. Türkiye-AB Karma İstişare Komitesi Toplantısı, Eylül, 13-14, Edinburg, İskoçya.
16. **Calabrese EJ**, (2010). *Hormesis is central to toxicology, pharmacology and risk assessment*. *Hum Exp Toxicol*. 29, 249-261.
17. **EFSA**, (2012). *Technical report-Implemented activities under the EFSA Pre-accession Programme-Reporting period from April 2009 until June 2012*. Parma, Italy, 342.
18. **EPA/USDA/FSIS**, (2012). *Microbial risk assessment guideline-Pathogenic microorganisms with focus on food and water*. EPA/100/J-12/00, USDA/FSIS/2012-001.
19. **Erol İ**, (2007). *Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi*. Ankara: Pozitif Matbaacılık, p. 362-363.
20. **European Commission**, (1997). *Commission Green Paper-The General Principles of Food Law in the European Union*. Brussels, COM, 176.
21. **European Commission**, (1999). *White Paper on food safety*. Brussels, COM, 719.
22. **European Commission**, (2006). *Commission staff working document-Turkey 2006 progress report*. Brussels, COM, 649.
23. **FAO/WHO**, (1997). *Risk management and food safety-Report of a Joint FAO/WHO Consultation*. Food and Nutrition Paper No. 65.
24. **FAO/WHO**, (1999). *The application of risk communication to food standards and safety matters-Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation*. Food and Nutrition Paper No. 70.

25. **FAO/WHO**, (2001). *Codex Alimentarius Commission- Procedural manual*. Twelfth edition. Italy, p. 43-44.
26. **FAO/WHO**, (2002). *Principles and guidelines for incorporating microbiological risk assessment in the development of food safety standards, guidelines and related texts*. Report of a Joint FAO/WHO Consultation.
27. **FAO/WHO**, (2005). *Food safety risk analysis part I: An overview and framework manual*. Provisional Edition. Rome, Italy.
28. **FAO/WHO**, (2006). *Food safety risk analysis-A guide for national food safety authorities*. FAO Food and Nutrition Paper. Rome, 87.
29. **FAO/WHO**, (2008). *Exposure assessment of microbiological hazards in food: Guidelines*. Microbiological Risk Assessment Series 7.
30. **FAO/WHO**, (2009). *Risk characterization of microbiological hazards in food: Guidelines*. Microbiological Risk Assessment Series 17.
31. **Finardi C, Pellegrini G, Rowe G**, (2012). Food safety issues: from enlightened elitism towards deliberative democracy? An overview of EFSA's 'public consultation' instrument. *Food Policy*. 37, 427-438.
32. **Food Safety Research Consortium**, (2004). *Constructing the analytical tools for a systems and risk-based approach to food safety-Initial framework paper for the FSRC project on prioritizing opportunities to reduce foodborne disease. Discussion Draft*. Erişim adresi: http://www.card.iastate.edu/food_safety/papers/fsrc_framework_paper.pdf, Erişim tarihi: 20.09.2014.
33. **Giray H, Soysal A**, (2007). *Türkiye'de gıda güvenliği ve mevzuatı*. TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni, 6 (6): 485-490.
34. **Gültekin E**, (2005). *Avrupa Birliği gıda politikasındaki gelişmeler ve Türkiye*. AB Uzmanlık Tezi, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Dış İlişkiler ve Avrupa Topluluğu Koordinasyon Dairesi Başkanlığı, Ankara.
35. **Kilit G**, (2013). *Avrupa Birliği ve Türkiye'de gıda güvenliği ve son gelişmeler. İktisadi Kalkınma Vakfı Değerlendirme Notu*. Erişim adresi: http://ikv.org.tr/images/upload/data/files/gida_guvenligi_degerlendirme_notu_72.pdf, Erişim tarihi: 27.10.2014
36. **Radu LD**, (2009). *Qualitative, semi-quantitative and quantitative methods for risk assessment: case of the financial audit*. *Annals of the Alexandru Ioan Cuza University*. 56, 643-657.
37. **Türker S**, (2012). *Türkiye'de gıda güvenliği ve gıda mevzuatının gelişim süreci*. *Sağlık Düşüncesi ve Tıp Kültürü*. 21, 34-37.

Ixodid kenelerle mücadelede kimyasal akarisitlere alternatif yollar

Perçem ATAN¹, Kader YILDIZ¹

¹ Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

Geliş Tarihi / Received: 08.06.2015, Kabul Tarihi / Accepted: 07.07.2015

Özet: Ixodidae ailesindeki kenelerle başarılı mücadelenin hedefi dişi kenenin yeni bir nesil oluşturmasının önüne geçilmesidir. Bu amaçla günümüzde en yaygın kullanılan yol kimyasal akarisit uygulamalarıdır. Ancak kenelerde akarisitlere karşı gelişen direnç ve çiftlik hayvanlarında et ve süt ürünlerindeki ilaç kalıntıları gibi sebeplerle kimyasal akarisitlere alternatif mücadele metotlarının geliştirilmesi gereksinimini ortaya çıkarmıştır. Steril erkek kene üretilmesi, aşı geliştirilmesi ve kenelere dirençli hayvanların yetiştirilmesi uygulamaları kene ile mücadelede alternatif yöntemler arasındadır.

Anahtar kelimeler: Alternatif metotlar, Ixodidae, kene, kimyasal akarisit

Alternative ways of combating with Ixodidae tick by chemical acaricide

Summary: The target of a successful control against Ixodidae spp. is to avoid creating a new generation of female ticks. For this purpose, chemical acaricide applications are now the mostly widely used. However, alternative control methods need to develop due to developing acaricide resistance in ticks and drug residues in meat and dairy products of farms animals. Sterile male technique, vaccine and raising of animals resistant to ticks are alternative methods of tick control.

Key words: Alternative methods, Ixodidae, tick, chemical acaricide

Giriş

Ixodidae ailesinde yer alan *Ixodes*, *Hyalomma*, *Amblyomma*, *Haemophysalis*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* ve *Rhipicephalus (Boophilus)* cinsleri hem veteriner hem de insan hekimliği yönünden önemli kene türlerini barındırmaktadır [24]. Keneler insan ve hayvanlara pek çok patojen bulaştıran, kanla beslenen zorunlu ektoparazitlerdir. Günümüzde küresel ısınmaya bağlı iklim değişiklikleri sebebiyle insan ve hayvanlarda kene ile taşınan hastalıkların arttığı görülmektedir [20].

Ixodidae ailesindeki kenelerle başarılı mücadelenin hedefi dişi kenenin yeni bir nesil oluşturmasının önüne geçilmesidir. Bu amaçla günümüzde kullanılan en yaygın yöntem kimyasal akarisit uygulamalarıdır [16]. Akarisitler, daldırma banyoları, sprey, damlatma ve dökme şeklinde uygulanır [22]. Akarisit kullanımında önerilen uygulama direktiflerine mutlaka uyulmalı ve doz aşımı hususunda dikkatli olunmalıdır. Çiftlik hayvanları ve insanlar için toksik nitelikte bileşikler olan akarisitler hayvan dokularında kalıntı bırakmasının yanı sıra çevre için de tehlike oluşturmaktadır [20]. Kenelerde gelişen akarisit direnci ve çiftlik hayvanlarında et

ve süt ürünlerindeki ilaç kalıntıları sebebiyle kimyasal akarisitlere alternatif mücadele metotlarının geliştirilmesi gereksinimini doğurmuştur [16,18]. Bu kapsamda kene ile mücadele amacıyla değişik yöntemler kullanılmaktadır. Steril erkek kene üretilmesi, aşı geliştirilmesi ve kenelere dirençli hayvanların yetiştirilmesi uygulamaları günümüzde kene ile mücadelede kullanılan başlıca alternatif yöntemler arasındadır. Bu derlemede en sık kullanılan bu yöntemler ayrıntılı biçimde açıklanacaktır.

Steril erkek kene üretilmesi

Steril erkek kene üretilmesi yöntemi, doğadaki kenelerle çiftleşecek çok sayıda kısır erkek kenenin üretilmesi ve doğaya bırakılması yoluyla kenelerin üreme potansiyelinin düşürülmesi ve zamanla doğadaki kene popülasyonunun azaltılması prensibine dayanmaktadır. Bu yöntemde erkek kenelerin kullanılmasındaki amaç steril erkekle çiftleşen dişinin yumurtalarından yeni neslin oluşumunun tümünden veya kısmen baskılanmasıdır [2]. Sterilite işlemi kenenin gamma radyasyonla iradiye edilmesi veya RNA interferansı metodu ile yapılmaktadır [2,8]. Gamma radyasyonla yapılan irradiasyonda erkek keneler kullanılmaktadır [2]. Bu teknik kullanılarak

yapılan mücadelede doğaya çok sayıda irradiye etkek kene salınması gerektiğinden pratiğe uygulanmasında bazı sınırlamalar mevcuttur.

RNA interferansı (RNA'i), canlı hücrelerde bulunan ve hangi genin nasıl aktif olacağını belirleyen ve kontrol eden bir sistemdir. RNA'i ile "genin susturulması" *Dermacentor variabilis*'teki subolesin geninde kullanmıştır [8]. Subolesin, kene beslenme ve üremesinde rol alan ve kene türleri arasında yüksek oranda korunmuş bir proteindir, rekombinant protein olarak kullanıldığında tüm kene gelişim safhalarına karşı konakta bağışıklık şekillendirmektedir [21]. RNA'i ile subolesin geninin susturulması, kenenin hayatta kalmasını ve üremesini azaltmasının yanı sıra kenenin dokularının (bağırsak, tükürük bezleri, üreme dokuları ve embriyolar) genetik olarak bozulmasına yol açarak kısır kenelerin şekillenmesine neden olmaktadır. RNA'i tekniği daha önce ekin zararlıları ile mücadelede başarılı olmuş olsa da bu metodun kene kontrolündeki potansiyeli büyük ölçekli saha testleri ile henüz araştırılmamıştır. Bununla birlikte, RNA'i ile kenelerde sterilite oluşturulması ile yapılacak kene mücadelesinde doğaya çok sayıda "subolesin-susturulmuş kenenin" salınmasını gerektirmesi bu yöntemin pratiğe aktarımında sınırlama teşkil etmektedir. Bunun yanı sıra genetiği değiştirilmiş kenelerin doğaya salınması konusunda bazı endişeler de mevcuttur [8,21].

Kene aşıları

Vektör ve patojen genomu ve proteomu konusundaki ilerlemeler, kene proteinlerini hedefleyen aşuların hem kenelerin beslenmesini ve üremesini hem de kenedeki patojenlerin omurgalı konağa geçmesini ve bulaşmasını azaltabildiğini göstermiştir [20]. Aşı geliştirme süreci ile yeni bir pestisit geliştirme süreci kıyaslandığında, aşının daha ucuz bir teknoloji ile üretilebilir ve sürdürülebilir bir potansiyele sahip olduğu görülür. Aşılama, çevreyle daha dost bir yöntem olduğu için, kene yayılışının ve kene kaynaklı enfeksiyonların kontrolü için ilgi çekici bir alternatiftir. Aşılama ile hem vektör hem de kene ile taşınan çeşitli hastalıklar kontrol edilebilir [20].

Anti-kene aşısı geliştirmedeki en önemli husus uygun antijenlerin bulunmasıdır. Aşı için kullanılacak antijenleri tanımlamak için farklı yöntemler kullanılmaktadır. En çok uygulanan yöntem ise

parazite karşı konakta gelişen bağışıklık cevabının anlaşılması ve bunun sonucunda aşuların geliştirilmesidir [8]. Biyoinformatik, RNA'i, mutasyon, transkriptomik, proteomik, bağışıklama ifade kütüphanesi (ELI) ve diğer teknolojiler kullanılarak kene genomlarının karakterizasyonunda önemli gelişmeler sağlanmıştır [16]. Kenenin beslenmesini engellemek amacıyla, aşılama yoluyla bir immünojenik cevap üretmek mümkündür. Kene antijenleri genellikle ya "exposed (görünür)" veya "concealed (gizli) antijenler" olarak kabul edilir. Görünür antijenler kene enfestasyonu sırasında konak bağışıklık sistemi ile temas eden antijenler olup sürekli kenelerle enfeste olan konaklar bu antijenlere karşı bağışıklık kazanırlar. Antijenlerin ikinci grubunu oluşturan gizli antijenler ise normal şartlar altında immünojenik cevaba neden olmazlar ve konak bağışıklık sistemine maruz kalmazlar [8]. Kenenin bağırsağında mevcut immünojenik proteinler gizli antijenlere örnek verilebilir, aşılama yoluyla bu proteinlere karşı konakta antikor gelişmesi sonucu kene konak üzerinde beslenirken bu spesifik immünooglobulinleri de alır ve bunlar da kenelerde olumsuz etki oluşturur [16].

Spesifik kene antijenleri arasında ticarileşen ilk ürün Bm86 proteindir. Bu antijen gömlek değiştirme dönemi öncesinden başlayarak doymuş ergin kene oluncaya kadar tüm yaşam çemberi boyunca salgılanmaktadır. Bm86 ile immünize edilen konakta bu protein dışı kenelerin sayısını, ağırlığını ve üreme kapasitesini azaltan antikor-antijen etkileşimi oluşturmaktadır. Sonuç olarak keneye taşınan bazı patojenlerin yayınlığı da dolaylı olarak bu durumdan etkilenmektedir [20]. Sığırlardaki enfestasyonları kontrol edebilmek amacıyla 1990'ların başında ticari olarak piyasaya sunulan kene aşuları olan TickGARD ve Gavac, *Rhipicephalus micropus* kenesinin orta mide kısmında bulunan Bm86 proteininden rekombinant teknoloji ile üretilmiştir [9,10,20]. Sığırlarda Bm86 temelli aşuların koruyucu etkisi kapsamlı saha çalışmaları ile doğrulanmış, konak üzerindeki çok sayıda ergin kenede ölüm şekillenmiş, hayatta kalan ergin kenelerin yumurtlama kapasiteleri olumsuz yönde etkilenmiştir. Aşılanmış sığırlardan kan emen kenelerin yumurtlarından çıkan larva sayısında ve bunların yaşama kabiliyetinde de azalma şekillenmiştir [23]. Sonuçta sığır sürülerinde hem kene enfestasyonlarında hem de

babesiosis yaygınlığında azalma meydana geldiği gözlenmiştir [20].

Gavac ve TickGARD, sığırlarda *Boophilus annulatus*'a karşı %100 koruma sağlarken *Rhipicephalus appendiculatus* ve *Amblyomma variegatum* üzerine etkisi neredeyse sıfır olmuştur. *Hyalomma dromedarii* ve *Hyalomma anatolicum* üzerindeki çalışmalar sınırlı olsa da aşının güçlü etki gösterdiği belirlenmiştir [10,27]. Ticari olarak geliştirilen Bm86 bazlı aşilar sığırlardaki kene enfestasyonlarını kontrol etmede etkili olmakla birlikte, enfestasyondan sorumlu kenelerin türüne bağlı olarak farklı düzeylerde etki göstermesi nedeniyle bu aşı formülasyonlarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur [27]. Buna ilişkin olarak diğer kene türlerinde Bm86 ortologları ve homologları keşfedilmiştir.

Ba86, Bm86'ya %90'dan fazla benzerlik gösteren rekombinant bir *R.annulatus* Bm86 ortolog proteindir. Sığırlardaki deneysel çalışmalar, rekombinant Ba86'nın *R.annulatus* ve *R.microplus* enfestasyonlarını kontrol etmede daha etkili olduğunu göstermiştir [14]. *H.anatolicum*'un Bm86 homologunun klonlanması ile elde edilen ilk rekombinant protein olan Haa86 ile sığırların aşılmasının hem kenelere karşı koruma sağladığını hem de keneler yoluyla *Theileria annulata*'nın taşınmasının azaldığı bildirilmiştir [1]. *R.microplus* Bm95 glikoproteininin Güney Amerika'da Bm86 aşısı ile korunma sağlanamayan sığırları kene enfestasyonuna karşı koruduğu bildirilmiştir [5]. Bm95'le yapılan çalışmalar, bu antijenin daha çok kene türüne karşı koruma sağladığını göstermiş ve Bm95'in, farklı bölgelerdeki *R.microplus* türleri ile olan enfestasyona karşı daha evrensel bir antijen olabileceğine işaret etmiştir [20].

Günümüzde kenenin tükürük bezinden salınan moleküller, kene enfestasyonlarını sınırlandırıp kene kaynaklı patojen aktarımını engelleyen anti-kenne aşiları için potansiyel adaylar olarak değerlendirilmektedir [20]. Konak üzerinde yavaş beslenen bir parazit olan kenenin, beslenmesini tamamlamak için gerekli olan süre boyunca yapışık kalabilmesi için konağın bağışıklık sistemini baskılaması gereklidir. Kenenin farklı tükürük bileşenlerinin konakta immunsupresif ve immunmodülatör etkilerinin yanı sıra, bazıları da koruyucu bir bağışıklık tepkisi tetikleme yeteneğine sahip antijenler gibi davranır [9,18]. Eklembacaklı vektörler beslenme sırasında

konakta bağışıklık sistemini baskırlar ve konaktan gelen immun reaksiyona karşılık olarak patojeni güçlendirici bir takım faktörler salgılar. Örneğin kene, Lyme hastalığı ajanı *Borrelia burgdorferi*'nin memeli konağa naklini kolaylaştırmak için tükürük proteinlerini kullanır. Beslenme sırasında, kene tükürük bezleri patojen aktarımını kolaylaştıran çok çeşitli moleküller salgılar [20].

Kenenin tükürük bezi proteinlerinden biri olan 64TRP memeli konağın deri proteinlerine benzemektedir. Hamster, beyaz fare ve tavşan modellerinde bu antijenin, kenenin tutunduğu yeri hedeflediği ve "gizli" orta mide antijenleriyle çapraz reaksiyona girip kenelerin ölümüyle sonuçlanan çift etkili bir aşı görevi gördüğü belirlenmiştir. Histolojik ve immünositolojik çalışmalar, 64TRP immünizasyonunun temel etki yönteminin, kenenin deride beslendiği yerde meydana gelen lokal kütanöz gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonu olduğuna işaret etmiştir [17]. 64TRP antijeniyle aşılana farelere *I.ricinus* tarafından ensefalit virüsünün aktarılmasının önlediğini ve dolayısıyla patojen aktarımı üzerinde koruyucu bir etkisi olduğu gösterilmiştir [17].

Salp15, konakta immünosupresif özelliğe sahip bir diğer kene tükürük proteini olup konakta CD4+ T hücresi aktivasyonunu, komplement aktivitesini ve dendritik hücre işlevini engellemektedir [7].

Kenelere karşı aşı geliştirilmesi amacıyla kullanılan proteinlerden biri de ferritinlerdir. Ferritinler, kenenin beslenmesi sırasında demir homeostazında öncü bir rol oynayan demir depolama proteinleridir. Omurgalılarda işlevsel ortologları olmayan Ferritin2 yakın zamanda kene hemolenfinde salgılanan bir mide-spesifik protein olarak karakterize edilmiştir ve orada bir demir taşıyıcısı olarak görev yaptığı tespit edilmiştir [20]. RNA'yi ve rekombinant proteinli aşılama yoluyla Ferritin2'nin (RmFER2) bloke edilmesi, *I.ricinus*, *R.microplus* ve *R.annulatus*'ta beslenmenin, yumurtalamanın ve fertilitenin azalmasıyla sonuçlanmıştır [20]. TROSPA, *B.burgdorferi*'den salınan OspA için bir kene reseptörüdür ve kenenin orta midesinde tespit edilmiştir [12]. TROSPA'nın fizyolojik işlevi bilinmemektedir fakat *B.burgdorferi*'nin kene midesinde çoğalması ve böylece vektördeki bakteriyel enfeksiyonu desteklemesi için OspA'nın TROSPA'ya bağlanması gerekmektedir [12]. TROSPA'nın TROSPA antiserumlarıyla veya RNA'yi yoluyla

bloke edilmesi, *B.burgdorferi*'nin *I.scapularis* midesinde çoğalmasını azaltmakta ve sonuç olarak vektörde mevcut bakterilerin kolonizasyonunu ve potansiyel olarak konağa patojen aktarımını engellemektedir. Bakteriyelel OspA, patojen aktarımını engelleyen bir Lyme hastalığı aşısı olarak kullanılmıştır. Kan emme esnasında kene tarafından konağa *B.burgdorferi*'nin aktarımı gerçekleşmeden önce konak kanında bulunan anti-OspA antikorları kene midesindeki spiroketleri yok etmektedir [12,20]. Serpinler (serin proteaz inhibitörleri) kan ile beslenen eklembacaklılar dahil olmak üzere çok çeşitli organizmalarda bulunan, yapısal olarak birbiri ile ilişkili proteinlerden oluşan büyük bir ailedir. Organizmada kan pıhtılaşması, gıda sindirimi, yanğısal ve immün yanıtlar gibi pek çok önemli işlevi düzenledikleri bilinmektedir, dolayısıyla da kene aşısı geliştirmede ilgi çekici hedef antijenlerdir [12]. Farklı serpinlerin birleştirilerek sığırların aşılanması, *Haemaphysalis* ve *Rhipicephalus* cinsi kenelerin beslenme oranlarını azaltmakta ve kenelerde ölüm oranlarını artırmaktadır [12]. Bu immunizasyon *T.parva*'nın sığırlara bulaşmasını önlemediği ancak patojenin periferik kanda görülmesini birkaç gün geciktirdiği belirlenmiştir. Bu durum aşının memeli konağa patojen aktarımını üzerinde de bir etkisi olduğuna işaret etmektedir [13,20].

Kenelere dirençli hayvan ırklarının geliştirilmesi

Kene enfestasyonlarına karşı doğal konak direncinin keşfedilmesini takiben kene enfestasyonunun önlenmesinde keneye dirençli sığır biyotiplerinin yetiştirilmesi yöntemi alternatif mücadele yöntemleri arasına girmiştir [4,25]. Kene enfestasyonuna dirençli sığır yetiştiriciliğinde konak immün sistemi esas rol oynar [25]. Kene direnç mekanizmalarının belirlenmesi amacıyla farklı sığır ırkları üzerinde yapılacak çalışmalar alternatif kontrol metodlarının geliştirilmesine ciddi katkılar sağlayacaktır.

Sığırların keneye karşı olan dirençlerini morfolojik, fizyolojik ve davranışsal özellikler gibi çok çeşitli faktörler etkilemektedir. Örneğin konağın vücut büyüklüğü hayvan üzerindeki kene miktarını etkilemektedir. Büyük cüsseli hayvanlar küçüklere göre kene enfestasyonundan daha çok etkilenmektedir. İnek ve düvelerde, danalara göre kene direncinin daha yüksek olduğu ve bunun testosteron hormonundan kaynaklandığı düşünülmektedir [11].

Kene enfestasyonuna karşı şekillenen direnç mekanizmasının temelinde sığırlarda doğuştan olan ve pek çoğu da yüksek derecede kalıtsallığa sahip deri özellikleri bulunmaktadır. Kenenin tutunması için uygun olmayan deri yapısına sahip olmak sığırdaki kene enfestasyonuna karşı önemli bir direnç unsurudur. Kılların uzunluğu, kalınlığı, pürüzsüzlüğü ve rengi gibi fenotipik karakterler sığıra tutunan kene sayısı üzerinde etkiye sahiptir. Kısa, pürüzsüz (tutunma açısından) ve açık renkli kıllara sahip deriye daha az kenenin tutunduğu tespit edilmiştir [19].

Kene antijenlerine karşı şekillenen kutanöz hipersensitivite reaksiyonlar da konak direncini etkilemektedir. Enfestasyonun hemen başında konak derisinde şekillenen hipersensitivite reaksiyonu kenenin tutunmasını engeller. Dirençli konaklarda kenenin tutunduğu yerde bol miktarda mononükleer, eozinofil ve bazofil lökositler izlenmiştir [18]. Kene direncinde kendi kendini tımar etme davranışı önemlidir. Bu davranışın temelinde derideki sitoplazmik granül içeren mast hücreleri ve histaminler bulunmaktadır. Kenenin tutunduğu yerden salınan histaminler konağın tımar isteğini oluşturmada ve böylece kenenin tutunmasını engellemektedir [6]. Daha seçici beslenme davranışlarından dolayı genç hayvanlar diğerlerine göre daha az kene taşımaktadırlar [18].

Kenelere karşı konak direnci ırklar arasında farklılık göstermektedir. Avrupa ırklarının (*Bos taurus*) doğal koşullar altında, melez Hint ırklarına göre 2,5 kat daha fazla kene taşıdığı gözlenmiştir [3]. Afrika'da doğal olarak yetişen sığır ırkları ithal melez sığırlara göre kenelere karşı daha fazla direnç göstermektedirler. Diğer taraftan Avustralya ve Brezilya gibi ülkelerde keneye dirençli melez ırklar geliştirilmiştir [18].

Konağın ektoparazitlere karşı genetik direncinin süt verimi ya da büyümede olduğu gibi kalıtsal olduğu ve seleksiyonla konakta kene direncinin çok yüksek seviyelere taşınabileceği düşünülmüştür [4]. Hayvanlarda keneye karşı genetik değişim çok yavaş şekillenmesine rağmen kene direnci bakımından seleksiyon yapılması önemli bir seçenek kabul edilmektedir [4]. Ancak kenelere karşı direnç yönünden yapılacak seleksiyonunun, hayvanlarda büyüme, et kalitesi ve süt verimliliği gibi diğer üretim özelliklerini etkilememesi gerektiği dikkate alınmalıdır [15,18].

Sığırlarda keneye karşı direncin belirlenmesinde “fenotipin” baz alınarak seleksiyon yapılması önemli bir kısıtlamadır. Bu sebeple direnç tespitinde moleküler genetik yöntemler daha çok kullanılmakta [18], aday genlerin belirlenmesi üzerinde çalışılmaktadır [25]. Sığırlarda, lökosit antijen kompleksi (BoLA) olarak bilinen majör histocompatibility complex (MHC) allellerinin kene enfestasyonu ile ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur [25]. Oldukça polimorfik olan BoLA genindeki mikrosatellit markerlarının (işaretleyicilerin) bulunması ile doğal ve deneysel kene enfestasyonları esnasında sığırlarda MHC lokusu için direnç alellerinin haritası oluşturulmuştur [25]. Ancak BoLA allelinin kene direnci ile ilgili çalışmalardan elde edilen sonuçlar birbiriyle uyumlu olmamıştır [18]. Daha sonraki çalışmalarda BoLA polimorfizmine göre seçilen DNA mikrosatellit markerlarına göre sığırdaki 23. kromozomda keneye karşı konak direncini etkileyen genetik varyasyon tespit edilmiştir [26]. Gen ifadesi profillerinden elde edilen sonuçlar sığırlarda keneye karşı bağışıklıkta rol oynayan aday genlerin belirlenmesi için alternatif bir metot olarak ümit vermektedir. cDNA mikroarrayler (mikroçip) kullanılarak yapılan bir çalışmada Adaptaur ırkı sığırlarının derisinde kene direnci ile ilgili 66 direnç geni tanımlanmış ve direncinin deri yapısıyla ilgili genlerle açıklanabileceği ileri sürülmüştür [26].

Çiftlik hayvanlarında bağışıklıkla ilişkili Quantitative trait loci (QTL) saptanmıştır [18]. QTL ile genetik teknolojilerdeki gelişmeler hayvanların genotiplerini bireysel olarak değerlendirmek için bir fırsat sunmaktadır. İlgili gen lokusların yerleşiminin bilinmesi, ekonomik önemi olan özelliklerde seçimin etkisini artırmak amacıyla faydalanılabilen, genotip ve fenotip arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla tahmini bir eşitlik veren referans bir popülasyonun yetiştirilmesi için kullanılabilir. Bu genom tarama yöntemi, çeşitliliğe neden olduğu sanılan birçok genin kompleks özellikleri için etkili bir şekilde kullanılır. Tek nükleotid polimorfizmi (SNP) analizlerini kullanılarak, konakta kene direncine bağlı olan ve immün sistemi etkileyen birçok gen rapor edilmiştir [18].

Sonuç olarak, kene ve kene kaynaklı hastalıklar hayvan yetiştiriciliği ve sağlığı bakımından önemli oranda ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Klasik kene kontrol yöntemi olan kimyasal akarisitler kısa vadede düşünüldüğünde yüksek etki oranı ve hızlı sonuç vermesi gibi bazı avantajları dolayısıyla cazip görünmekle beraber uzun vadede kenelerin bu akarisitlere direnç kazanması sonucunda mücadele daha imkansız hale gelebilecektir. Daha da önemlisi bu akarisitlerin hayvansal ürünlerde kalıntı bırakması insan sağlığı açısından son derece önemli riskler taşımaktadır. Akarisitlerin parazit olmayan eklembacaklılar üzerine olumsuz etkilerinden dolayı doğal denge üzerinde de istenmeyen etkilerinin olduğu bir gerçektir. Akarisitlerden vazgeçip doğal mücadele yöntemlerine geçmek hemen mümkün değildir ancak kademeli olarak akarisit uygulamaları azaltılıp, doğal ve çevre dostu mücadele yöntemlerine geçilmelidir.

Kaynaklar

1. **Azhahianambi PI, De La Fuente J, Suryanarayana VV, Ghosh S, (2009).** *Cloning, expression and immunoprotective efficacy of rHaa86, the homologue of the Bm86 tick vaccine antigen, from Hyalomma anatolicum anatolicum. Parasite Immunol, 31, 111-122.*
2. **Bakırcı S, Bilgiç HB, Karaer Z, Düzgün A, Emre Z, (2013).** *Studies on the application of the sterile-male technique on the tick Hyalomma excavatum. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 60, 93-98.*
3. **Bianchin I, Catto JB, Kichel AN, Torres RAA, Honer MR, (2007).** *The effect of the control of endo and ectoparasites on weight gains in crossbred cattle (Bos taurus taurus × Bos taurus indicus). Trop Anim Health Prod, 39, 287-296.*
4. **Budeli MA, Nephawe KA, Norris D, Selapa L, Bergh L, Maiwashe A, (2009).** *Genetic parameter estimates for tick resistance in Bonsmara cattle. S Afr J Anim Sci, 39, 321-327.*
5. **Canales M, Labruna M, Soares J, Prudencio C, De La Fuente J, (2009).** *Protective efficacy of bacterial membranes containing surface exposed BM95 antigenic peptides for the control of cattle tick infestations. Vaccine, 27, 7244-7248.*
6. **Dai J, Narasimhan S, Zhang L, Liu L, Wang P, Fikrig E, (2010).** *Tick histamine release factor is critical for Ixodes scapularis engorgement and transmission of the Lyme disease agent. PLoS Pathog, 24, 6, e1001205.*
7. **Dai J, Wang P, Adusumilli S, Booth CJ, Narasimhan S, Anguita J, (2009).** *Antibodies against a tick protein, Salp15, protect mice from the Lyme disease agent. Cell Host Microbe, 6, 482-492.*
8. **De La Fuente J, Almazan J, Naranjo C, Blouin V, Mezer EF, Kocan JM, (2006).** *Autocidal control of ticks by silencing of a single gene by RNA interference. Biochem Biophys Res Commun, 344, 332-338*

9. De La Fuente J, Kocan KM, (2006). *Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. Parasite Immunol*, 28, 275-283.
10. De La Fuente J, Rodriguez M, Montero C, Redondo M, Garcia JC, Mendez L, Serrano E, Valdes M, Enriquez A, Canales M, Ramos E, Boue O, Machado H, Leonart R, (1999). *Vaccination against ticks (Boophilus spp.): the experience with the Bm86-based vaccine GavacTM. Genetic Analysis-Biomolecular Engineering*, 15, 143-148.
11. Hughes VL, Randolph, SE, (2001). *Testosterone depresses innate and acquired resistance to ticks in natural rodent hosts: a force for aggregated distributions of parasites. J Parasitol*, 87, 49-54.
12. Hovius JW, Vandam AP, Fikri GE, (2007). *Tick- host-pathogen interaction in Lyme borreliosis. Trends Parasitol*, 23, 434-438.
13. Imamura S, Konnai S, Vazida S, Yamada S, Nakajima C, Ito Y, (2008). *Effects of anti-tick cocktail vaccine against Rhipicephalus appendiculatus. Jpn J Vet Res*, 56, 85-98
14. Jeyabal L, Azhahianambi P, Susitha K, Ray DD, Chaudhuri P, Vanlahmuaka T, (2010). *Efficacy of rHaa86, an orthologue of Bm86, against challenge infestations of Hyalomma anatolicum anatolicum. Transbound Emerg Dis*, 57, 96-102.
15. Jonsson NN, Mayer DG, Green PE, (2000). *Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (B. microplus). Vet Parasitol*, 88, 79-92.
16. Kiss T, Cadar D, Spinu M, (2012). *Tick prevention at a crossroad: New and renewed solutions. Vet Parasitol*, 187, 357- 366
17. Labuda M, Trimmell AR, Lickova M, Kazimirova M, Davies GM, Lissina O, (2006). *An antivektor vaccine protects against a lethal vector-borne pathogen. PLoS Pathog*, 2:e27.
18. Mapholi NO, Marufu MC, Maiwashea A, Bangaa CB, Muchenjec V, Neila DMM, Chimonyob M, Dzamae K, (2014). *Towards a genomics approach to tick (Acari: Ixodidae) control in cattle. Ticks Tick-borne Dis*, 5, 475-483.
19. Marufu MC, Chimonyo M, Dzama K, Mapiye C, (2011). *Tick prevalence in cattle raised on sweet and sour rangelands in semiarid areas. Trop Anim Health Prod*. 43, 307-313.
20. Merino O, Alberdi P, De La Lastra JMP, De La Fuente J, (2013). *Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. Front cell infect microbiol*. 3, 30.
21. Merino O, Almazan C, Canales M, Villar M, Moreno CJA, Estrada PA, Kocan K, De La Fuente J, (2011). *Control of Rhipicephalus (Boophilus) microplus infestations by the combination of subolesin vaccination and tick autocidal control after subolesin gene knockdown in ticks fed on cattle. Vaccine*, 29, 2248-2254.
22. Taylor MA, Coop RL, Wall RL, (2007). *Veterinary Parasitology, 3rd ed, Wiley-Blackwell*.
23. Turner LB, Harrison BE, Bunch RJ, Port NLR, Barendse W, (2010). *A genome-wide association study of tick burden and milk composition in cattle. Anim Prod Sci*, 50, 235-245
24. Tüzer E, Toparlak M, Göksu K, (1997). *Veteriner Entomoloji. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Ders Notu*.
25. Untalan PM, Pruett JH, Steelman CD, (2007). *Association of the bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3*4401 allele with host resistance to the Lone Star tick, Amblyomma americanum. Vet Parasitol*, 145, 190-195.
26. Wang YH, Reverter A, Kemp D, McWilliam SM, Ingham A, Davis CA, Moore RJ, Lehnert SA, (2007). *Gene expression profiling of Hereford Shorthorn cattle following challenge with Boophilus microplus tick larvae. Aust J Exp Agric*, 47, 1397-1407.
27. Willadsen P, Bird P, Cobon GS, Hungerford J, (1995). *Commercialisation of a recombinant vaccine against Boophilus microplus. Parasitology*, 110, 43-50.

Biyolojik Maddelerin Kurutularak Saklanması: Liyofilizasyon

Züleyha ERGÜN¹

¹ Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Md., Viral Aşı Üretim Laboratuvarı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 06.07.2015, Kabul Tarihi / Accepted: 13.07.2015

Özet: Organik maddelerden suyun uzaklaştırılması sürecini tanımlayan liyofilizasyon, günümüzde tüm dünyada gerek sağlık endüstrisinde ve gerekse gıda endüstrisinde çok fazla kullanım alanı bulan bir tekniktir. Bu teknikte azaltılmış basınç (vakum) altında, dondurulmuş haldeki solüsyonlardan suyun uzaklaştırılması ile biyolojik maddeler ve gıdalar, bozulma meydana gelmeden uzun süre saklanabilmektedir. Liyofilizasyonun, uzun bir süreç olması, sıcaklık ve basıncın içinde bulunduğu hassas dengeler üzerine kurulmuş olması gibi dezavantajları bulunmasına rağmen halen dünyada sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu teknik, aslen eski bir yöntem olmasına karşın biyolojik ve organik maddelerin saklanmasına ilişkin daha etkin bir teknik geliştirilemediğinden günümüzde tüm dünyada halen etkinliğini ve önemini korumaktadır. Bununla birlikte prensipte aynı olmakla birlikte liyofilizasyon teknolojisi sürekli geliştirilmektedir.

Anahtar kelimeler: Liyofilizasyon, liyofilizasyon basamakları, liyofilizasyon dezavantaj/avantajı, liyofilizasyon mekanizması, liyofilizasyon metotları (dondurma, birincil kurutma, ikincil kurutma)

Protection of biological materials by drying: Lyophilization

Summary: Lyophilization which defines the process of evaporating the water from organic materials is a widely used technique over the world including health and food industries. This technique provides long term storing of biological materials and food by removing the water from frozen solutions under low pressure (vacuum). Although lyophilization has some disadvantages such as being a time taking process and built delicate balances involving temperature and pressure, it is still commonly used over the world. Even though it is originally an old technique, there has not been developed a more effective technique for long term storing of biological and organic materials yet. For this reason, lyophilization still protect its importance and effectiveness. Though their basic principles are the same, novel lyophilization techniques are continuously developing.

Key words: Lyophilization, Lyophilization disadvantages/advantages, Lyophilization mechanism, Lyophilization methods (freezing, primary drying, and secondary drying), Lyophilization steps

Giriş

Su hücreler içerisindeki biyokimyasal aktiviteleri destekleyen evrensel bir çözücüdür. Bu sayede canlılık işlemleri ve metabolik aktiviteler kesintisiz devam etmektedir. Daha basit şekliyle; su olmadığında hayat diye tanımladığımız döngü durmaktadır. Dolayısı ile su hayat için esansiyeldir. Ancak aynı zamanda su, depolanmış ürünlerin bozulmasında da önemli bir rol oynamaktadır [7]. Özellikle bozulma ve çürüme organizmalarının çoğalması ve otoliz süreci için de gereken ortamı sağlamaktadır. Bu sebeplerden dolayı çabuk bozulmaya meyilli ürünlerin dayanıklılığının artırılması için suyun bu ürünlerden uzaklaştırılması gerekmektedir [3]. Organik maddelerden suyun uzaklaştırılması sürecini liyofilizasyon ve freeze drying terimleri tanımlamaktadır. Bu iki terim kökende aynı süreç, prensip ve meka-

nizmaları tanımlamakla birlikte, “liyofilizasyon” terimi daha çok farmasötik ve medikal endüstride kullanılırken; “freeze-drying” terimi, daha çok gıda endüstrisinde kullanılmaktadır [8,28].

Liyofilizasyon kısaca, yiyecek ve biyolojik ürünlerin bozulmadan kalmasını sağlamak ve oda sıcaklığında daha kolay depolayabilmek amacıyla bu ürünlerden suyun uzaklaştırılması sürecidir. Daha teknik olarak ifade etmek gerekirse; azaltılmış basınç (vakum) altında dondurulan solüsyonlardan suyun uzaklaştırılması prensibine dayanan bir kurutma yöntemidir [18,22].

Liyofilizasyonun tarihçesi, Eskimoların avladıkları balıkları soğuk, kuru Arktik rüzgarlara maruz bırakarak suyunu uçurması ile başlamaktadır [3].

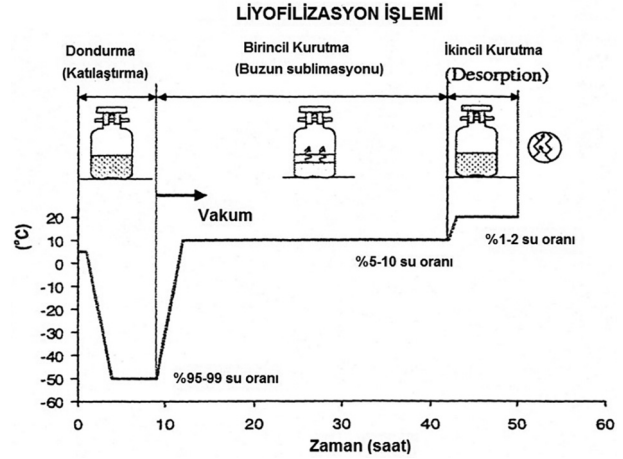
Endüstriyel bir işlem olarak liyofilizasyonun tarihçesi ise oldukça yakın bir tarihe dayanmaktadır. Her ne kadar Altman 1890'lı yıllarda histolojik kesitlerin hazırlanmasında liyofilizasyon tekniğini kullanmış ise de, bu teknik 40 yıl boyunca dikkat çekmemiştir [22]. 1930'lu yılların başlarında, fazla miktarlardaki kan ürünlerinin ve antibiyotiklerin saklanması sorun oluşturmaya başladığında; bu teknik dikkat çekmiş ve hızla geliştirilmiştir. Günümüzde biyolojik olmayan ürünler (reaktif veya ısıya duyarlı kimyasallar), cansız biyoürünler (enzimler, hormonlar, antibiyotikler, vitaminler, kan ürünleri, antikorlar, inaktif aşilar, ayrıca cerrahi veya tıbbi amaçla kullanılan vücut dokuları), canlı organizmalar (yeniden sulandırıldıklarında büyüme ve çoğalması istenen hücreler, örneğin bakteriler, mantarlar ve attenüe canlı viral aşilar), araştırmalarda kullanılacak dokular ve hatta sudan zarar görmüş kitaplar, teksirler, arkeolojik numunelerin korunması ya da müzede sergilenen bitki veya hayvan numuneleri dahi liyofilize edilerek saklanabilmektedir [25,26,29].

Günümüzde liyofilizasyon en sık olarak beşeri sağlık endüstrisinde, veteriner hekimlik ve hayvan sağlığı alanında ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Sağlık endüstrisinde en çok kimyasal bileşikler, parenteral formülasyonlar, aşilar ve teşhis ürünlerinin liyofilizasyonunda kullanılmaktadır. Ancak son zamanlarda protein yapısındaki biyoteknoloji ürünlerinin uzun süreli saklanması da liyofilizasyon tekniği kullanılmaya başlanmıştır. Veteriner hekimlik ve hayvan sağlığı alanında ise liyofilizasyon daha çok pet hayvanlarının aşilarında ve büyük sürü aşı uygulamalarında kullanılmaktadır [4]. Liyofilize halde kullanılan bu ürünler sadece hayvan popülasyonunu korumakla kalmaz, aynı zamanda ürünün kalitesini de artırır. Gıda endüstrisinde liyofilizasyon terimi yerine freeze-drying terimi kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde en çok bilinen kurutulmuş ürün kahvedir. Bunun dışında paketlenmesi sırasında ağırlığı sebebiyle maliyetli olan ürünler de (et ve et ürünleri vb.) dondurularak kurutulabilmektedir [13,14,18].

Liyofilizasyon Basamakları ve Mekanizması

Liyofilizasyon işlemi birbirini takip eden, ardışık üç aşamadan meydana gelmektedir. Bunlar sırasıyla

dondurma, birincil kurutma ve ikincil kurutma basamaklarıdır (Şekil 1) [1,4,12,14,17,19].



Şekil 1. Liyofilizasyon basamakları ve mekanizması [14]

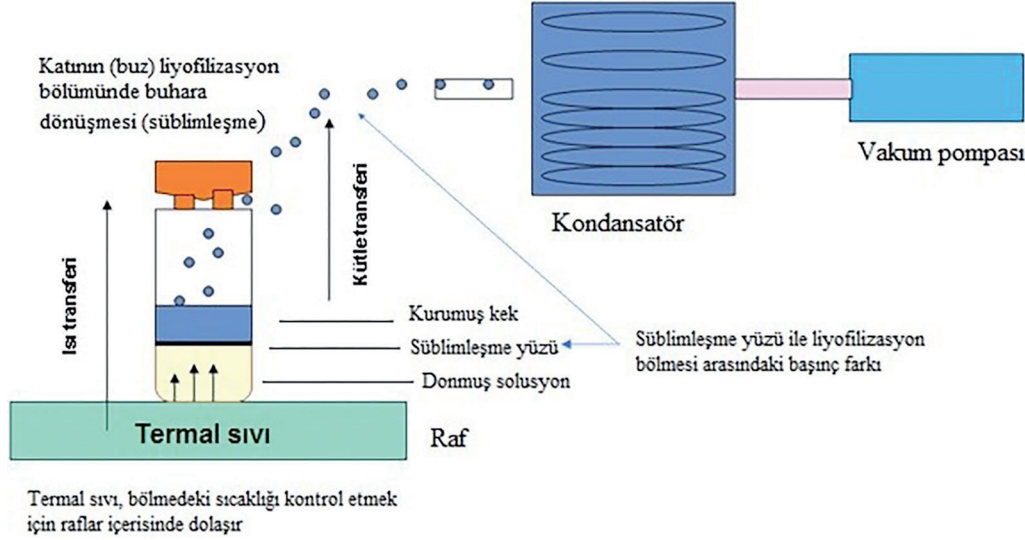
Dondurma

Liyofilizasyon sürecindeki en önemli adım dondurma basamağıdır. Bu basamak, ürünün köpüklenmesinin ve büzüşmesinin engellenmesi, maddenin görünüşünün ve çözünürlüğünün muhafaza edilmesi, maddenin hayati önem taşıyan özelliklerin korunması ve ısıya bağımlı reaksiyonların en aza indirgenmesi açısından en kritik adımdır. Ayrıca, liyofilizasyon cihazının önceden soğutulması, ürünün kalitesini artırılmasına katkı sağlamaktadır [4,17].

Liyofilizasyon tekniğinde ürünler, ürünün özelliğine bağlı olarak iki yolla donmaktadır. Birinci yolda, liyofilizasyona maruz bırakılan ürünlerin çoğunluğu, öncelikle çözücü olan su ve suyun içinde çözülmüş veya süspansiyon halinde bulunan maddelerden oluşur ki bunlara çözünen madde adı verilmektedir. Dondurularak kurutulmuş ürünlerin çoğu ötektiktirler. Yani bu ürünlerin çoğu, bunların çözünmesini sağlayan çevrelerindeki sudan daha düşük sıcaklıkta donan maddelerin karışımıdır. Sulu süspansiyon soğumaya başladığı zaman, ürün yapısında bulunan çözünen madde konsantrasyonlarında bir takım değişiklikler meydana gelmektedir. Soğuma ilerledikçe, su buza dönüşür ve su buza dönüştükçe çözünen maddelerden ayrılmakta ve bu da çözünen ürünün daha konsantre hale gelmesine sebep olmaktadır. Ürün tamamen donmuş gözükmesine rağmen, gerçekte süspansiyondaki çözünenin tamamı donana

kadar tam bir donma meydana gelmez. Çözücü ile çözünenlerin çeşitli konsantrasyonlarının karışımı, süspansiyonun ötektikini oluşturmaktadır [6]. Sadece ötektik karışımının tamamı donduğu za-

man süspansiyon uygun olarak donmaktadır. Buna ötektik sıcaklığı denilmektedir. Bu, oluşturulacak ürünün stabil olması açısından oldukça önemlidir [6,15] (Şekil 2).



Şekil 2. Liyofilizasyon bölümünün şematik çizimi ve kuruma süreci [14]

Ürünü dondurmanın ikinci yolu ise, süspansiyonun dondurma süreci boyunca cam formasyonunu almasıdır. Ötektik formdan farklı olarak, tüm süspansiyon sıcaklık düştükçe viskoz olmaktadır. Sonuç olarak, ürün cam geçiş noktası adı verilen bir sıcaklıkta donmaktadır. Ürünleri bu şekilde dondurmak oldukça zor bir işlemdir [14,17].

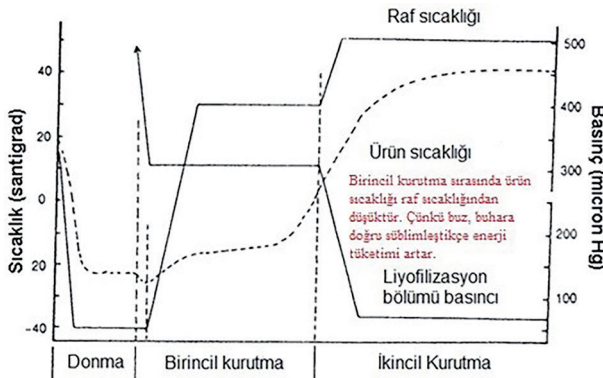
İdeal bir ön dondurmanın gerçekleştirilmesi için, solüsyon içindeki hem çözücü suyun hem çözünen maddenin tamamen kristalleşmesi gerekmektedir [6,14]. Kristalizasyon, dondurma süreci ile kurutulmuş ürünün mikro yapısını oluşturmaktadır. Bunun için dondurulacak ürünün kimyasal yapısına bağlı olarak donma derecesine ulaşılması gerekmektedir. Seçilen dondurma sıcaklığı ve ürünün final sıcaklığı, materyalin kaliteli şekilde kuruma yeteneğini de etkilemektedir [25]. Hızlı soğuma küçük buz kristallerinin oluşmasıyla sonuçlanır ve bu kristaller mikroskobik olarak ne kadar yoğun ise, yapıyı korumada o kadar faydalıdır. Dondurma işlemi ne kadar başarılı gerçekleşirse o kadar iyi kurutulmuş final ürün elde edilir.

Birincil Kurutma: Ürün formülasyonu tamamen donma noktasına ulaştığı anda, liyofilizasyon

cihazı birincil kurutma basamağına geçmektedir. Bu basamağın amacı, liyofilize edilecek ürüne zarar vermeden bağıl nem uzaklaştırmaktır. Liyofilizasyon sistemlerinde daha iyi kurutulmuş ürün elde etmek için sıcaklık ve basınç parametrelerine dikkat edilmelidir [18,19,22,24].

Donmuş üründen buzun süblimleşme (buzun sıvı hale geçmeden uzaklaşması) oranı, buz toplayıcının buhar basıncıyla ürünün buhar basıncı arasındaki farklılığa bağlıdır. Ürün ön dondurma basamağında tamamen kristalizasyon formuna ulaştığında, liyofilizasyon sisteminde basınç azaltılmaktadır. Buhar molekülleri yüksek basınçlı vial içindeki üründen düşük basınçlı ortama göç etmektedir. Yani difüzyon meydana gelmektedir [24,30]. Liyofilizasyon bölümünün basıncının 0.8 mBar'a kadar azalması, örneklerden suyun göç etmesine sebep olmakta ve minimal direnci sağlamak amacıyla örnekler üzerindeki gaz/buhar konsantrasyonunu azaltarak süblimleşme oranını düşürmektedir. Süblimleşme oranı, yaklaşık ayarlanan mBar'a ulaşana kadar artacaktır. Dolayısıyla, azalan sistem basıncı ile süblimleşme oranı artmayacak, çok düşük sistem basıncında beklenen aksine azalacaktır [21,28]. Buhar basıncı ile sıcaklık arasındaki ilişki

liyofilizasyon işlemi sırasında önemli bir etkidir. Bu ilişkinin düzenli yürütmesi, liyofilizasyon sırasında, ürünün sıcaklığı buz toplama sıcaklığından daha fazla olduğu için gereklidir. Liyofilize edilen ürünlerdeki sıcaklık, ürünün dondurulmuş bütünlüğünü devam ettiren sıcaklık ve ürünün buhar basıncını maksimuma çıkaran sıcaklık arasındaki denge açısından son derece önemlidir [2,28]. Bu denge optimum kurutmanın anahtarıdır. Çoğu ürünler ötektik ve cam geçiş noktasında iyi donar. Bu yüzden ürünün sıcaklığı bu kritik sıcaklığın hemen altında ötektik sıcaklık noktasına yükselir ve basıncın azalmasına maruz kalır. Dondurma kurutma süreci de bu noktada başlamaktadır. Dondurarak kurutma sistemlerinde vakum pompası mutlak gereklidir ve ürünün dış çevresinin basıncı daha düşük olarak ayarlanmaktadır (Şekil 2) [14]. Diğer bir olması gereken sistem, donmuş üründen ayrılan nemi toplayan soğuk tuzak (buz toplayıcı) olan toplayıcı sistemdir. Toplayıcı sistem yoğunlaşabilen bütün gazları yoğunlaştırır. Cihazın buhar basıncı, ürünün buhar basıncından daha düşük olduğu için, molekülleri gaz formuna dönüştüren gaz toplayıcıya doğru hareket etmeye meyilli ve doğal afiniteye sahiptirler. Bundan dolayı toplayıcı sıcaklık, ürün sıcaklığından önemli ölçüde daha düşük olmalıdır [19]. Dondurarak kurutma sistemlerinde diğer bir önemli birleşen, enerjidir. Enerji ısı formunda gereklidir. Bir gram suyu donmuş durumundan gaz durumuna doğru süblimleştirebilmek için ihtiyaç duyulan enerji, bir gram suyu dondurmak için ihtiyaç duyulan enerjiden neredeyse 10 kat daha fazladır (buzun her gramı 2700 jul) (Şekil 3).



Şekil 3. Liyofilizasyon işlemi sırasında liyofilizasyon basamakları ile ürün arasındaki sıcaklık ve basınç ilişkisi [14].

Primer kurutma sonucunda ürün kek görünümünü almaktadır. İşlem yaklaşık 48 saat sürer ve primer kurutma sonunda ürünün nem oranı % 5-10 arasında olmaktadır [12,23].

İkincil Kurutma: Birincil kurutma işlemi tamamlandıktan sonra, halen pelletin yüzeyine absorbe olmuş su bulunabilmektedir. Ürün kurumuş görünür ama rezidüel nem içeriği, ısıya ve pelleti oluşturan bileşenlerin doğasına bağlı olmakla birlikte %7-8 den daha yüksek olabilir. Ancak çoğu durumda bu nem oranı istenen biyolojik maddelerin stabilitesini koruyabilmesi için çok yüksektir. Bundan dolayı, arzu edilen stabilite, oluşan kek yapısının miktarı ve özelliği değişmeksizin nemin uzaklaştırılması ve dolayısıyla ürünlerdeki nem içeriğinin azaltılmasıyla elde edilmektedir. Bunun için sekonder (ikincil) kurutma basamağına ihtiyaç duyulur [17]. Sekonder kurutmanın amacı, primer kurutma sonrası aşının ve biyolojik/organik materyallerinin dayanıklılığını ve ömrünü arttırmak amacıyla ürünlerdeki bağıl nemin en aza indirilmesidir. Bu süreç, üründen bağıl suyu uzaklaştırdığı için 'İsothermal desorpsiyon' olarak da adlandırılmaktadır [9,20]. Bu rezidüel nemi uzaklaştırma işlemi, genellikle raf sıcaklığını artırarak, ürünün ısısını yükselterek ve şişeler içerisindeki suyun kısmi basıncını azaltarak gerçekleştirilmektedir. Sekonder kurutma sırasında üründen bulunan su, ürüne çok güçlü bağlıdır. Bu yüzden suyun uzaklaştırılması için çok daha fazla enerjiye ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, primer kurutmanın aksine, sekonder kurutma, toplam süreç zamanının %30-40 teşkil eder ve birincil kurutma basamağında uzaklaştırılan suyun 1/2 ile 1/3 kadarı uzaklaştırılır. Bu basamak sonucunda ürünlerdeki nem içeriği % 2 veya daha az miktarlara indirgenmektedir. %2 veya daha az nem oranı çoğu liyofilize ürün için kabul edilebilir bir limittir ve liyofilizasyonun başarısının bir göstergesidir [9,16,27].

Mikroorganizmaların Liyofilizasyona Yanıtı

Mikroorganizmaların liyofilizasyona duyarlılığı oldukça farklıdır. Genelde bakteriler başarılı bir şekilde liyofilize edilmektedirler. Ancak tür, fizyolojik olarak ne kadar karmaşık hale gelirse liyofilizasyon hasarına duyarlılığı o kadar artmaktadır. Gram pozitif bakteriler ve sporlar birçok farklı formülasyon ile başarılı bir şekilde liyofilize edilebilmektedir. Bunun tersine, Gram negatif bakteri türleri aynı şart-

lar altında daha zayıf bir yaşama oranına sahiptir. Çoğalma şartları da yaşama oranını etkilemektedir. Çoğalmanın logaritmik fazında toplanan bakteriler, sabit fazda toplanan bakterilere göre liyofilizasyona daha duyarlıdır [11,26].

Her ne kadar viruslar yaşayan organizmalar içerisinde fizyolojik olarak en basitleri olsa da, bunların liyofilizasyona yanıtları belirgin derecede çok farklıdır. Greiff ve Rightsel [10], virusların liyofilizasyondan sonra aktivitelerinin korunabilmesi için liyofilizasyon sırasında virusun yapısal ve fonksiyonel organizasyonlarının yanı sıra nükleik asitlerin molekül ağırlıklarının, kapsitin yapısı ve baskın olan protein türünün göz önüne alınması gerektiğini de bildirmişlerdir. Polioviruslarında dahil olduğu Grup VI'nın üyeleri özellikle liyofilizasyona duyarlıdır [25].

Liyofilizasyonda canlı kalan mikroorganizmaların süreç tarafından hasara uğratılma ve kurutma sonrası onarım sırasında mutasyona zorlanması da olası bir durumdur (10). Liyofilizasyon ile oluşabilecek mutasyonların önüne geçmek için, kurutma vasatının içerisine sülfhidril'den zengin bileşiklerin katılmasına ihtiyaç duyulabilmektedir. Ayrıca bazı hassas biyolojik materyaller ise aşırı kurutulduğunda inaktif olabilmektedirler [5,11,26].

Liyofilizasyon Metotları

Manifold Metodu

Bu metotta, ampuller, flasklar veya vialler tek tek manifold veya kurutma bölümlerine yerleştirilmektedir. Ürün ne dondurucularda ne de yüzey dondurma ile dondurulmaktadır. Ön dondurulmuş ürün, ısınmayı engellemek için hızlıca kurutma bölümüne yerleştirilmektedir. Ürünün bulunduğu kaplarda vakum hemen oluşturulmalıdır. Bu metot, sadece nispeten küçük volümler ve ötektikli ve çöküş sıcaklıklı ürünler için kullanılabilir [12,13].

Batch Metodu

Yığın kurutma olarak da adlandırılan bu metot, aynı ölçülerde olan ürünlerin, çok miktarları kurutma tepsilerine beraber yerleştirilmektedir. Ürün, genellikle kurutma tepsilerinin ön rafları üzerinde bir ön dondurma işlemine tabi tutulmaktadır. Gerekli vakum, sıcaklık ve inert gaz ile birlikte aynı ortamda liyofilizasyon işlemi gerçekleştirilmektedir.

Aynı zamanda, bu metot, bütün viallerin kapaklarının aynı anda kapatılmasına olanak sağlamaktadır. Batch kurutma metodu, bir ürüne ait çok sayıda ampül veya viallerin hazırlanmasında ve farmasötik endüstrisinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir [12,13].

Bulk Kurutma Metodu

Bulk kurutma metodu, batch metodu gibi tepsi kurutularak yapılmaktadır. Ancak bulk ürün tepsi içine tek ürün olarak dökülmekte ve tek ünite olarak kurutulmaktadır. Ürün, rafın tüm yüzeyine yayılmasına ve viallerdeki kurutulmuş ürünlerle aynı incelikte olmasına rağmen, ürün kütlesi içine ısı girişi oranı değişmektedir. Bu metot, yüksek oranda nem ve oksijene hassas olmayan stabil ürünler için kullanılmaktadır [12,13].

Liyofilizasyonun Avantajları

Liyofilizasyon sırasında ürünün yoğunluğundan kaynaklı olabilecek etkiler en aza indirgenmekte ve kurutulmuş ürün içerisindeki bileşenlerin dağılımı süreç boyunca değişmeden kalmaktadır. Bunun yanı sıra, kurutulmuş ürünlerdeki su içeriği çok düşük seviyelere indirgenmektedir. Bu da ürünün dayanıklılığını arttırmaktadır. Çünkü su içeriği ne kadar düşerse ürünün dayanıklılığı da o kadar artmaktadır. Ayrıca ürün normalde vakum veya inert gaz altında mühürlendiğinden, oksidatif denatürasyon büyük ölçüde azaltılmaktadır. Liyofilizasyonun bir diğer avantajı ise suyun ağırlığının azaltılması ile birlikte ürünün ağırlığı da azalmakta ve bu da ürünün nakli sırasında oluşacak maliyetleri düşürmektedir. İşlem, diğer kurutma tekniklerine göre daha kontrollü çevre şartlarında gerçekleştiğinden kontaminasyon riski azaltılmış olmaktadır. Son olarak, biyolojik ürünlerin depolanmasında ve taşınmasında kolaylık sağlamaktadır [1,14,28].

Liyofilizasyonun Dezavantajları

Liyofilizasyon sırasında imalat ve işlem süresi uzundur. Bunun yanı sıra ürünün içerisindeki uçucu bileşenlerin (üründe bu bileşenler elzem olabilir) vakumla uzaklaştırılma riski de bulunmaktadır. Ayrıca, liyofilize edilmiş ürünlerin kullanılabilirliği için çoğunlukla steril sulandırıcılara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu da maliyeti artıran faktörlerden biridir [1,18].

Kaynaklar

1. **Abdelwahed W, Thomas and David E**, (2002). *The Importance of Freezing on Lyophilization Cycle Development*. *Biopharm.* 16-21.
2. **Adams GDJ**, (1994). *Freeze-drying of biohazardous products, in Biosafety in Industrial Biotechnology*. Blackie Academic and Professional, London. 178–212.
3. **Adams GDJ**, (1996). *Lyophilization of vaccines*. In: *Vaccine Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ. 167-185.
4. **Anonim**, (2013). *A Guide to Freeze Drying for the Laboratory*. Erişim: <http://www.pharmaceuticalonline.com/doc/a-guide-to-freeze-drying-for-the-laboratory-0002>. Son erişim tarihi: 05.01.2014.
5. **Arshinova OY, Sanarova EV, Lantsova AV, Oborotova NA**, (2012). *Lyophilization of liposomal drug forms (Review)*. *Pharmaceutical Chemistry Journal* .46(4), 228-233.
6. **Bahetia A, Kumarb L, Bansal AK**, (2010). *Excipients used in lyophilization of small molecules*. *IPEC-Americas Inc J Excip Food Chem*. 1(1), 46.
7. **Beale PT**, (1983). *Water in biological systems*. *Cryobiology*. 20, 528–531.
8. **Bindschaedler C**, (1999). *Lyophilization process validation*. In: *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*. Marcel Dekker, New York. 373-408.
9. **Charles P, Detke HC, Pyne A**, (2005). *Post injection delirium/sedation syndrome in patients with schizophrenia treated with Olanzapine longacting injection: analysis of cases*. *BMC psychiatry*.
10. **Greiff D, ve Rightsel, WA**, (1969). *Stabilities of freeze-dried suspensions of influenza virus sealed in vacuum or under different gases*. *Appl. Microbiol.* 17, 830–835.
11. **Griffin CW, Cook FC, ve Mehaffrey MA**, (1981). *Predicting the stability of freeze dried Fusobacterium monstiferum. Proficiency testing samples by accelerated storage tests*. *Cryobiology*. 18, 420–425.
12. **Kasper JC, Friess W**, (2011). *The freezing step in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals*. *Eur J Pharm Biopharm.* 78(2), 248-63.
13. **Khairnar S, Kini R, Harwalkar M, Salunkhe K, Chaudhari SR**, (2013). *A Review on Freeze Drying Process of Pharmaceuticals*. *Int J Res Pharma Sc.* 4(1),76-94.
14. **Kumar GP, Prashanth N, Kumari BC**, (2011). *Fundamentals and Applications of Lyophilization*. *Journal of Advanced Pharmaceutical Research*. 2(4), 157-169.
15. **Kuu WY, Hardwick LM, Akers MJ**, (2006). *Rapid determination of dry layer mass transfer resistance for various pharmaceutical formulations during primary drying using product temperature profiles*. *Int J Pharm.* 313(1-2), 99-113.
16. **Lam T, Strickly RG ve Visor GC**, (2004). *An unexpected pH effect on stability of moexipril lyophilized powder*. *Pharm Res.* 6, 971-975.
17. **Mackenzie AP**, (1966). *Basic principles of freeze-drying for pharmaceuticals*. *Bull. Parenteral Drug Assoc.* 26, 101-129.
18. **Niresha GR, Divya L, Sowmya C, Venkateshan N, Niranjana Babu M, Lavakumar V**, (2013). *Lyophilization/ Freeze Drying - An Review*. *Int J Nov Trends Pharma Sci.* 87-98.
19. **Patel SM, Pikal MJ**, (2013). *Lyophilization process design space*. *J Pharm Sci.* 102(11):3883-7.
20. **Pikal MJ**, (2002). *Heat and Mass Transfer in Low Pressure Gases: Applications to Freeze Drying.*, 610-680.
21. **Pikal T, Cannon AJ, Trappier EH**, (2004). *Optimization of lyo cycles and production of mathematical models*. *Eur J Pharm.* 54, 132-154.
22. **Przc DS, Ruzic NLJ, Petrovic SD**, (2004). *Lyophilization –The process and industrial use*. *Chem Ind.* 58(12), 552-562.
23. **Remmele RL, Krishnan S, Callahan WJ**, (2012). *Development of stable lyophilized protein drug products*. *Curr Pharm Biotechnol.* 13(3):471-96.
24. **Rey S, Xialoin T, ve Michael J**. (2004). *Study of optimization of the freeze dried product: practical advice pharmaceutical research*. *Eur J Pharm.* 78- 94.
25. **Rightsel WA ve Grieff D**, (1967). *Freezing and freeze-drying of viruses*. *Cryobiology.* 3, 423–431.
26. **Rudge RH**, (1984). *Maintenance of bacteria by freeze-drying, in Maintenance of Microorganisms*. Academic Press, London. 23–35.
27. **Serigo A, Rambhatla S, ve Pikal MJ**, (2003). *Heat and mass transfer scale-up issues during freeze drying, I: Atypical radiation and the edge vial effect*. *AAPS Pharm Sci Tech.* 4(2), 114-127.
28. **Tang XC ve Pikal MJ**, (2004). *Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: Practical advic. (Review)*. *Pharmaceutical research.* 21(2), 191-200.
29. **Wong JP, Yang H, Nagata L, Kende M, Levy H, Schnell G, Blasetti K**, (1999). *Liposome-mediated immunotherapy against respiratory influenza virus infection using doublestranded RNA poly ICLC*. *Vaccine.* 1788–1795.
30. **Yoshioka S, Aso Y ve Kojima S**, (1999). *The effect of excipients on the molecular mobility of lyophilized formulations, as measured by glass transition temperature and NMR relaxationbased critical mobility temperature*. *Pharm Res.* 135-140.