

ISSN-1304-7280



Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi

Journal of Faculty of Veterinary Medicine,
Erciyes University

Yılda 3 sayı yayımlanır
Published 3 issues per year

Bu dergi EBSCO Host, CAB Abstracts, Global Health, Tübitak-Ulakbim TR Dizin ve Türkiye Atıf Dizini tarafından dizinlenmektedir.

This journal is reviewed by EBSCO Host, CAB Abstracts, Global Health, Tubitak-Ulakbim TR Dizin and Turkey Citation Index.

Yıl / Year : 2018
Cilt / Volume : 15
Sayı / Number : 2

<http://ercivet.erciyes.edu.tr>
E-posta: ercvet@gmail.com

Baskı Tarihi: Ağustos 2018

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi
Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University
Yılda 3 sayı yayımlanır
Published 3 issues per year

Sahibi / Owner

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Adına
Prof. Dr. Abdullah İNCİ (Dekan)

Editörler Kurulu / Editorial Board

Baş Editör / Editor-in Chief

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Editör Kurul Üyeleri / Editorial Board

Prof. Dr. Güner KÜÇÜK BAYRAM (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Berrin KOCAOĞLU GÜÇLÜ (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Öznur ASLAN (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Doç. Dr. Seçil ABAY (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Doç. Dr. Aytaç AKÇAY (İstatistik) (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Doç. Dr. Emel ALAN (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Doç. Dr. Kanber KARA (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Dr. Öğr. Üyesi Serhat AL (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Dr. Öğr. Üyesi Fatih Doğan KOCA (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Arş. Gör. İmdat ORHAN (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Arş. Gör. Görkem EKEBAŞ (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

İngilizce Dil Danışmanı / Language Editor

Okt. Mustafa AKGÜL (Erciyes Üniv. Yabancı Diller YO.)

Danışma Kurulu / Advisory Board

Prof. Dr. Rene van den HOVEN (University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria)

Prof. Dr. Thomas WITTEK (University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria)

Prof. Dr. Thomas RÜLICHE (University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria)

Prof. Dr. Askarbek TÖLÖBAEV (Manas Üniv. Vet. Fak. Bişkek, Kırgızistan)

Prof. Dr. Aytekin GÜNLÜ (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Nuh KILIÇ (Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. İsa ÖZAYDIN (Kafkas Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Güven KAŞIKÇI (İstanbul Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Mahmut OK (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Ender YARSAN (Ankara Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Abdurrahman AKSOY (Ondokuz Mayıs Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Münir AKTAŞ (Fırat Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Gürkan UÇAR (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Murat YILDIRIM (Kırıkkale Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Levent ERGÜN (Ankara Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Murat YALÇIN (Uludağ Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Aşkın YAŞAR (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Ali BAHADIR (Uludağ Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Cavit ARSLAN (Kafkas Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Alparslan Kadir DEVRİM (Kırıkkale Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Mustafa SAATÇI (Mehmet Akif Ersoy Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Özgür ÖZYİĞİT (Uludağ Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ (Uludağ Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Funda KIRAL (Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak.)

Yazışma Adresi / Correspondence

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Dergisi Editörlüğü
38039-Kayseri / TÜRKİYE

<http://ercivet.erciyes.edu.tr>

E-posta : ercvet@gmail.com

Tel : 0 352 339 94 84

Fax : 0 352 337 27 40

Yayın Türü / Publication Type: Yaygın süreli ve hakemli / Common term and peer reviewed

Mizanpaj / Designer: Erhan GÜMÜŞ

Basım / Print: Erciyes Üniversitesi Matbaası, Melikgazi/KAYSERİ

ISSN-1304-728

ARAŞTIRMA MAKALELERİ / RESEARCH ARTICLES

Evaluation of Microbiological Quality in Various Types of Cheese	86
Çeşitli Peynir Türlerinde Mikrobiyolojik Kalitenin Değerlendirilmesi P. KOÇAK KIZANLIK, E. Ö. GÖKSOY	
Çiğ Süt ve Peynirlerden <i>Brucella</i> İzolasyonu ve Elde Edilen İzolatların Fenotipik ve Moleküler Yöntemler ile Biyotiplendirilmesi	94
Isolation of <i>Brucella</i> spp. from Raw Milk and Cheese and Biotyping of Recovered Isolates by Phenotypic and Molecular Methods S. ERDOĞDU, S. ABAY, F. AYDIN	
Gebe Tavşanlarda Deneysel Ketozis Olgularında Fetal Umbilikal Arter Doppler Uygulamalarının Diagnostik Etkinliğinin İncelenmesi	103
Evaluation of the Diagnostic Effectiveness of Fetal Umbilical Artery Doppler Applications in the Case of Experimental Ketosis in Pregnant Rabbit Ş. URAL, G. ERDOĞAN	
İstanbul İlindeki Veteriner Kliniklerine Getirilen Kedi Ve Köpeklerde Deri Hastalıklarının Görülme Oranlarının Araştırılması	110
Investigation of Skin Disease Rates in Dogs and Cats Brought to Veterinary Clinics in Istanbul Province İ. CANPOLAT, S. ÇAKIR, C. AKTAŞ	
Kızıl Tilhide (<i>Vulpes vulpes</i>) Özafagusun Anatomik ve Histolojik Özellikleri	117
Anatomic and Histologic Properties of Oesophagus in the Red Fox (<i>Vulpes vulpes</i>) S. ÖZKADIF, A. HALIGÜR	
Köpeklerin Hepatobiliyer Hastalıklarında Rutin Hematolojik ve Biyokimyasal Testler ile Serum Safra Asitlerinin Açlık ve Tokluk Düzeylerinin Klinik Önemi	122
Routine Hematological and Biochemical Tests for Dogs with Hepatobiliary Diseases and Clinical Importance of Fasting and Toughness Levels of Serum Bile Acids S. NEGİŞ, A. ALTINTAŞ	
Kültür Balıklarındaki <i>Vibrio anguillarum</i>'un İmmunohistokimyasal Yöntemle Teşhisi	131
Diagnosis of <i>Vibrio anguillarum</i> by Using Immunohistochemical Method in Cultured Fish T. AKAYLI, B. AYDIN	
Antibiotic Susceptibility of Motile <i>Aeromonas</i> spp. Isolated from Foods of Animal Origin and Water	137
Hayvansal Gıdalardan ve Sudan İzole Edilen Hareketli <i>Aeromonas</i> Türlerinin Antibiyotik Duyarlılığı F. OCAK	
The Effect of Thyme Essential Oil Added to Quail Diets on Antioxidative Metabolism in Breast Meat	142
Bıldırcın Rasyonlarına Katılan Kekik Esansiyel Yağının Göğüs Etinde Antioksidan Metabolizma Üzerine Etkisi R. GÜMÜŞ, N. ERCAN, H. İMİK	
Yabani ve Evcil Hayvanların Neden Olduğu Cerrahi Problemlerin Değerlendirilmesi Üzerine Retrospektif Bir Çalışma	148
A Retrospective Study to Evaluate Surgical Injuries Caused by Wild and Domestic Animals B. KURT	
DERLEMELER / REVIEW ARTICLES	
Ters Zoonotik Viral Enfeksiyonlar	154
Reverse Zoonotic Viral Infections C. TAMER, S. GÜMÜŞOVA	
Reseptör Analizinde Radyoligand Bağlanma Deneyleri	161
Radioligand Binding Assays in Receptor Analysis H. TUTUN, E. BAYDAN	
Sütte Antibiyotik Kalıntı Durumunun İncelenmesi	169
The Investigation of Antibiotic Residues in Milk Ö. T. YILMAZ, H. HIZLISOY, N. ERTAŞ ONMAZ, S. AL, Y. YILDIRIM, Z. GÖNÜLLALAN	
Genel Bakış: Ekzozomlar ve Bazı Parazit Protozoon Enfeksiyonlardaki Rollerini	179
An Overview: Exosomes and Their Roles in Some Parasite Protozoan Infections A. İNCİ, M. OKUR, Ö. DÜZLÜ, A. YILDIRIM	
OLGU SUNUMLARI / CASE REPORTS	
Bir Atta Derin Enfekte Yara Olgusu	190
Deep Infected Wound Case in a Horse U. ALPMAN, M. K. YÖNEZ, G. ATALAN, G. EKİNCİ	
Hyperammonemia in an Iceland Pony	197
Bir İzlanda Ponisinde Hiperamonyemi Olgusu A. C. ONMAZ, A. N. PAVALOIU, A. ATASEVER, M. ÇİDEM, R. van den HOVEN	



Microbiological Quality Evaluation of Various Types Of Cheese *

Pelin KOÇAK KIZANLIK, Ergün Ömer GÖKSOY

Aydın Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Aydın-TURKEY

Summary: This study was conducted to determine microbiological quality of various cheese samples. A total of 120 cheese samples (30 white brined cheese, 30 tulum cheese, 30 kashar cheese, 30 lor cheese) were collected from dairy processing plants' output shops. Cheese samples produced in various processing plants located in Western Aegean region of Turkey (İzmir, Aydın, Muğla) were obtained from the output shops in Aydın. Enumeration of total viable count (TVC), *Staphylococcus aureus* and coliforms were carried out, and the presence of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* were investigated. The results showed that the mean TVC in white brined cheese, Tulum cheese, kashar cheese and lor cheese were 9.43 log cfu/g, 9.87 log cfu/g, 7.71 log cfu/g and 9.80 log cfu/g, respectively. The mean numbers of *S. aureus* were found in these samples 4.87 log cfu/g, 5.61 log cfu/g, 4.14 log cfu/g and 5.09 log kob/g, respectively. When the levels of coliform bacteria considered, the least contaminated cheese was found to be kashar. The presences of *E. coli* and *L. monocytogenes* were determined in 32 samples (26.6%) and one kashar cheese sample (0.83%), respectively. No *Salmonella* spp. were encountered in any of the cheese samples investigated. It was concluded that microbiological quality of the cheese samples were generally poor due to inadequate hygienic conditions during production processes and marketing. High numbers of *S. aureus* contaminated cheese samples may cause food poisoning cases due to its enterotoxins. Contamination with *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* may also cause public health risks.

Key words: Cheese, microbiological quality, public health

Çeşitli Peynir Türlerinde Mikrobiyolojik Kalitenin Değerlendirilmesi

Özet: Bu çalışma, Türkiye'nin Batı Ege Bölgesinde çeşitli mandıralarda üretilen Aydın ilinde bulunan mandıra satış noktalarından satışa sürülen 120 adet peynir örneğinin (30 beyaz peynir, 30 tulum peyniri, 30 kaşar peyniri ve 30 lor peyniri) mikrobiyolojik kalitelerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Alınan peynir örnekleri soğuk zincirde laboratuara getirilerek Toplam Mezofilik Aerob Canlı Bakteri (TMACB), *S. aureus*, koliform bakteri sayıları ile *E. coli*, *Salmonella* spp. ve *L. monocytogenes* varlığı yönünden incelenmiştir. Mikrobiyolojik analizler sonucunda ortalama TMACB sayıları beyaz, tulum, kaşar ve lor peynir örneklerinde sırasıyla 9.43 log kob/g, 9.87 log kob/g, 7.71 log kob/g ve 9.80 log kob/g olarak bulunurken, *S. aureus* sayıları ise sırasıyla 4.87 log kob/g, 5.61 log kob/g, 4.14 log kob/g ve 5.09 log kob/g olarak belirlenmiştir. Örnekler koliform grubu bakteriler yönünden incelendiğinde en az kontamine olan peynir grubunun kaşar peyniri olduğu tespit edilmiştir. İncelenen örneklerin 32 tanesinin (%26.6) *E. coli* ile bir adet kaşar peyniri örneğinin ise *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu gözlenmiştir. Örneklerin hiçbirinde *Salmonella* spp. varlığına rastlanılmamıştır. Peynir örneklerinin, üretimi ve pazarlanması sırasında hijyenik koşullara yeterince dikkat edilmemesi nedeniyle, genel olarak mikrobiyolojik kalitelerinin düşük olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan analizler sonucunda örneklerde *S. aureus* yükünün yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum stafilokokal enterotoksinlerin oluşturabileceği gıda zehirlenmeleri riskini arttırmaktadır. Peynirlerin *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* ile kontaminasyonu da halk sağlığı açısından risk teşkil etmektedir.

Anahtar kelimeler: Halk sağlığı, mikrobiyolojik kalite, peynir

Introduction

Cheese is one of the oldest human foods and is thought to have been developed approximately

8 000 years ago (16). The long tradition of consumption of fresh and fermented raw milk products was subject to an important change in the late 19th century, as the developed countries began wide scale pasteurization of milk to eliminate foodborne (zoonotic bacterial) pathogens (14). However, cheeses are ready-to-eat (RTE) food products that do not undergo any further treatment to ensure their safety before consumption (28).

Geliş Tarihi/Submission Date : 07.03.2017

Kabul Tarihi/Accepted Date : 22.08.2017

*This study is a short summary of the first author's MSc Thesis which was supported by Adnan Menderes University Scientific Research Project Coordination (Project Number: VTF-12044). This study was also presented in the 6th National Veterinary Food Hygiene Congress (October 7-11, 2015) in Van, Turkey.

In the previous years, there have been many outbreaks of infection associated with the consumption of various types of cheese (10). Four bacterial pathogens including *Staphylococcus aureus*, pathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* are considered as the predominant organisms that are responsible to outbreaks associated cheese (32). Pathogenic bacteria contamination of cheese can be attributed to many sources such as raw milk used unpasteurized or inadequate pasteurization for the production of cheese, environmental sources (utensil and equipment during the processing), post processing, retail process and personnel (28,41).

Consumption of cheese contaminated with the mentioned pathogens can lead to serious health problems which can occasionally be fatal for consumers (11). *S. aureus* and *E. coli* in cheese are frequently used as indicators of hygienic quality and show lack of microbiological safety (40). Staphylococcal food poisoning is an intoxication that results from the consumption of foods containing sufficient amounts of one (or more) preformed enterotoxin (31).

Salmonella spp. infections have been linked to outbreaks associated with the consumption of various types of cheese (13). The typical symptoms of the illness include nausea, vomiting, diarrhea, abdominal cramps and fever while additional complications associated with the infection include septicemia or reactive arthritis (12). Although cheese have some features to inhibit the growth of *L. Monocytogenes* such as added salt, the antimicrobial metabolites, the presence of low pH and moisture levels, as well as low refrigeration temperature, it still may cause health hazards for consumers (11). Listeriosis is characterised with a very high fatality rate compared with those of other foodborne bacteria, preferentially affects individuals, whose immune system is perturbed, including pregnant women, newborns, old and immunocompromised people (28).

In Turkey, more than 40 varieties of cheese are produced. The other cheese varieties such as kashar, lor, tulum and soft cheese types are well known that occupy a large place in national consumption (25). This study was planned to examine various microbiological parameters such as total viable count, the numbers of *S. aureus* and coliforms, and to detect the presence of *E. coli*, *Salmonella* spp. and *L. mono-*

cytogenes in various types of cheese, in order to observe hygienic quality and possible health risks from these cheeses.

Materials and Methods

Sampling

A total of 120 cheese samples (30 white brined cheese, 30 tulum cheese, 30 kashar cheese, 30 lor cheese) were examined in order to evaluate their microbiological quality. Cheese samples produced in various processing plants located in Western Aegean region of Turkey (Izmir, Aydın, Mugla) were obtained from the output shops in Aydın. In this study cheese samples were collected from overall nine local Dairy Products Producing Premises (DPPP) located in various parts of Western Aegean Region. All samples were immediately transported to the laboratory for microbiological analysis under aseptic conditions and in insulated cold boxes at 4°C.

Microbiological analysis

The microbiological analysis procedures were carried out as stated in TSE (Turkish Standards Institute) standards (45,48,49). Ten gram cheese sample was homogenized in 90 mL of a sterile 0.1% pepton water solution (Merck 107228, Germany) using a Lab-Blender 400 Stomacher (Interscience, France) for at least two minutes in order to enumerate total viable count (TVC), *S. aureus*, coliform levels and to determine the presence of *E. coli* (21). Decimal serial dilutions were prepared up to 10⁻⁶. Serial dilutions were plated on to selective agar media [Plate Count Agar (oxid CM0325), Baird Parker Agar (Oxid CM0961), Lauryl Sulphate Broth (Oxid CM0451), Tryptone Bile X-glucuronide Agar (Oxid CM0961)] for each group bacteria.

For the isolation of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*, 25 g cheese samples were put into stomacher bags containing 225 mL buffered pepton water (Oxid CM509, UK) and 225 mL Half Fraser Broth (Oxid CM895, UK) with Half Fraser supplement (Oxid SR166E, UK), respectively then homogenized least two minutes. The inoculation, incubation and identification procedures were carried out as stated in TSE standards (46,47). Suspected colonies for *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* were subjected to serological and biochemical test kits (Salmonella Latex Test, Oxoid FT 0203A and Microbact 12L, Listeria Identification System, Oxoid MB1128, UK) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

One-way ANOVA were carried out to determine the statistical difference between the groups for TVC and the numbers of *S. aureus*. When an

analysed were not determined, due to the high determination limit of the plating out method used (Table 1).

Table 1. The level of TVC and *S. aureus* (log cfu/g) obtained from cheese samples

	TVC		<i>S. aureus</i>	
	n/N	Mean±SEM	n/N	Mean±SEM
White brined cheese	30/30	9.43±0.18 ^a	24/30	4.87±0.30 ^{ab}
Tulum cheese	30/30	9.87±0.10 ^a	28/30	5.61±0.22 ^a
Kashar cheese	26/30	7.71±0.12 ^b	14/30	4.14±0.36 ^b
Lor cheese	30/30	9.80±0.1 ^a	26/30	5.09±0.25 ^a
F	46.23 ^{***}		3.99 ^{**}	

n: positive samples N: number of total samples *: P<0.05, ***: P<0.001.
^{a,b}: Different superscripts in the same row were significantly different (P<0.05).

overall significance was observed, Post Hoc tests were performed using Duncan test. For most probable number (MPN) method used for coliform count, samples were divided into 3 groups; 1) group with a coliform load of >1100, 2) group with a coliform load of between 1100 ve 3, and 3) group with a coliform load of <3. Significant differences between groups were tested using Pearson chi-square test and Fisher's exact chi-square test was performed if there was a low value (<5) in the expected cell counts.

Results

The lowest mean TVC was observed in kashar cheese samples. Although there was not any significant difference between tulum, white brined and lor cheese samples, a significant difference (P<0.001) was found between kashar cheese and other cheese samples analysed. The TVC levels of four kashar cheese samples

The lowest mean of *S. aureus* was also determined in kashar cheese samples. There was a significant difference (P<0.05) in the numbers of *S. aureus* between kashar cheese, and lor and tulum cheese samples (Table 1).

The lowest level of coliform was observed in kashar cheese samples (Table 2). A significant difference was found between the observed and statistically expected levels of coliforms in white brined cheese, tulum cheese and lor cheese (χ^2 : 39.533^{***}, ***: P<0.001). Tulum cheese was found to be the most contaminated cheese by *E. coli* with a prevalence of 36.60%. The prevalence of *E. coli* in white brined cheese, kashar cheese and lor cheese were 33.3%, 13.3%, and 23.3%, respectively.

Salmonella spp. was not determined in any of the 120 cheese samples examined. *L. monocytogenes* was found in one kashar cheese sample, and nine other cheese samples were also

Table 2. The levels (MPN/g) of coliform in various cheese samples

Types of cheese	MPN/g(n/N)		
	>1100	1100-3	<3
White brined cheese	21/30 (70.0%)	5/30 (16.7%)	4/30 (13.3%)
Tulum cheese	14/30 (46.7%)	13/30 (43.3%)	3/30 (10.0%)
Kashar cheese	3/30 (10.0%)	14/30 (46.7%)	13/30 (43.3%)
Lor cheese	22/30 (73.3%)	8 (26.7%)	0

n: positive samples N: number of total samples χ^2 : 39.533^{***}, ***: P<0.001

found to be contaminated with *Listeria* spp. other than *L. monocytogenes* (Table 3).

gens (32). However, for fermented foods high microbial load observed in the samples may not

Table 3. The distribution of *Listeria* spp. in various cheese types

	White brined cheese	Tulum cheese	Kashar cheese	Lor cheese
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	1/30(3.33%)	-
<i>L. ivanovii</i>	2/30 (6.66%)	3/30 (10%)	-	1/30(3.33%)
<i>L. seeligeri</i>	-	-	-	1/30(3.33%)
<i>L.welshimeri</i>	-	1/30(3.33%)	-	1/30(3.33%)
<i>Listeria</i> spp.		10/120 (%8.33)		

Discussion and Conclusion

Foodborne infections/intoxications are common public health problem in developed, developing and undeveloped countries in variable extends (18). Ninety outbreaks associated with cheese from 1998 to 2011 were reported by The Centers for Disease Control and Prevention (CDC). These outbreaks resulted in 1882 illnesses including 230 hospitalizations, and 6 deaths. A median of 6.5 outbreaks (range, 3-10) was reported each year, with no discernible pattern in the number of outbreaks overall or by pasteurization status. The pasteurization status of the milk used to make the cheese was reported for 82 (91%) outbreaks; 38 (46%) were caused by cheese made from unpasteurized milk and 44 (54%) by cheese made from pasteurized milk (17). A detailed review was presented by Koustta et al. (28) regarding to the cheese borne outbreaks occurred in different countries.

Especially in local areas, local DPPP's have their own consumers who trust the firms, their products are believed to be safe and consumers buy their product without any hesitation.

The mean TVC of cheese samples showed that the lowest microbial load was on kashar cheese samples with a level of 7.71 log cfu/g and this level was statistical significant than those observed from white brined cheese, Tulum cheese and Lor cheese. Studies conducted in Turkey by Aygun et al. (5), Simsek and Sagdic (38), Kursun et al. (30) were in agreement with the results reported here and showed TVC level between 10^6 and 10^9 cfu/g. For foods, in general the level of TVC indicates the presence of low hygienic practices and the possibility of other groups of microorganisms including patho-

give such a sophisticated result due to the difficulties in distinguishing contaminated microorganisms and routine microflora of fermented food (42).

Similar to TVC, the lowest *S. aureus* level was found in kashar cheese and there was a statistical significance between kashar cheese, and lor and tulum cheese. While 93.3% of tulum cheese, 86.6% of lor cheese and 80% of white brined cheese samples were contaminated with *S. aureus*, 46.6% of kashar cheese samples were found to be contaminated with this agent. Takahashi and Johns (39) showed the prevalence of *S. aureus* in cheddar cheese samples as 12% in Canada. Jorgensen et al. (24) reported that 75% of cheese samples investigated were contaminated with *S. aureus*. Tekinşen and Özdemir (40) reported the mean level of *S. aureus* as 6.1 log cfu/g in 50 cheese samples collected from the markets of Van and Hakkari provinces of Turkey. Contamination degree of *S. aureus* in milk and dairy products is mainly associated with clinical and subclinical mastitis and workers in the farm, and in the hygienic conditions of processing plant (9,35,50). The manufacturing process has also been demonstrated to be the source of high *S. aureus* numbers (28). Insufficient pasteurization and post pasteurization contaminations could also lead cheese to be contaminated with *S. aureus*. In raw milk cheeses the fermentation or ripening process prevent growth of *S. aureus* (1). Due to high number of *S. aureus* is needed to produce SE's ($>5 \log_{10}$ cfu/g) (23), any condition that stimulate growth of *S. aureus* to high levels may cause food poisoning cases. Therefore, although viable *S. aureus* cells are eliminated by processing

(pasteurization, fermentation or ripening etc), SE's once produced are present in the cheese. According to Turkish Food Codex (TFC) (44) for coagulase positive *S. aureus* m and M values are 10^2 and 10^3 cfu/g, respectively. Our mean values for this pathogen were ranging 4.14 log cfu/g and 5.61 log cfu/g for different cheese samples, far above the maximum limits stated by TFC (44), which might cause food poisoning cases with improper handling and temperature abuse conditions.

Kashar cheese was found to be with the lowest MPN for coliforms and the highest MPN was found in Lor cheese. The levels of coliforms in cheese samples other than kashar cheese were found to be statistically higher than which was expected. This group of bacteria cause some technological defects (swelling) in some sort of soft cheese samples due to heterofermentative degradation of lactose causing gaseous (CO_2), lactic acid, acetic acid and alcohol (26). The prevalence of *E. coli* in white brined cheese, Tulum cheese, kashar cheese and Lor cheese were 33.3%, 36.6%, 13.3%, and 23.3%, respectively. As a sum 26.6% of cheese samples were found to be contaminated with *E. coli*. The prevalence of *E. coli* in various types of cheese samples was reported between 4% and 74.3% by several researchers (7,20,34,43).

No *Salmonella* spp. was found in cheese samples investigated, our finding for *Salmonella* spp. is in agreement with the results of Keskin et al (27), Aygun et al. (5) and Gülmez and Güven (19). In contrary, Akkaya and Alişarlı (2), Tekinşen and Özdemir (40) found *Salmonella* spp. in the cheese samples investigated. While Kahraman et al. (25) showed that the prevalence of *Salmonella* spp. was 1.7% in 105 white brined cheese samples, Almeida et al. (3), Erkan et al. (15), Hayaloglu and Kirbag (22), Miranda et al. (33), reported the prevalence of *Salmonella* spp. as 10.0%, 23.3%, 4.3%, 9.1%, respectively.

The genus *Listeria* comprises six species: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri* and *Listeria grayi*. Among the genus of *Listeria*, which cause the infection of listeriosis in both animals and man, *L. monocytogenes* is a major pathogenic microorganism, and bacterium *L. ivanovii* is rarely pathogenic for humans (4). According to TFC no *L. monocytogenes* must be found in cheese samp-

les (44). The prevalence of *Listeria* spp. in cheese samples were found to be as 8.33% (ten cheese samples) and 1 kashar cheese (3.33%) was found to be contaminated with *L. monocytogenes*. Several researchers reported the prevalence of *L. monocytogenes* in various types of cheese samples between 1.2% and 4.8% (6,8,11,19,25,30,37).

Differences between the results above may be related with the use of raw or pasteurized milk in cheese production, cheese production techniques, and hygienic conditions during the production, storage and sales process, and some characteristics of cheese such as pH and moisture content. For example, *L. monocytogenes* can be found more frequently in high-moisture cheeses, soft and semi-soft cheeses which have water activity higher than hard cheeses (4,36). Turkish white cheese contains high levels of moisture, and pH, particularly at the surface, increases during ripening; so that they are more prone to microbial growth than hard or semi-hard cheeses (25). Producing white cheese is different than kashar, tulum and lor cheeses. Producers sometimes do not heat milk up to pasteurization temperatures and/or add raw milk into pasteurized milk. The reason for this is to avoid adding CaCl_2 , which means extra cost and to save energy and time (29). The other reason for the high contamination rates for white brined cheese might be the brine. Pathogens may be transferred to cheese via contaminated brine (25). Lor cheese is produced from the whey leftover from cheese production. The more manipulation especially in unhygienic conditions may generally cause the highest levels of coliforms in lor cheese. In addition three lor cheese samples were also found to be contaminated with *Listeria* spp. Although a second heat treatment was also applied to kashar cheese processing, one kashar cheese sample was found to be contaminated with *L. monocytogenes*. It has been stated as rarely pathogenic for humans, *L. ivanovii* was found in all types of cheese samples except kashar cheese, which might also cause serious public health problems. *L. seeligeri* and *L. welshimeri* were also found in tulum and lor cheese samples analysed.

As a result, cheese processing contains integrated procedures from milk supply to retail market. Therefore, any hygienic problems associated with milk and processing stages cause cheese to be contaminated with pathogens.

Our results showed that cheese samples analysed contaminated with *S. aureus* higher than those stated in TFC. High level of *S. aureus* may cause food poisoning cases due to its toxins. *L. monocytogenes* is a major pathogenic microorganism, causing foodborne infections and deaths, and bacterium *L. ivanovii* is rarely pathogenic for humans. According to TFC (44), no *L. monocytogenes* must be found in food samples. Our findings showed that 10 cheese samples were contaminated with *Listeria* spp., and 7 of which were contaminated with *L. monocytogenes* (1 sample) and *L. ivanovii* (6 samples) that might also cause public health risks.

References

1. Akineden O, Hassan AA, Schneider E, Usleber E. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. *Int J Food Microbiol* 2008; 124(2): 211-6.
2. Akkaya L, Alişarlı M. Afyonkarahisar'da tüketime sunulan peynirlerde *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* spp. varlığının belirlenmesi. *YYU Vet Fak Derg* 2006; 17(1-2): 87-91.
3. Almeida G, Figueiredo A, Rôla M, Barros RM, Gibbs P, Hogg T, Teixeira P. Microbiological characterization of randomly selected Portuguese raw milk cheese with reference to food safety. *J Food Protect* 2007; 70(7): 1710-6.
4. Arslan S, Ozdemir F. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. in homemade white cheese. *Food Control* 2008; 19(4): 360-3.
5. Aygun O, Aslantas O, Oner S. A survey on the microbiological quality of Carra, traditional Turkish cheese. *J Food Eng* 2005; 66(3): 401-4.
6. Aygun O, Pehlivanlar S. *Listeria* spp. in raw milk and dairy products in Antakya, Turkey. *Food Control* 2005; 17(8): 676-9.
7. Brooks JC, Martinez B, Stratton A, Bianchini A, Krokstrom R, Hutkins R. Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence foodborne pathogens. *Food Microbiol* 2012; 31(2): 154-8.
8. Büyükyörük S, Göksoy EÖ. Aydın ilinde satışa sunulan köy peynirlerinde *Listeria* varlığının araştırılması. *Uludağ Univ Vet Fak Derg* 2011; 30(1): 9-12.
9. Callon C, Gilbert FB, Cremoux RD, Montel MC. Application of variable number of tandem repeat analysis to determine the origin of *S. aureus* contamination from milk to cheese in goat cheese farms. *Food Control* 2008; 19(2): 143-50.
10. Cokal Y, Dagdelen A, Cenet O, Gunsen U. Presence of *L. monocytogenes* and some bacterial pathogens in two Turkish traditional foods, Mihalic cheese and Hosmerim desert. *Food Control* 2012; 26(2): 337-40.
11. Colak H, Hampikyan H, Bingöl EB, Ulusoy B. Prevalance of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in tulum cheese. *Food Control* 2007; 18(5): 576-9.
12. D'Aoust J, Maurer J, Bailey JS. *Salmonella* species. Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. eds. In: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington: ASM Press, 2001; pp. 141-78.
13. De Buyser ML, Dufour B, Maire M, Lafarge V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int J Food Microbiol* 2001; 67(1-2): 1-17.
14. De la Rua-Domenech R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 2006; 86(2): 77-109.
15. Erkan EM, Ciftcioglu G, Vural A, Aksu H. Some microbiological characteristics of herbed cheeses. *J Food Quality* 2007; 30(2): 228-36.
16. Fox PF, McSweeney PLH. Cheese: An overview. Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP. eds. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Third Edition. California: Elsevier Academic Press, 2004; pp. 1-5.
17. Gould LH, Mungai E, Behrayesh CB. Outbreaks attributed to cheese: Differences between outbreaks caused by unpasteurized and pasteurized dairy products, United States, 1998-2011. *Foodborne Pathog Dis* 2014; 11(7): 545-51.
18. Gould LH, Walsh KA, Vieira AR, Herman K, Williams IT, Hall AJ, Cole D. Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States, 1998-2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report, Surveillance Summaries* 2013; 62(2): 1-34.
19. Gülmez M, Güven A. Beyaz ve çeçil peynir-

- lerinde *Campylobacter*, *Salmonella* ve *Listeria* türlerinin araştırılması. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2001; 72(2): 155-61.
20. Günşen U, Büyükyörük İ. Piyasadan temin edilen taze kaşar peynirlerinin bakteriyolojik kaliteleri ile Aflatoxin M1 düzeylerinin belirlenmesi. Turk J Vet Anim Sci 2003; 27(4): 821-5.
 21. Halkman K, 2005. Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Birinci Baskı. Ankara: Başak Matbaacılık, 2005; pp:158-9.
 22. Hayaloglu AA, Kirbag S. Microbial quality and presence of moulds in Kuflu cheese. Int J Food Microbiol 2007; 115(3): 376-80.
 23. Jablonski LM, Bohach G. *Staphylococcus aureus*. Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. eds. In: Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. Second Edition. Washington: ASM Press, 1997; pp. 353-7.
 24. Jorgensen HJ, Mork T, Hogasen HR, Rorvik LM. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk Norway. J Appl Microbiol 2005; 99(1): 158-66.
 25. Kahraman T, Gürsel O, Ozinan B, Goksoy EO. Prevalance of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in different cheese types produced in Turkey. Brit Food J 2010; 112(11): 1230-6.
 26. Kaynar Z, Kaynar P, Kocak C. Ankara piyasasında tüketime sunulan beyaz peynirlerin hijyenik kalitelerinin belirlenmesi üzerine bir çalışma. Türk Hij Den Biyol Derg 2005; 62(1): 1-10.
 27. Keskin Y, Özyaral O, Başkaya R, Susur MA. Semt pazarlarında satılan beyaz peynirlerin mikrobiyolojik kalitesinin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2006; 36(1): 9-19.
 28. Kousta M, Mataragas M, Skandamis P, Drosinos EH. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. Food Control 2010; 21(6): 805-15.
 29. Kosikowski FV, Mistry VV. Fundamentals of cheese making and ripening. Kosikowski FV. ed. In: Cheese and Fermented Milk Foods. Third Edition. Westport: Limited Liability Company, 1997; pp. 109-12.
 30. Kursun O, Kırdar SS, Kale ASA, Guner A. Burdur'da tüketime sunulan beyaz salamura peynirlerinin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi. Onuncu Ulusal Gıda Kongresi. Mayıs, 21-23, 2008; Erzurum-Türkiye.
 31. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet Mol Res 2003; 2(1): 63-76.
 32. Little CL, Rhoadesa JR, Sagooa SK, Harris J, Greenwoodb M, Mithania V, Granta K, McLauchlina J. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. Food Microbiol 2008; 25(2): 304-12.
 33. Miranda JM, Mondragón AC, Martinez B, Guarddon M, Rodriguez JA. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. J Food Protect 2009; 72(5): 966-71.
 34. Öksüztepe G, Patır B, Dikici A, İlhak I. Elazığ'da tüketime sunulan vakum paketlenmiş taze kaşar peynirlerinin mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi. FÜ Sağ Bil Vet Derg 2009; 23(2): 89-94.
 35. Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay JM, Besser TE. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. J Dairy Sci 1994; 77(11): 3354-64.
 36. Rudolf M, Scherer S. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. Int J Food Microbiol 2001; 63(11): 91-8.
 37. Sagun E, Sancak Y, İşleyici O, Ekici K. Van ve çevresi süt ve otlı peynirlerinde *Listeria* türlerinin varlığı ve yaygınlığı üzerine bir araştırma. Turk J Vet Anim Sci 2001; 25: 15-9.
 38. Simsek B, Sagdic O. Isparta ve yöresinde üretilen dolaz (tort) peynirinin bazı kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri. Süleyman Demirel Üni Fen Bil Ens Derg 2006; 10(3): 346-51.
 39. Takahashi I, Johns CK. *S. aureus* in cheddar cheese. J Dairy Sci 2010; 42(6): 1032-7.
 40. Tekinsen KK, Ozdemir Z. Prevalence of foodborne pathogens in Turkish Van otlı (Herb) cheese. Food Control 2006; 17(9): 707-11.
 41. Temelli S, Anar Ş, Şen C, Akyuva P. Determination of microbiological contamination sources during Turkish white cheese production. Food Control 2006; 17(11): 856-61.
 42. Temiz A. Gıdalarda mikrobiyolojik gelişmeyi etkileyen faktörler. Ünlütürk A, Turantaş F. eds. In: Gıda Mikrobiyolojisi. Üçüncü Baskı. İzmir: Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, 2003; ss. 85-106.
 43. Torkar GK, Teger GS. The presence of so-

- me pathogen microorganisms, yeast and moulds in cheese samples produced at small dairy-processing plants. Acta Agric Slov 2006; 88(1): 37-51.
44. Türk Gıda Kodeksi. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği. Resmi Gazete 29.12.2011. Türkiye Cumhuriyeti Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ankara: 2011; pp. 1-31.
 45. Türk Standartları Enstitüsü. Gıda ve hayvan yemlerinin-mikrobiyolojisi-koagülaz-pozitif Stafilokokların (*Staphylococcus aureus* ve diğer türler) sayımı için yatay metot-bölüm 1: baird-parker agar besiyeri kullanarak. TSE 6582-1 EN ISO 6888-1A, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara: 2001; ss.1-9.4.
 46. Türk Standartları Enstitüsü. Süt ve süt ürünleri-*Salmonella* spp. aranması. TSE 8907 ISO 6785, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara: 2003; ss. 1-15.
 47. Türk Standartları Enstitüsü. Gıda ve yem maddelerinin mikrobiyolojisi-*Listeria monocytogenes*'in aranması ve sayımı metodu bölüm 1: arama metod. TSE EN ISO 11290-1/A1, Türk Standartları Enstitüsü: Ankara: 2004; ss.1-9.
 48. Türk Standartları Enstitüsü. Gıda ve hayvan yemleri mikrobiyolojisi-Koliformların tespiti ve sayımı için yatay yöntem-En muhtemel sayı tekniği. TS ISO 4831, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara: 2010; ss.1-7.
 49. Türk Standartları Enstitüsü. Gıda zinciri mikrobiyolojisi-Mikroorganizmaların sayımı için yatay yöntem-Bölüm 2: Yüzey kaplama tekniğiyle 30°C'ta koloni sayımı. TS EN ISO 4833-2, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara: 2014; ss.1-23.
 50. Vautor E, Abadie G, Guibert JM, Huard C, Pepin M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. Vet Microbiol 2003; 96(1): 69-79.

Corresponding Author:

Pelin KOÇAK KIZANLIK
Adnan Menderes University
Faculty of Veterinary Medicine
Department of Food Hygiene and Technology
Aydın-TURKEY
Tel: +90 256 247 07 20
E-mail: pelin.kocak@adu.edu.tr



Çiğ Süt ve Peynirlerden *Brucella* spp. İzolasyonu ve Elde Edilen İzolatların Fenotipik ve Moleküler Yöntemler ile Biotiplendirilmesi*

Sevgi ERDOĞDU¹, Seçil ABAY², Fuat AYDIN²

¹Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kırşehir-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Özet: Bu çalışmada, Kayseri ilinde tüketime sunulan çiğ süt ve peynirlerde *Brucella* spp.'nin konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlandı. Bu amaçla 100 adet çiğ süt, 100 adet taze beyaz peynir ve 100 adet salamura beyaz peyniri olmak üzere toplam 300 örnek materyal olarak kullanıldı. Örneklerden *Brucella* spp. izolasyonu için, Farrell yönteminden (Farrel Broth'da ön zenginleştirmeyi takiben Farrell agara ekim) yararlanıldı. İzolatların identifikasyonu, fenotipik testler ve Abortus Melitensis Ovis Suis-Polymerase Chain Reaction, (AMOS-PCR) ile yapıldı. Çalışmada, süt örneklerinin birinden (%1) ve peynir örneklerinin ikisinden (%2) *Brucella* spp. saptanırken salamura peynir örneklerinden *Brucella* spp. izolasyonu yapılamadı. İzolatların fenotipik identifikasyonu sonucunda süt örneğinden elde edilen izolat, *Brucella abortus* biyotip 1, taze peynirden elde edilen izolatlar ise *Brucella melitensis* biyotip 3 olarak tanımlandı. Ayrıca izolatlar AMOS-PCR ile de tür ve biyotip düzeyinde doğrulandı. Sonuç olarak, Kayseri şehir merkezinde satışa sunulan süt ve peynirlerde belirlenen *Brucella* spp. izolasyon oranlarının düşük olmasına rağmen enfeksiyonun şiddeti dikkate alındığında, *Brucella* türlerini içeren süt ve peynirlerin, halk sağlığı açısından potansiyel risk oluşturduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: AMOS-PCR, *Brucella* spp., peynir, süt

Isolation of *Brucella* spp. from Raw Milk and Cheese and Biotyping of Recovered Isolates by Phenotypic and Molecular Methods

Summary: In this study, it was aimed to investigate *Brucella* spp. in cow raw milk and cheeses presented for consumption in Kayseri province by conventional and molecular methods. For this purpose, A total of 300 samples consist of 100 raw milk, 100 fresh white cheese and 100 pickled white cheese were used as material. The Farrell method (following pre-enrichment in Farrell broth, culture was made in Farrell agar) was utilized for the isolation of *Brucella* spp. from samples. Phenotypic tests and Abortus Melitensis Ovis Suis-Polymerase Chain Reaction, (AMOS-PCR) were used for the identification of the isolates. *Brucella* spp. could not be detected from pickled cheese while one of the (1%) milk samples and two of (2%) fresh cheese samples examined were found to be positive for *Brucella* spp. in this study. One isolate from milk and two isolates from fresh cheese were identified as *B. abortus* biotype 1 and *B. melitensis* biotype 3 with phenotypic tests respectively. In addition, isolates were also confirmed at the species and biotype level by AMOS-PCR. As a result, although the lower rate of isolation of *Brucella* in milk and cheeses sold in Kayseri city, considering the severity of the infection, indicates that milk and cheeses containing *Brucella* species poses a potential risk for public health.

Key words: AMOS-PCR, *Brucella* spp., cheese, milk

Giriş

Brusellozis, insan ve hayvanlarda ciddi klinik bulgular ve ekonomik kayıplara neden olan önemli zoonotik hastalıklardan biridir (19,58). Konak spesifitesi, fenotipik özellikler, virulens çeşitliliği ve genotiplendirme verileri temelinde, *Brucella* cinsinde *B. abortus*, *B. melitensis*, *B.*

suis, *B. canis*, *B. ovis* ve *B. neotomae* olmak üzere altı tür ve bu türlere ait 15 biyovarin varlığı bilinmekte iken (24,57) son yıllarda *Brucella* cinsine *B. pinnipedia*, *B. cetaceae*, *B. microti*, *B. inopinata* ve *B. papionis* sp. nov. olmak üzere yeni türler dahil edilmiştir (15,45,56,57).

Enfeksiyon, hayvanlardan insanlara doğrudan temas, kontamine süt ve süt ürünlerinin taze olarak tüketilmesi, enfekte damlacıkların inhalasyonu ve bazen et tüketimi ile bulaşmaktadır (18,19). Gelişmiş ülkelerde tamamen ortadan kaldırılmakla birlikte, hayvancılığın yoğun yapıldığı, çiğ süt ve süt ürünlerinin tüketiminin yaygın

Geliş Tarihi/Submission Date : 21.02.2017
Kabul Tarihi/Accepted Date : 22.08.2017

*Bu araştırma, ilk isimli araştırmacının yüksek lisans tezinden üretilmiş olup Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSY-11-3592 nolu proje ile desteklenmiştir.

olduğu ülkemizde ve gelişmekte olan ülkelerde halen önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir (18).

İnsan brusellozisi, veteriner hekimler, çiftçiler, çobanlar, hayvan bakıcıları, süt ve peynir imalathanelerinde çalışanlar, kasaplar ve mezbaha işçilerinde görülen bir meslek hastalığı olarak tanımlanmıştır (19). Hastalık etkeni, insanlarda titreme ile yükselen ateş sonrası kas ve şiddetli eklem ağrıları ile seyreden, uzun süreli sistemik bir enfeksiyon meydana getirir (18,19).

Brusellozisin bulaşmasında en önemli vasıta süttür. Bunun dışında taze peynir ürünleri özellikle keçi ve koyun peynirleri bulaşmadan ikinci derecede sorumlu besinlerdir. *Brucella* bakterileri bu ürünlerde 20 gün ile 3 ay arasında değişen sürelerde canlı kalabilmektedir. Et ürünleri bruselloz için nadiren kaynak oluştururlar. Bu durumun çiğ et tüketim oranlarının düşük olması ve kas dokusu içindeki mikroorganizma sayısının çok düşük olması ile ilgili olabileceği bildirilmiştir (58).

Ülkemizde süt ve süt ürünleri (beyaz peynir, tereyağı, krema, kaymak, dondurma vb.) sevilerek tüketilmektedir. Yöresel taze peynir yapımı çiğ sütün 32-35°C'lere kadar ısıtılıp mayalanması ile sağlanır. Peynirin bu şekilde yapılması insanlar açısından gerek damak tadı gerekse maddi açıdan (ısıtma maliyeti, peynir randımanı) tercih nedenidir. Özellikle taze peynir, tereyağı ve krema gibi ürünler, pastörize edilmemiş sütlerden yapıldığı bölgelerde insanlar için enfeksiyonun kaynağını oluşturur.

Brusellozisin tanısında direkt ve indirekt yöntemler kullanılmaktadır. İndirekt tanı için çeşitli serolojik testlerden yararlanılmaktadır. Bu testler hızlı, pratik ve az maliyetli olmasına rağmen, bazı durumlarda yanlış pozitif veya negatif sonuçlar verebilmektedirler (33). Ayrıca bazı durumlarda kesin tanı için birden fazla testin bir arada kullanılması gerekebilmektedir. Yine sütlerde *Brucella* bakterilerine ait DNA'nın saptanması esasına dayanan moleküler analizden de yararlanılmaktadır (49). *Brucella* spp.'nin izolas-

yonuna dayanan kültürel yoklamalar "Altın Standart" olarak kabul edilmekte ve her zaman geçerliliğini korumaktadır.

AMOS PCR, *Brucella* türlerinin identifikasyonu için kullanılan önemli PCR analizlerinden biridir. Bu yöntem, *Brucella* kromozomunda yerleşen IS711 sekansının türe özgü lokalizasyonundan kaynaklanan polimorfizm üzerine kuruludur ve *B. abortus*'u (biyovar 1, 2, ve 4), *B. melitensis*'i (biyovar 1, 2 ve 3), *B. ovis*'i ve *B. suis*'i (biyovar 1) identifiye edebilmektedir (12). Bu metot, son zamanlarda *B. abortus* S19 ve RB51 aşı suşları gibi ek suşların da tanımlanabilmesi ve türlerin tanımlanma performansının artırılması için yeni spesifik primerler eklenerek modifiye edilmiştir (12,16).

Bu çalışmada, Kayseri ilinde pazar, market ve şarküterilerde tüketime sunulan çiğ süt ve peynir örneklerinde *Brucella* spp. varlığının konvansiyonel kültür yöntemi ve AMOS-PCR ile araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Süt ve peynir örnekleri

Çalışmada, Mayıs-Haziran 2012 tarihleri arasında, Kayseri ilinde pazar, market ve şarküterilerde tüketime sunulan çiğ inek sütü (100 adet), taze beyaz peynir (100 adet) ve salamura beyaz peynirlerden (100 adet) alınan toplam 300 örnek materyal olarak kullanıldı.

Süt örnekleri 50'şer mL, peynir örnekleri ise steril bistüri ve pens yardımıyla yaklaşık 100 gram olacak şekilde steril plastik kaplara alınarak soğuk zincirde laboratuvara getirildi. Örnekler, analizler yapıncaya kadar +4°C'de saklandı.

Standart suş

Brucella spp. izolasyonu, izolatların fenotipik testler ve moleküler analiz ile identifikasyonu aşamalarında Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan *B. melitensis* ve *B. abortus* saha suşları (koyun ve sığır abort vakalarından izole edilen ve PCR ile tanımlanan) kullanıldı.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan primerler ve beklenen bant büyüklükleri

Primer	Sequence 5'-3'	Amplikon büyüklüğü (bp)	Kaynak
IS711	TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT		
<i>B. melitensis</i>	AAA TCG CGT CCT TGC TGG TCT GA	731	Bricker ve Halling, 1994 (12)
<i>B. abortus</i>	GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC	498	
<i>B. ovis</i>	CGG GTT CTG GCA CCA TCG TCG	976	

DNA ekstraksiyonu

Brucella izolatlarından DNA izolasyonu, MoBio Ultra Clean™ Microbial DNA (Mo Bio Laboratories, 12224-250, ABD) ekstraksiyon kiti ile yapıldı.

Primerler

AMOS-PCR testinde IS711, *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. ovis* primerleri kullanıldı (Tablo 1).

***Brucella* spp. izolasyonu**

Süt örnekleri 6000-7000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Üstteki kaymak tabakası uzaklaştırıldıktan sonra alt kısımda yer alan süt örneğinden 5'er mL alınarak ön zenginleştirme amacıyla içerisinde 45 mL Farrell broth [(*Brucella* Broth (Himedia M.348, Hindistan), %5 at serumu (Oxoid SR0035, İngiltere), 10g/L Glikoz (Merck 1.083461000, Almanya), 1vial/500mL *Brucella* Selective Supplement (Oxoid SR0083A, İngiltere)] bulunan iki tüpe ilave edildi. Tüpler 37°C'de 5 gün süreyle biri aerob, diğeri ise %5-10 CO₂'li (Thermo Scientific™, CN0025A, ABD.) ortamda her gün karıştırılarak inkübe edildi.

Her bir peynir örneğinin farklı bölgelerinden yaklaşık 10 gram alındı. Steril stomacher poşetlerine konuldu. Üzerine 90 mL steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ilave edildi ve stomacherde orta hızda 3 dk karıştırılarak homojen hale getirildi. Ön zenginleştirme amacıyla içerisinde 90 mL Farrell broth bulunan iki stomacher poşeti alındı. Homojen hale getirilmiş peynir örneğinden 10'ar mL alınarak bu poşetlere ilave edildi. Stomacher poşetlerinin ağızları lastik ile gevşek olarak kapatıldı. Ekim yapılan stomacher poşetleri, 37°C'de 5 gün süreyle biri aerob, diğeri ise %5-10 CO₂'li ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresince ekim yapılan poşetler yavaşça karıştırıldı. İnkübasyon sonunda etüvden çıkarılan süt ve peynir örneklerini içeren tüp ve stomacher poşetleri karıştırıldıktan sonra her birinden 0.1 mL alınarak Farrell agara [*Brucella* Medium Base (Himedia M.1638, Hindistan), %5 at serumu (Oxoid SR0035, İngiltere), 1vial/500ml *Brucella* Selective Supplement (Oxoid SR0083A, İngiltere)] ekimleri yapıldı. Ekim yapılan petripler ilk izolasyonda kullanılan atmosferde 37°C'de 3-5 gün süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonunda etüvden çıkarılan petripler *Brucella* spp. yönünden incelendi. *Brucella* spp. şüpheli kolonilerden kanlı agara pasaj yapılarak saf kültürler elde edildi.

***Brucella* spp.'nin fenotipik yöntemler ile identifikasyonu**

Makroskobik morfolojilerine göre *Brucella* spp. şüpheli kolonilerden elde edilen saf kültürlerin identifikasyonu için; Gram boyama, katalaz, oksidaz, hareket, CO₂ gereksinimi, H₂S üretimi, üreaz aktivitesi, boya tolerans testleri, monospesifik serumlarla aglutinasyon gibi fenotipik testler yapıldı (11).

***Brucella* spp.'nin AMOS-PCR ile identifikasyonu**

Süt ve peynir örneklerinden izole edilen ve fenotipik testlerle identifiye edilen *Brucella* spp. izolatları, AMOS-PCR ile moleküler olarak incelendi (12). PCR işlemi, AMOS-PCR yöntemine göre aşağıda bildirildiği gibi yapıldı.

Toplam 50 µL hacimde hazırlanan PCR karışımı için, 10xPCR buffer (Applied Biosystems N8080129, ABD), 1.5 mM MgCl₂ (ThermoFisher R0971, ABD), her bir dNTP (ThermoFisher R0241)'den 0.25mM, IS711 primerinden 1 µM olmak üzere, diğer primerlerden (*B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. ovis*) 0.2'şer µM ve 1U taq DNA polimeraz enzimi (ThermoFisher EPO402) kullanıldı. Karışımın üzerine 5 µl ekstrakte edilmiş hedef DNA ilave edildi. PCR'de kullanılan amplifikasyon koşulları; 95°C'de 1.15 dk denatürasyon, 55.5°C'de 2 dk primer bağlanması ve 72°C'de 2 dk primer uzamasından oluşan 35 siklus ve 72°C'de 5 dk final uzamadan oluştu. Amplifikasyon sonucunda elde edilen PCR ürünleri, etidium bromide ilave edilmiş (3µL/50mL), % 1.5'lik agaroz jelde; 120 volt gerilimde 500 A'de 60 dk, elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra, jel dökümantasyon sistemi (Vilber Lourmat, Fransa) kullanılarak görüntülendi. Bu test sonunda *Brucella* türleri; jeldeki bantlar, beklenen bant büyüklükleri karşılaştırılarak belirlendi (Tablo 1).

Aşı suşu ve saha suşlarının fenotipik testlerle ayırımı

Bu amaçla Erdenliğ Gürbilek ve ark. (21)'nin bildirdiği yöntemden yararlanıldı. *B. abortus* S19 aşı suşunun saha suşundan ayırımı için; 5 IU penisilin/mL, 1 mg/mL i-eritritol ve 2µg/mL tiyoinin mavisinin ilave edildiği üç ayrı serum dekstroz besiyerinde üreme testleri kullanıldı. Ayrıca izolatın üremesi için CO₂ gereksinimi değerlendirildi. *B. melitensis* izolatlarının, *B. melitensis* Rev-1 aşı suşundan ayırımı için; 20 µg/mL bazik fuksin ve tiyoinin, 2.5 µg/mL streptomisin ve 5 IU penisilin/mL ilave edilen dört ayrı serum dekstroz besiyerinde üreme testleri kullanıldı.

Bulgular

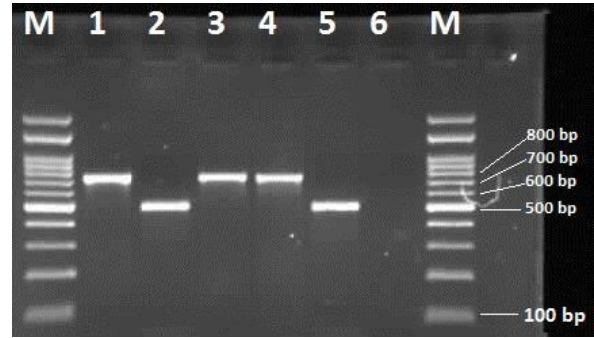
Fenotipik testlerle *Brucella* spp. izolasyon ve identifikasyon sonuçları

Çalışmada incelenen 100 adet çiğ inek sütü örneğinin biri (%1) *Brucella* spp. yönünden pozitif bulundu. Bu izolat fenotipik testlerle *B. abortus* biyotip 1 olarak tanımlandı (Tablo 2, Tablo 3). İncelenen 100 adet taze peynir örneğinin ikisi (%2) *Brucella* spp. yönünden pozitif bulundu. Bu izolatların her ikisi de fenotipik testlerle *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlandı. Salamura peynir örneklerinden ise *Brucella* spp. izole edilemedi (Tablo 2, Tablo 3). İzolatların fenotipik özellikleri ile ilgili detaylı bilgiler Tablo 2'de verilmiştir.

Brucella spp.'nin AMOS-PCR ile identifikasyon sonuçları

Sütten izole edilen ve fenotipik testlerle tanımlanan bir adet *B. abortus* izolatı için AMOS-PCR sonucunda 498 bp'de bant belirlendi. AMOS-PCR analizi *B. abortus*'un 1, 2 ve 4 biyotiplerini (498 bp) saptamaktadır. Bu izolat *B. abortus* biyotip 1, 2 ve 4 pozitif olarak saptandı (Şekil 1).

Taze peynir örneğinden izole edilen ve fenotipik testlerle tanımlanan 2 adet *B. melitensis* izolatı için, AMOS-PCR analizi sonucunda 731 bp'de bant belirlendi. AMOS-PCR, *B. melitensis*'in 3 biyotipini de saptamakta olup bu izolatlar moleküler analizle *B. melitensis* biyotip 1, 2 ve 3 pozitif olarak saptandı (Şekil 1). Böylece fenotipik testler ile tanımlanan izolatlar moleküler analiz ile doğrulandı.



Şekil 1. *Brucella* spp. izolatlarına ait AMOS-PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforez (%1.5) görüntüsü M: 100 bp DNA Ladder, 1: Pozitif Kontrol *B. melitensis* (731 bp) 2: Pozitif kontrol *B. abortus* (498 bp), 3-4: *B. melitensis* (taze peynir izolatı) 5: *B. abortus* (süt izolatı), 6: Negatif kontrol, steril distile su.

Aşı suşu ve saha suşlarının fenotipik testlerle ayırımı

Çalışmada elde edilen hem *B. abortus* hem de *B. melitensis* izolatlarının fenotipik testler sonucunda aşı suşu olmadıkları saptandı.

Tablo 2. Tanımlanan *Brucella* spp. izolatlarının fenotipik test sonuçları

Tür	Kaynak	Biyotip	CO ₂ ihtiyacı	H ₂ S üretimi	Üreaz aktivitesi	Boyalarda Üreme			Aglütinasyon		Tb fajı ile lizis (RTD)	
						Thionin a	Fuchsin b	Fuchsin c	Anti A	Anti M		
<i>B. abortus</i>	Süt	1	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
<i>B. melitensis</i>	Taze peynir	3	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>B. melitensis</i>	Taze peynir	3	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-

a: 1/25000 b: 1/50000 c: 1/100000

A: Monospesifik abortus antiserumu

M: Monospesifik melitensis antiserumu

RTD: Rutin test dilasyonu

Tablo 3. Süt ve peynir örneklerinden *Brucella* spp. izolasyon ve identifikasyon sonuçları

Kaynak	Örnek sayısı	<i>Brucella</i> spp. pozitif örnek sayısı	<i>B. abortus</i>	<i>B. melitensis</i>
Süt	100	1	+	-
Taze peynir	100	2	-	+
Salamura peynir	100	-	-	-

Tartışma ve Sonuç

Brucella etkenlerinin insanlara bulaşmasında, infekte hayvanlardan elde edilen süt ve süt ürünlerinin çiğ olarak tüketilmesi, özellikle çiğ süttten yapılan ve olgunlaşmadan tüketime sunulan taze beyaz peynirlerin önemli rol oynadığı çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir. Yurdumuzun çeşitli bölgelerinde süt örneklerinden *Brucella* spp. izolasyonu ve identifikasyonuna yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda *Brucella* spp. izolasyon oranlarının %0 (30,31,52) ile %25 (3,10,14,17,22,23,25,32) arasında olduğu bildirilmektedir.

Bu çalışmada Kayseri çevresinde pazar, market ve şarküteriye satışı sunulan çiğ inek süt örneklerinden %1 oranında *Brucella* spp. izolasyonu yapılmış ve bu izolat *B. abortus* biyotip 1 olarak fenotipik ve moleküler yöntemle tanımlanmıştır.

Elde edilen izolasyon oranı yukarıda bildirilen araştırmacıların (3,10,14,17,22,23,25,30,31,32,52) sonuçları ile kıyaslandığında bazı araştırmacılar (10,30,31,52) yüksek, bazı araştırmacıların (14,17,22,23,32) sonuçlarından ise düşük olduğu görülmektedir.

İzolasyon oranlarındaki bu farklılık; süt örneklerinin brusellozisli ya da bu enfeksiyonu geçiren hayvanlardan alınmasına ve süttün içerdiği bakteri sayısına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Keza, çalışmamızda kullanılan süt örnekleri direkt olarak hayvanlardan alınmamış olup bir tankta ya da bir kapta toplanmış olan farklı hayvanların sütlerini içeren ve satışı sunulan sütlardan alınmışlardır. Bu sebeple etkenin süt içerisinde dilüe olması durumu da göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca anılan çalışmalarda; etkenin izolasyonunda kullanılan besiyerleri, kullanılan üreme koşulları ve etkenin fenotipik tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal aktivitelerin değerlendirilmesi (subjektif olması) gibi faktörlerin de bu sonuçlara etkili olduğu düşünülmektedir. Bunlara ek olarak ülkelerin *Brucella* eradikasyon programı için uygulamaya koydukları aşılama programları da göz önünde bulundurulmalıdır.

Dünyanın birçok yerinde yapılan çalışmaların ise daha çok seropozitif hayvanlardan alınan süt örneklerinde *Brucella* spp. izolasyonuna yönelik olduğu görülmektedir (2,27,34,35,38,43,48,60). Yapılan bu çalışmalarda seropozitif hayvanlara ait süt örneklerinde *Brucella* spp. izolasyon oranlarının yüksek olması; etkenin enfekte ve hastalığı geçiren hayvanların %80'inde lenf no-

düllerine kolonize olması ve laktasyon boyunca kronik ya da aralıklı olarak etkenin sütle saçılmasına bağlıdır (26).

Koyun ve keçiler *B. melitensis*'in, sığırlar ise *B. abortus*'un ana konakçılarıdır. Infekte hayvanların sütleri ile yüksek miktarda ve uzun süre saçılması *Brucella* etkenlerini içeren ve pastörize edilmeyen sütlardan hazırlanan ürünlerin tüketimi insanlar için enfeksiyon kaynağını oluşturur. Bu çalışmada, 100 taze peynir örneğinden ikisi (%2) *Brucella* spp. yönünden pozitif olarak belirlendi. Bu izolatların fenotipik testlerle identifikasyonunda *B. melitensis* biyotip 3 olduğu saptandı ve moleküler yöntem ile de *B. melitensis* (biyotip 1,2 ve 3) olduğu doğrulandı. Yüz adet salamura peynir örneğinden ise *Brucella* spp. izole edilemedi.

Ülkemizin farklı bölgelerinde çeşitli peynir örneklerinden *Brucella* spp. izolasyonuna yönelik yapılan çalışmalarda etkenin izole edilemediği bildirilmiştir (9,25,30,40,46,47,52-54,59). Diğer ülkelerde konu ile ilgili yapılan çalışmalarda ülkemizdeki çalışmalara benzer olarak *Brucella* spp. izolasyonu yapılamadığı bildirilmiştir (20,37). Bu çalışmalarda, *Brucella* spp. izolasyonu yapılamamasının nedeni; alınan peynir örneklerinin yapıldığı süttün kaynağı, etkenin süttteki kontaminasyon seviyesi, peynir üretim süreçlerindeki değişiklikler, üretim şartları, peynirin olgunlaşma süresine bağlı olabilir. Ayrıca alınan peynir numunesinde rastgele örnekleme yapıldığı için bakterinin bu kısımlarda bulunmaması da başka bir faktör olarak düşünülebilir.

Gerek Türkiye'de (6-8,13,23,28,29,36,39,41,44,50,55) ve gerekse diğer ülkelerde (1,4,5) çeşitli peynir örneklerinden *Brucella* spp.'nin saptandığı çalışmalarda *Brucella* spp. izolasyon oranları %2-20.5 arasında farklılık göstermektedir. Çalışmamızda taze peynir örneklerinden %2 oranında *B. melitensis* izole edilmiştir. Çalışmamızın bulguları Eren (23), Akbarmehr (5), ve Patır ve Dinçoğlu (41)'nin bulguları ile uyumlu iken diğer çalışmalarda (6-8,13,28,29,36,39,44,50,55) bulgularımızdan daha yüksek izolasyon oranları bildirilmiştir. Yüksek izolasyon oranları, peynir yapımında çok miktarda etken içeren sütlarin hammadde olarak kullanılmasına bağlı olabilir. Şöyle ki; Ülkemizde yöresel taze peynir yapımı çoğunlukla çiğ süttün 32-35°C'lere kadar ısıtılıp ve mayalanması ile sağlanır. Peynirin bu şekilde yapılması insanlar açısından gerek damak tadı gerekse maddi açıdan (ısıtma maliyeti, peynir ran-

dımanı) tercih nedenidir. Yüksek düzeyde *Brucella* spp. içeren sütler, yeterli ısıl işleme tabi tutulmadığı için peynirde *Brucella* spp.'nin kaynağını oluşturmaktadır. Hasta hayvanların bulunduğu bölgelerde sütle bakteri saçılımı yüksek olabileceği için analiz edilen peynir örneklerinde *Brucella* spp. varlığı da o oranda artabilmektedir. Yine peynir örneklerinin rastgele alınması, kullanılan izolasyon yöntemleri, peynirlerin olgunlaşma süreleri gibi faktörlerde bu izolasyon oranları üzerinde etkilidir. Ayrıca bildirilen çalışmalarda peynir örneklerinden *B. melitensis*'in daha yüksek oranda izole edildiği görülmekte olup bu çalışmada da taze peynir örneklerinden elde edilen iki izolat *B. melitensis* olarak tanımlanmıştır.

Bu çalışmada salamura peynirlerden *Brucella* spp. izolasyonu yapılamamıştır. Salamura peynirde *Brucella* spp. izolasyonuna yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışma ile uyumlu olarak Ataş ve ark. (8) market ve şarküterilerden alınan 120 adet salamura beyaz peynir örneğinde *Brucella* spp. izole edemediklerini bildirmişlerdir. *Brucella* etkenlerinin %20 tuz içeren salamurada çiğ süttan yapılmış peynirde 35-40 gün (12°C'de) yaşayabildiği rapor edilmiştir (42). Salamura peynirde, peynir içerisine homojen tuz geçişinin sağlanması ve peynirin salamura içerisinde kalış süresi gibi faktörlerin de *Brucella* spp. izolasyonunda etkili olduğu düşünülmektedir.

Türk Gıda Kodeksinde çiğ süttan yapılan peynirde koagülaz pozitif stafilokokların varlığı ve çiğ süt veya pastörizasyondan daha az sıcaklık uygulanmış süttan üretilen tereyağ ve krema için *E. coli* varlığı ile ilgili düzenleme mevcut olmasına rağmen peynirlerde *Brucella* bakterilerinin varlığının araştırılmasına ilişkin herhangi bir düzenleme bulunmamaktadır. Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği (Tebliğ No:2015/6) (51) incelendiğinde piyasaya sürülen peynirlerin *Brucella* etkenleri yönünden kontrolü ile ilgili bilgilerin yetersiz olduğu anlaşılmaktadır.

Sonuç olarak, çalışmamızda elde edilen *Brucella* izolasyon oranları literatür verileri ile kıyaslandığında düşük olmasına rağmen etkeni içeren bu süt ve peynirlerin tüketiminin halk sağlığı açısından risk oluşturduğu düşünülmektedir. Çiğ süt ve peynirlerin tüketimden önce *Brucella* spp. içermemesi konusunda yeterli yasal düzenlemelerin yapılmasının bu tip peynirler ile bulaşmalarını azaltacağı kanısını güçlendirmektedir.

Kaynaklar

1. Abbas BA, Talei AB. Isolation, identification and biotyping of *Brucella* spp. from milk product at Basrah province. *Bas J Vet Res* 2010; 9(1): 152-62.
2. Abdalla A, Hamid ME. Comparison of conventional and non-conventional techniques for the diagnosis of bovine brucellosis in Sudan. *Trop Anim Health Prod* 2012; 44(6): 1151-5.
3. Abdelkareem AA, İkiz S, Ak S. Trakya yöresinde yetiştirilen sığırların sütlerinden *Brucella* türlerinin varlığının bakteriyolojik ve moleküler yöntemlerle karşılaştırılması olarak araştırılması. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg* 2011; 37(1): 23-33.
4. Acedo E, Diaz ME, Leon AB. Incidence of *Brucella* spp. in raw milk and fresh regional cheese. *Alimentaria* 1997; 281: 57-60.
5. Akbarmehr J. The prevalence of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in local cheese produced in Sarab city, Iran and its public health implication. *Afr J Microbiol Res* 2011; 5(12): 1500-3.
6. Akcan AS. Burdur yöresinde tüketime sunulan taze beyaz peynirlerde *Brucella* spp. varlığı, Yüksek Lisans tezi, Selçuk Üniv Sağlık Bil Ens, Konya 2009; p. 46.
7. Alim A, Tomul DZ. Sivas il merkezindeki semt pazarlarında satılan taze peynirlerin *Brucella* yönünden araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2005; 39(2): 219-23.
8. Ataş M, Poyraz Ö, Alim A, Ataş AD, Çelik A. Sivas il merkezinde satışa sunulan taze ve salamura beyaz peynirlerin *Brucella* bakterileri yönünden incelenmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2007; 64(2): 9-14.
9. Ayaz Y. Ankara piyasasında satılan beyaz peynirlerde brucellosis etmenlerinin araştırılması. *Etlik Vet Mikrob Enst Derg* 1986; 5: 109-16.
10. Aydın E. Süt ve süt ürünlerinde *Brucella* cinsi bakterilerin araştırılması, Yüksek Lisans tezi, Mersin Üniv Sağlık Bil Ens, Mersin 2007; p. 75.
11. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. İkinci Baskı. İzmir: Barış Yayınları, 1995; p. 478.
12. Bricker, BJ, Halling, SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32(11): 2660-6.
13. Buğdaycı K. Kayseri ilinde çiğ sütlerden ya-

- pılan taze beyaz peynirlerde *Brucella* spp. aranması, Doktora tezi, İstanbul Üniv Sağ Bil Ens, İstanbul 2003.
14. Büyük F, Şahin M. Kars yöresinde atık yapan ineklerin çeşitli örneklerinden *Brucella* etkenlerinin kültürel ve moleküler yöntemlerle araştırılması ve olguların epidemiyolojik analizi. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2011; 17 (5): 809-16.
 15. CFSPH, The Center for Food Security and Public Health, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, 2009, Brucellosis in Marine Mammals, http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_marine.pdf, Erişim tarihi: 28.11.2016.
 16. Cloeckert A, Zygmunt MS. *Brucella*, Labbe RG, Garcia S. eds. In: Guide to Foodborne Pathogens, 2nd Edition. United Kingdom: Wiley-Blackwell Publishing, 2013; p. 215.
 17. Çelebi Ö. Kars yöresinde atık yapmış inek sürülerinden alınan süt ve vajinal sıvı örneklerinden *Brucella* etkenlerinin bakteriyolojik ve moleküler tanımlanması, Doktora tezi, Kafkas Üniv Sağ Bil Ens, Kars 2009; p. 67.
 18. Çelebi S, Hacımustafaoğlu MK. Brucellozis-Derleme. J Curr Pediatr 2004; 2: 39-43.
 19. Çelebi S. Brusellozun epidemiyolojisi. Ankem Derg 2003; 17(3): 340-3.
 20. Di Giannatale E, Alessiani A, Prencipe V, Matteucci O, Persiani T, Zilli K, Migliorati G. Polymerase chain reaction and bacteriological comparative analysis of raw milk samples and buffalo mozzarella produced and marketed in Caserta in the Campania region of Italy. Vet Ital 2009; 45(3): 437-42.
 21. Erdenliğ Gürbilek S, Baklan EA, Aksoy HY. Türkiye'de 2007 ve 2008 yılları arasında izole edilen brusella suşlarının identifikasyonu ve faj duyarlılıklarının saptanması. Harran Üniv Vet Fak Derg 2014; 3(2): 67-72.
 22. Erdenliğ Gürbilek S, Tel OY, Keskin O. Brusellozis şüpheli sürülerdeki ineklerden alınan klinik örneklerden *Brucella* spp tanısı için PCR ve bakteriyolojik kültür yöntemlerinin karşılaştırılması. Harran Üniv Vet Fak Derg 2015; 4(2): 48-52.
 23. Eren E. Afyon bölgesinde toplanan süt ve peynir örneklerinden *Brucella* türlerinin saptanması, Yüksek Lisans tezi, Afyon Kocatepe Üniv Sağ Bil Ens, Afyon 2004; p. 8.
 24. Ficht T. *Brucella* taxonomy and evolution. Future Microbiol 2010; 5(6): 859-66.
 25. Gülbaz G. Kars yöresinde satışa sunulan çiğ süt, peynir ve tereyağında *Brucella* türlerinin izolasyonu identifikasyonu ve moleküler tekniklerle belirlenmesi, Doktora tezi, Kafkas Üniv Sağ Bil Ens, Kars 2011; p. 72.
 26. Hamdy MER, Amin AS. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. Vet J 2002; 163(3): 299-305.
 27. Ibrahim AK, AbdelAll AA, Amin AS. Long-term diagnostic studies for detection of *Brucella* spp. in milk samples. Glob Vet 2012; 8 (1): 54-61.
 28. Kalender H, Özcan C, Arslan N. Taze tulum peynirlerinden *Brucella* izolasyonu. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2001; 31(3-4): 184-6.
 29. Kara R, Akkaya L. Investigation of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* at cheeses in Afyonkarahisar, Turkey. Br J Dairy Sci 2013; 3(1): 5-8.
 30. Karadal F, Ertas Onmaz N, Bağcı C, Yıldırım Y, Al S, Abay S. Niğe ilinde satışa sunulan koyun-keçi sütü ve peynirlerinde *Brucella melitensis* ve biyotiplerinin araştırılması. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2016; 13(2): 101-8.
 31. Kasımoğlu A. Determination of *Brucella* spp. in raw milk and Turkish white cheese in Kırıkkale. Dtsch Tierarztl Wochenschr 2002; 109(7): 324-6.
 32. Kaynak-Onurdag F, Okten S, Sen B. Screening *Brucella* spp. in bovine raw milk by real-time quantitative PCR and conventional methods in a pilot region of vaccination, Edirne, Turkey. J Dairy Sci 2016; 99(5): 3351-7.
 33. Kılıç S. Bruselloz: Mikrobiyolojik tanı. Türkiye Klinikleri, J Infect Dis-Special Topics 2012; 5(1): 46-66.
 34. Langoni H, Ichihara SM, Silva AV. Isolation of *Brucella* spp from milk of brucellosis positive cows in São Paulo and Minas Gerais states. Braz J Vet Res Anim Sci 2000; 37 (6): 444-8.
 35. Maymona AM, Mohamed TS, Abdulwahab YA, Musa TM, Phenotypic characterization of *Brucella melitensis* isolated from livestock in Abu Dhabi Emirate. Afr J Microbiol Res 2014; 8(39): 3523-8.
 36. Mert A. Ankara yöresinde pazarlanan taze peynirlerde *Brucella*'ların varlığı üzerine araştırmalar, Doktora tezi, Ankara Üniv Sağ

- Bil Ens, Ankara 1984.
37. Miyashiro S, Scarcelli E, Piatti RM, Campos FR, Vialta A, Keid LB, Dias RA, Genovez ME. Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the polymerase chain reaction (PCR). Braz J Microbiol 2007; 38 (1):17-22.
 38. Mugizi D.R, Muradrasoli, S, Boqvist, S, Eru-me, J, Nasinyama, GW, Waiswa C, Mboowa, G, Klint M, Magnusson U. Isolation and molecular characterization of *Brucella* isolates in cattle milk in Uganda. BioMed Res Int 2015: 1-9.
 39. Namin AS. İstanbul'da bazı semt pazarlarından toplanan beyaz peynir örneklerinde *Brucella* bakterilerinin aranması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniv Sağlık Bil Ens, İstanbul 1990.
 40. Parlakgöl D. *Brucella* ve *Listeria* bakterilerini peynirden ayırabilmek için balıklı besiyerinin geliştirilmesi ve İstanbul'da satılan peynirlerde bu bakterilerin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1993; 23(4) :239-43.
 41. Patır B, Dinçoğlu HA. Elazığ'da tüketime sunulan taze beyaz peynirler ile tulum peynirlerinde *Brucella* spp'nin varlığı üzerine araştırmalar. FÜ Sağlık Bil Vet Derg 2001;15(1): 15-22.
 42. Plommet M, Fensterbank R, Vassal L, Aulclair J, Mocquot G, Vachot JC, Courault M, Musset D. Survival of *Brucella abortus* in ripened soft cheese made from naturally infected cow's milk Le Lait, INRA 1988; 68 (2): 115-20.
 43. Rodríguez-Hidalgo RI, Contreras-Zamora J, Benitez Ortiz W, Guerrero-Viracocha K, Salcan-Guaman H, Minda E, Ron Garrido L. Circulating strains of *Brucella abortus* in cattle in Santo Domingo De Los Tsáchilas Province - Ecuador. Front Public Health 2015; 3: 1-5.
 44. Sancak YC, Boynukara B, Yardımcı H. Van otlu peynirlerinde *Brucella*'ların varlığı ve dayanma süresinin saptanması. Veterinarium 1993; 4(1): 1-3.
 45. Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Kämpfer P, Cloeckert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, De BK. *Brucella inopinata* sp. nov, isolated from a breast implant infection. Int J Syst Evol Microbiol 2010; 60(4): 801-8.
 46. Serpe L, Gallo P, Fidanza N, Scaramuzza A, Fenizia D. Single step method for rapid detection of *Brucella* spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. J Dairy Res 1999; 66(2): 313-7.
 47. Sert S, Kıvanç M. Erzurum piyasasında tüketime sunulan beyaz peynirlerin hijyenik kaliteleri üzerine bir araştırma. Atatürk Üniv Zir Fak Derg 1984; 15(3-4): 79-89.
 48. Shahzad A, Qurban A, Falk M, lahtasham K, Shamim A, Heinrich N, Syed MJ. Isolation and identification of bovine *Brucella* isolates from Pakistan by biochemical tests and PCR. Trop Anim Health Prod 2014; 46: 73-8.
 49. Terzi G, Büyüktanır Ö, Genç O, Gücükoğlu A, Yurdusev N. Detection of *Brucella* antibody and DNA in cow milk by ELISA and PCR methods. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 2010; 16 (Suppl-A): 47-52.
 50. Tunçbilek M. Ankara piyasasında satılan taze beyaz peynirlerin brucellosis riski yönünden incelenmesi, Yüksek Lisans tezi, Ankara Üniv Sağlık Bil Ens, Ankara 1992; p. 42.
 51. Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği (Tebliğ No: 2015/6) <http://mevzuat.basbakanlik.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=9.5.20523&MevzuatIlski=0&sourceXmlSearch=peynir>, Erişim tarihi: 08.12.2016.
 52. Türütoğlu H, Mutluer B, Uysal Y. Burdur bölgesinden toplanan süt ve peynirlerin *Brucella* infeksiyonu yönünden incelenmesi. Tübitak VHAK-100-V-007 Burdur Tübitak Araştırma Projesi 2001; 1-36.
 53. Urçar S. Erzurum ili piyasasında tüketime sunulan bazı peynirlerde *Brucella* spp. varlığının araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniv Sağlık Bil Ens, Erzurum 2011; p. 25.
 54. Urhan G. Ankara'da çeşitli kaynaklardan satın alınan beyaz peynirlerin mikrobiyolojik kalite kontrolü üzerinde araştırmalar, Yüksek Lisans tezi, Ankara Üniv Sağlık Bil Ens, Ankara 2012; p. 48.
 55. Ünel S, Williams CF, Stableforth AW. Balıkesir bölgesinde süt krema imalathane ve köylü beyaz peynirlerinde *Brucella melitensis*'in kalma süresi. Pendik Mikrob Enst Derg 1968; 2: 67.
 56. Whatmore AM, Davison N, Cloeckert A, Al Dahouk S, Zygmunt MS, Brew SD, Perret

- LL, Koylass MS, Vergnaud G, Quance C, Scholz EC, Dick Jr EJ, Hubbard G, Schlabritz-Loutsevitch N. *Brucella papionis* sp. nov. isolated from baboons (*Papio* spp.). Int J Syst Evol Microbiol 2014; 64:4120-8.
57. Whatmore AM. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. Infect Genet Evol 2009; 9(6): 1168-84.
58. Yamazhan T. Epidemiyoloji. Derleme. Türkiye Klinikleri J Infect Dis-Special Topics 2012; 5(1): 11-4.
59. Yıldırıncı G. İstanbul piyasasında satışı sunulan tulum peynirlerinde *Brucella* etkenlerinin mevcudiyeti üzerine araştırmalar, Doktora Tezi, İstanbul Üniv Sağ Bil Ens, İstanbul 1993.
60. Zowghi E, Ebadi A, Mohseni B. Isolation of *Brucella* organisms from the milk of seronegative cows. Rev Sci Tech Off Int Epiz 1990; 9(4): 1175-8.

Sorumlu Yazar:

Doç. Dr. Seçil ABAY
Erciyes Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
38039 Melikgazi/KAYSERİ
E-posta: sabay@erciyes.edu.tr
Tel: 0 352 207 66 66/29912



Gebe Tavşanlarda Deneysel Ketozis Olgularında Fetal Umbilikal Arter Doppler Uygulamalarının Diagnostik Etkinliğinin İncelenmesi^{*,}**

Şaziye URAL, Güneş ERDOĞAN

Annan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Aydın-TÜRKİYE

Özet: Bu çalışmada deneysel ketozis oluşturulan gebe tavşanlarda fetal Doppler ultrasonografi ile fetal dolaşım üzerindeki değişikliklerin tespiti ve umbilikal arter (UA) Doppler indekslerinin tanı değerinin araştırılması amaçlanmıştır. Materyal olarak; 14 adet sağlıklı Yeni Zelanda ırkı gebe dişi tavşan kullanıldı. Gebe hayvanlardan, ketozis grubundaki (n=7) tavşanlar gebeliğin son trimesterinde beş gün boyunca aç bırakılarak ketozis induksiyonu yapıldı. Kontrol grubundaki (n=7) hayvanlar ise normal şekilde beslenmeye devam edildi. Ketozis induksiyonuna gebeliğin 25±1 günlerinde başlanıp, hastalığın kesin tanısı günlük idrar örneklerinin strip muayenesinde keton cisimciklerinin varlığına göre yapıldı. Her iki çalışma grubunda beş gün boyunca günlük alınan venöz kan serum örneklerinden glukoz ve Beta-hidroksi bütirat (β-HBA) değerleri kaydedildi. Ek olarak; gebelik toksemisinin olası fetal hemodinamik etkisini tespit etmek için UA'deki kan akımı Doppler ultrasonografi ile incelendi. UA pulsatilite (PI) ve rezistans indeks (RI) değerleri sol abdomenin en kaudalinde gözlenen yavru üzerinden kaydedildi. Çalışma sonunda doğumlar normal olarak ve yardımsız gerçekleşti. Ölçümler sonucunda ketozis grubunda kan glukoz ve β-HBA değerlerinde önemli oranda artış görüldü (P<0.05). Bununla birlikte; UA Doppler indeks değerlerinde gruplar arasında önemli bir farklılığa rastlanmadı (P>0.05). Ayrıca diastol sonu blok, ters akım ve sistol sonu çentiklenme de görülmeydi. Sonuç olarak; gebeliğin son trimesterindeki ketozisli gebe tavşanlardaki fetal UA Doppler ultrasonografi indekslerinde tanı değeri taşıyabilecek önemli bir farklılığa rastlanmamıştır. Elde edilen bulguların gebelik toksemisi olgularında fetal dolaşımın alternatif yöntemlerle izlenmesi konusunda yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Fetal Doppler, ketozis, tavşan

Evaluation of the Diagnostic Effectiveness of Fetal Umbilical Artery Doppler Applications in the Case of Experimental Ketosis in Pregnant Rabbit

Summary: It was aimed to determine the changes in the fetal blood flow in experimental ketosis cases via Doppler ultrasonography and determine the diagnostic value of umbilical artery (UA) Doppler indices in pregnant rabbits. Fourteen healthy, pregnant, New Zealand rabbits were used. Pregnant rabbits in the ketosis group (n=7) were feed deprived during five days of third trimester for ketosis induction. The control group (n=7) animals were feed regularly. The ketosis induction was started at 25±1 days of pregnancy and the definitive diagnose were performed based on the presence of ketone bodies in daily urine samples via strip inspection. Daily serum levels of serum glucose and Beta-hidroksi butirate (β-HBA) were recorded during five days. Besides, UA blood flow was examined with Doppler ultrasonography for detecting of haemodynamic effects of pregnancy toxemia. UA Doppler pulsatility (PI) and resistance indices (RI) were recorded from the most caudal fetus in the left uterus horn. Parturitions were occurred normally and without any assistance. After measurements, the blood level of glucose and β-HBA were increased in ketosis group (P<0.05). Although no significant difference was in UA Doppler indices between study groups the end diastolic block, reverse flow and end systolic notching were detected (P>0.05). In conclusion, any significant difference in fetal UA Doppler indices that could be used as diagnostic value was not detected in ketosis cases of rabbits in last trimester. It is considered that the findings might be helpful for advances in alternative fetal monitoring in pregnancy toxemia cases.

Key words: Fetal Doppler, ketosis, rabbit

Geliş Tarihi/Submission Date : 20.12.2016
Kabul Tarihi/Accepted Date : 19.09.2017

* Bu çalışma Annan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 14015 no'lu proje ile desteklenmiştir.

** Bu çalışma VI. Uluslararası Katılımlı Türk Veteriner Jinekoloji Derneği Kongresi'nde sunulmuştur.

Giriş

Çeşitli türlerde gebelik döneminde karbonhidrat ve uçucu yağ asit metabolizmasının bozulması sonucu oluşan ketozis gebelik toksemisi ile sonuçlanır (5,6,22,26,30). Hastalık ileri gebelik döneminde büyük fetal yük ve/veya beslenme düzeyindeki azalmanın yarattığı negatif enerji

dengelessizliği nedeniyle daha çok koyunlarda (18,21,32,33,38), daha az oranda ineklerde görülmekte (33), ayrıca tavşan, kobay faresi, köpek, gelincik gibi monogastrik türlerde de rastlanmaktadır (1,3,9,23,27,29).

Gebe tavşanlarda görülen ketozis olguları gebeliğin son haftasında veya doğumdan bir-iki gün önce şekillenir. Hastalığın etiolojisinde gebeliğin son trimesterinde fetal karbonhidrat gereksiniminin yetersiz besleme ya da hiperfötasyon nedeniyle maternal yolla karşılanamaması ilk sırada yer alır. Bununla birlikte, obezite ve hareket yetersizliğinin etkili olduğu da düşünölmektedir (2,34). Doğum sonrasında ise yeni yavrulayan dişilerin yetersiz ya da düşük enerjili rasyonlarla beslendiği durumlarda da hastalık ortaya çıkmaktadır. Midede kıl topaklarının oluşumu yem tüketimini azaltarak gebelik toksemisine neden olabilir (39). Gebelik toksemisi görülen tavşanlarda kas tonusunda zayıflama, iştahsızlık, taşipne, nefes ve idrarda aseton kokusu gözlenmektedir (34). Bu hayvanlarda yağlı karaciğer sendromu ve safra kesesinde büyüme görülür (39). Otopside en önemli bulgular, karaciğer ve böbrekte yağlanmadır (2).

Obstetrik alanda Doppler ultrasonografi pratik ve hızlı bir şekilde uygulanması, noninvaziv olması ve fetüsler hakkında gerçek zamanlı sonuçlar vermesi açısından önemli bir ön tanı aracıdır. Son yıllarda teknolojik gelişmelere paralel olarak veteriner obstetrik alandaki çalışmalar hız kazanmış, özellikle evcil hayvanlarda maternal ve fetal damarların hemodinamik açıdan değerlendirilmesi mümkün olmuştur (4,10,13,25,28,31,37). Fetal izlem sırasında yapılacak Doppler ultrasonografi çeşitli patolojilerin tanısı ve sağıtım protokolünün belirlenmesinde etkili bir ön tanı yöntemidir. Gebe tavşanlardaki fetal monitorizasyon ise veteriner hekimlikte oldukça yeni bir araştırma konusudur (8,31). Bununla birlikte; tavşan plasentasının hemokoriyal-diskoidal yapısının kadın plasentası ile uyumlu olması nedeniyle tıp hekimliğinde de deneysel çalışmalarda tercih nedenidir (7,12).

Sunulan çalışmada deneysel ketozis oluşturulan gebe tavşanlarda Doppler ultrasonografi ile UA kan akımının incelenmesi ve hastalığın Doppler indeksleri üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Kliniği'nde gerçekleştirildi. Çalışma materyalini 14 adet

sağlıklı Yeni Zelanda ırkı diş tavşan oluşturdu. Çalışma sırasında yapılacak klinik uygulamalar Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun B.30.2.ADÜ.0.00.00.00/0.50.04/2011/101 nolu onayı ile yapılmıştır. Fertilitesi önceden belirlenmiş olan aynı ırktaki erkek bireylerle kontrollü olarak çiftleştirilen tavşanlara aynı gün ovulasyonu desteklemek amacıyla 0.2 ml/IM Buserelin enjekte edildi. Gebelik tanısı 9. günlerde 8 MHz mikrokonveks problu transabdominal ultrasonografi ile yapıldı ve haftalık muayeneler ile tüm gebelikler izlendi.

Çalışma materyali randomize şekilde iki eşit gruba ayrıldıktan sonra ketozis grubundaki (n=7) gebe tavşanlar gebeliğin 25±1 günlerinde başlamak üzere beş gün boyunca aç bırakıldı. Kontrol grubundaki (n=7) hayvanlar normal şekilde beslenmeye devam edildi. Bu süreçte her iki gruba ait klinik ve laboratuvar bulguları kaydedildi. Bu amaçla tüm tavşanlardan denemenin ilk gününden (0. Gün) başlayarak beş gün boyunca 24 saat arayla kulaktan venöz kan örnekleri alındı. Santrifüj sonrası serum örnekleri çıkartılarak glukoz ve Beta-hidroksi bütirat (β -HBA) değerleri spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Glikoz için ticari kit ile Sinnowa BS 3000P çift okumalı fotometre, β -HBA için ise ticari kitle Shimadzu 1601 spektrofotometre cihazı kullanıldı. Bununla birlikte tavşanlardan günlük idrar örnekleri alınarak strip muayene gerçekleştirildi ve keton cisimciklerinin tespiti ile hastalığın kesin tanısı yapıldı.

Umbilikal arter kan akımının incelenmesi için çalışmanın 0-5. günlerinde günde bir kez Pie Medical My-Lab30 (Esaote@- İtalya) ultrasonografi cihazı ile transabdominal ultrasonografi yapıldı. Bu amaçla sol abdomenin en kaudalinde gözlenen yavruya ait göbek kordonunun orta kısmındaki serbest noktadan Pulsed Wave (PW) Doppler ölçümleri yapılarak pulsatilite (PI) ve rezistans (RI) değerleri kaydedildi. Ölçümler alınmadan önce, en az üç düzenli kardiak siklus eğrisinin gözlenmiş olmasına dikkat edildi. Muayene işlemleri sırasında fetüs ve/veya annenin hareketlendiği ya da solunum hızının arttığı durumlarda uygulamaya ara verildi. Yine çekimler sırasında maternal - fetal dokularda oluşacak termal ve kavitasyon etkisini en aza indirmek için 30 sn ölçüm sonrası en az 60 sn ara verildi. İnsonasyon açısının 20°nin üzerinde olan pozisyonlardaki ölçümler değerlendirme dışı bırakıldı.

Çalışmadan elde edilen verilerin istatistikî yön-
den incelenmesi, Minitab-16 programında Stu-
dent t testi yapıldı.

Bulgular

Çalışma materyalinde gebelik süreci boyunca
hayvanlarda herhangi bir genel ve reproduktif
sorunla karşılaşılmadı. Gebelik süresinin fizyo-

Tablo 1. Gruplara göre günlük ortalama serum glukoz değerleri (mmol/ml)

Günler	Kontrol Grubu (n=7)	Ketozis Grubu (n=7)	P
1. gün (mmol/ml)	2.31 ± 1.75	6.52 ± 0.86	*
2. gün (mmol/ml)	2.38 ± 1,8	3.83 ± 2.35	*
3. gün (mmol/ml)	2.23 ± 1.82	6.46 ± 0.66	*
4. gün (mmol/ml)	3.04 ± 1.57	6.28 ± 0.46	*
5. gün (mmol/ml)	2.87 ± 2.32	6.09 ± 1.89	*

Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Beş gün boyunca kontrol ve ketozis gruplarında ölçülen serum glikoz de-
ğerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır.*:
P<0.05

Tablo 2. Gruplara göre günlük ortalama serum β-HBA değerleri (mmol/l)

Günler	Kontrol Grubu (n=7)	Ketozis Grubu (n=7)	P
1. gün (mmol/l)	0.03 ± 0.01	1.1 ± 0.05	*
2. gün (mmol/l)	0.02 ± 0	0.41 ± 0.41	*
3. gün (mmol/l)	0.12 ± 0.07	1.17 ± 0.5	*
4. gün (mmol/l)	0.07 ± 0.05	1.77 ± 1	*
5. gün (mmol/l)	0.18 ± 0.17	1.76 ± 1.09	*

Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Beş gün boyunca kontrol ve ketozis gruplarında ölçülen serum glikoz de-
ğerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. β-HBA: Beta-hidroksi bütirat
*: P<0.05

Tablo 3. Gruplara göre günlük ortalama UA PI değerleri

Günler	UA PI			UA RI			P
	Kontrol Gru- bu (n=7)	Ketozis Gru- bu (n=7)	P	Kontrol Gru- bu (n=7)	Ketozis Grubu (n=7)	P	
1. gün	1.54 ± 0.08	1.63 ± 0.16	-	0.8 ± 0.02	0.8 ± 0.03	-	
2. gün	1.61 ± 0.14	1.68 ± 0.22	-	0.81 ± 0.02	0.82 ± 0.05	-	
3. gün	1.64 ± 0.18	1.84 ± 0.22	-	0.81 ± 0.03	0.83 ± 0.04	-	
4. gün	1.77 ± 0.06	1.85 ± 0.31	-	0.83 ± 0.02	0.83 ± 0.05	-	
5. gün	1.73 ± 0.22	1.58 ± 0.26	-	0.81 ± 0.04	0.8 ± 0.41	-	

Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Kontrol ve ketozis gruplarından elde edilen 5 güne ait PI ve RI ölçümleri
arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. UA: umbilikal arter, PI: pulsatilite, RI: rezistans indeksi
-: P>0.05

lojik sınırlarda 29 ± 0.2 gün sonlanmasını takiben tüm doğumlar normal ve müdahalesiz bir şekilde gerçekleşti. Yavruların anneleri tarafından reddedilme riski göz önünde bulundurularak elle temas mümkün olduğunca engellendi. Doğan yavrularda makroskopik bakıda herhangi bir anomali ve patolojiye rastlanmadı. Postpartum süreçte anne tavşanlarda herhangi bir sağlık sorunu ile karşılaşılmadı.

Ketozis indüksiyonu sırasında gruptaki tüm tavşanlarda hareketlerde yavaşlama, uyuşukluk ve taşipne gözlemlendi. Denemenin ilk gününden (0.gün) itibaren beş gün boyunca hayvanlardan alınan venöz kan serum örneklerinden elde edilen glukoz ve β -HBA verileri istatistikî olarak değerlendirilip, aşağıdaki tablolarda sunulmuştur. İstatistiksel yönden kontrol grubu ile ketozis grubu karşılaştırıldığında; ketozisli tavşanlardaki serum glukoz düzeyinin önemli oranda yükseldiği görülmektedir ($P < 0.05$) (Tablo 1).

Tüm günlere ait ölçümler istatistikî açıdan değerlendirildiğinde ketozis grubundaki serum β -HBA düzeyinde anlamlı artış görülmüştür ($P < 0.05$) (Tablo 2). Ketozis grubunda belirgin bir şekilde β -HBA değerlerinin yükselmesi, hayvanlarda açlığa bağlı olarak deneysel ketozis oluştuğunu doğrulamıştır. Çalışma gruplarına ait günlük ortalama fetal UA PI ve RI değerleri aşağıda sunulmuştur (Tablo 3). Her iki çalışma grubunda da UA PI ve RI değerlerinde istatistiksel açıdan önemli bir fark saptanmamıştır ($P > 0.05$).

Tartışma ve Sonuç

Gebelik toksemisi başlıca koyunlar olmak üzere tüm ruminantlarda görülebilen, anne ve yavru kayıplarına neden olan önemli bir metabolik hastalıktır. Hastalığın tanısı ve tedavisinde kullanılan klinik ve laboratuvar bulgular akademisyenler ve saha hekimleri tarafından etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak gelen vakalarda sadece maternal verilerin değerlendirilmesi, hastalığın yavrularda yarattığı patolojik etkilerin tam olarak belirlenememiş olması dikkat çekicidir. Literatürde tavşan fetusları ile ilgili çalışmaların sınırlı sayıda olduğu görülmüştür (3,8,16,31).

Gebe tavşan modeli plasental yapısının kadınlarla benzerliği, bakım ve besleme kolaylıkları ve kısa süren gebelik süresi gibi nedenlerle gebelik fizyolojisinin tanınması bakımından önemlidir. Sunulan çalışmada koyun ve keçilerdeki gebelik toksemisinin tanısında yeni yöntemlerin varlığı araştırılmış ve bunun için tavşan fetus modeli kullanılmıştır. Polisca ve ark. (31),

tavşan fetuslarında incelenen damarların gebeliğin 10 gününden önce tanımlanamayacak kadar küçük olduğunu ve Doppler ultrasonografi verilerinin güvenilir olmadığını işaret etmişlerdir. Sunulan çalışmada benzer şekilde gebeliğin 9. gününden itibaren PI ve RI değerlerinin ölçümleri yapılabilmektedir. Görüntüleme cihazlarındaki teknolojik ilerlemeler göz önüne alındığında ilerideki çalışmalarda bu sınırı birkaç gün daha geriye çekmek mümkün olabilir.

Çalışma süresince PI ve RI kayıtlarındaki olası değişimlerin tespiti üzerine yoğunlaşmış olsa da ölçümler sırasında öngörülemediği ve mevcut ketozis ile ilgili olabilecek diğer patolojik bulgulara da rastlanılmamıştır. Tüm çalışma materyalinde gebelik sürecinde UA Doppler ölçümleri sırasında diastol sonu blok, ters akım görüntüsü ya da sistol sonu çentiklenme (notch) gibi patolojik olduğu kanıtlanmış ve rutin uygulamalarda ki alarm görüntülerinin hiçbiri gözlenmemiştir.

Gebe kobay, rat ve tavşanlarda yapılan çalışmalarda sınırlı beslenme ve/veya aç bırakılma ile ketonemi göstermesi geçmiş çalışmalardaki indüksiyon süreci ile uyumludur (19). Sunulan çalışmada tavşanlardan alınan idrar örneklerindeki hızlı test sonuçlarında ketonürinin şekillendiği görülmüştür. Gebelik sırasında ve laktasyonun başlangıç döneminde, koyunlarda serum glukoz düzeyinin değişim göstermediği görülmekle birlikte (15), gebe koyunlardaki serum glukoz düzeylerinin gebe olmayan veya laktasyon dönemindekilere göre düşük olduğu da görülmüştür (17). Sunulan çalışmada ketozis grubundaki tavşanların kan glukoz düzeylerinin kontrol grubuna oranla yüksek olmasının, ketozis indüksiyonu sırasında oluşan strese bağlı olduğu düşünülmektedir.

Çalışmanın ilk günü ketozis grubunda β -HBA düzeyinde belirgin azalma, ilerleyen günlerde yerini artışa bırakmıştır. Sunulan çalışmada ketozis grubunda belirgin bir şekilde β -HBA değerlerinin yükselmesi, hayvanlarda açlığa bağlı olarak deneysel ketozis oluştuğunu göstermektedir. Sunulan çalışmada ketozis grubunun β -HBA düzeyinin yüksek olması literatür çalışmalar ile uyum göstermektedir (11,20).

UA Doppler indekslerinin fetal iyilik halinin değerlendirilmesinde kullanımı ağırlıklı olarak gelişim geriliği görülen daha kronik olgular için söz konusudur. Bununla birlikte; gestasyonel diyabetli hastalarda bozulan karbonhidrat metabolizmasının fetal dolaşım üzerindeki olası etkileri önemli bir araştırma konusu olmuştur. Araştır-

macılar sağlıklı gebelerde UA Doppler indeksleri arasında pozitif korelasyon bulunduğunu, obezitenin fetoplental damarlar üzerinde negatif bir etkiye sahip olduğunu işaret etmekte, çalışma sonucunda UA Doppler ölçümlerinin değerlendirilmesinde maternal canlı ağırlığın dikkate alınması gerektiğini bildirmişlerdir (36). Evcil hayvanlarda obezitenin ketozis oluşumunda hazırlayıcı faktör olduğu göz önüne alındığında gebelik izlemi açısından Doppler ultrasonografi uygulamalarının yardımcı etkisi olabileceği düşünülebilir.

Diyabetli gebelerde sağlıklı olan fetusların maternal ve fetal Doppler indekslerinde herhangi bir anomaliye rastlanmadığı, sadece intrauterin gelişim geriliği (IUGR) olan fetuslarda indeks değişimlerinin saptanabileceği görülmüştür (35). Benzer şekilde; diyabetli gebelerde UA damar direncinin doğum ağırlığı ve plasenta ağırlığı ile ilişkili olsa da maternal HbA1c düzeyleri ile ilgili olmadığını, plasenta Doppler ultrasonografinin preeklampsi ve IUGR olan gebelikler dışında; Doppler ultrasonografinin gestasyonel diyabetlilerde fetal izlem için klinik değeri olmadığını kaydetmişlerdir (30).

Bununla birlikte gestasyonel diabetli annelerin fetuslarında anormal PI bulgularına rastlanıldığı olguların da bulunduğu çalışmalar mevcuttur (14). Diyabetli gebeliklerde düşük UA pulsatilitesi gösteren fetuslarda makrozomi olasılığının yüksek olduğu kaydedilmiştir (24). Buna göre gebelik diyabetinin fetal etkilerinin görülmeye başlandığı noktada UA pulsatilitesinde azalma olduğu görülmektedir. Dolayısıyla olası maternal karbonhidrat metabolizmasının fetal hemodinami üzerindeki olası etkisi göz önünde tutularak, gebe takibinde daha dikkatli olunması, obstetrik ultrasonografi uygulamalarına önem verilmesi gerektiği söylenebilir.

Sunulan çalışmada, gebeliğin son haftasında aç bırakılarak ketozis induksiyonu yapılan gebe tavşanlarda fetal UA Doppler indekslerinde tanı amacıyla belirgin bir değişikliğe rastlanmamıştır. Gebelik toksemisi görülen hayvanlarda hastalığın tanı ve prognozuna ilişkin yeni belirteçlerin varlığının araştırılması yönünde benzer çalışmaların tekrarlanması, ketozis induksiyonu, hastalığın süresi, farklı rasyon kullanımı gibi değişikliklerin yapılması, Doppler ölçümleri için farklı damarların kullanımı gibi varyasyonların sağlandığı çalışmalar sayesinde gebelik toksemisi hakkında yeni bilgiler elde edilmesi mümkün olacaktır.

Kaynaklar

1. Batchelder MA, Bell JA, Erdman SE, Marini RP, Murphy JC, Fox JG. Pregnancy toxemia in the European ferret (*Mustela putorius furo*). Lab Anim Sci 1999; 49(4): 372-9.
2. Bekyürek T. Laboratuvar hayvanlarında üreme ve sorunları. Alaçam E. ed. In: Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite. Üçüncü Baskı. Ankara: Medisan, 2005; p. 355-62.
3. Bell JA. Periparturient and neonatal diseases. Hillyer EV, Quesenberry KE. eds. In: Clinical Medicine and Surgery. Philadelphia: WB Saunders, 1997; p. 53-62.
4. Bollwein H, Weber F, Woschee I, Stolla R. Transrectal doppler sonography of uterine and umbilical blood flow during pregnancy in mares. Theriogenology 2004; 61(2-3): 499-509.
5. Browning ML, Correa JE. 2008, Pregnancy toxemia (ketosis) in goats, <http://www.aces.edu/pubs/docs/U/UNP-0106/UNP-0106.pdf>, Erişim tarihi: 23.10.2012.
6. Brozos C, Mavrogianni S, Fthenakis GC. Treatment and control of peri-parturient metabolic diseases: Pregnancy toxemia, hypocalcemia, hypomagnesemia. Vet Clin North Am: Food Anim Pract 2011; 27(1): 105-13.
7. Carter AM. Animal model of human placental: a review. Placenta 2007; 28(1): 41-7.
8. Chavatte-Palmer P, Laigre P, Simonoff E, Chesne P, Challah-Jacques M, Renard JP. In utero characterisation of fetal growth by ultrasound scanning in the rabbit. Theriogenology 2008; 69 (7): 859-69.
9. Dalrymple EF. Pregnancy toxemia in a ferret. Can Vet J 2004; 45(2): 150-2.
10. Di Salvo P, Bocci F, Zelli R, Polisca A. Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in the bitch. Res Vet Sci 2006; 81(3): 382-8.
11. Durak MH, Altınar A. Effect of energy deficiency during late pregnancy in Chios ewes on free fatty acids, β -Hydroxybutyrate and urea metabolites. Turkish J Vet Anim Sci 2006; 30: 497-502.
12. Enders AC, Carter AM. What can comparative studies of placental structure tell us? A review. Placenta 2004; 25 Suppl: 3-9.
13. Erdoğan G, Cetin H, Ceylan A, Serin I, Beceriklisoy HB. Comparison of foetal growth in singleton and twin pregnancies by B-mode and Doppler ultrasonography in Kary ewes. Turkish J Vet Anim Sci 2016; 40: 616-

- 21.
14. Fadda GM, D'Antona D, Ambrosini G, Cherchi PL, Nardelli GB, Capobianco G, Dessole S. Placental and fetal pulsatility indices in gestational diabetes mellitus. *J Reprod Med* 2001; 46(4): 365-70.
15. Firat A, Ozpinar A. The study of changes in some blood parameters (glucose, urea, bilirubin AST) during and after pregnancy in association with nutritional conditions and litter size in ewes. *Doğa Türk Vet Hayv Derg* 1996; 20(5): 387-93.
16. Gutierrez HE, Zamora FMM. Ultrasonography study of rabbit pregnancy. Eight World Rabbit Congress. September, 7-10, 2004; Pueblo-Mexico.
17. Hamadeh ME, Bostedt H, Failing K. Concentration of metabolic parameters in the blood of heavily pregnant and nonpregnant ewes. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1996; 109(3): 81-6.
18. Henze P, Bickhardt K, Fuhrmann H, Sallmann HP. Spontaneous pregnancy toxemia (ketosis) in sheep and the role of insulin. *Zentralbl Veterinarmed* 1998; 45(5): 255-66.
19. Jean-Blain C, Durix A. Ketone body metabolism during pregnancy in the rabbit. *Reprod Nutr Dev* 1985; 25(3): 545-54.
20. Kennerman E. Ketozisli ineklerde serum insülin, triidotronin (T3) ve troksin (T4) düzeyleri, (serum insulin, triidothyronine (T3) and thyroxine (T4) levels in cows with ketosis). *Vet Cer Derg* 2004; 10(3-4): 34-7.
21. Kulcsar M, Danko G, Delavaud C, Mircu C, Nikolic AJ, Gaspard A, Cernescu H, Chilliard Y, Cseh S, Rudas P, Huszenicza GY. Endocrine characteristics of late pregnant hyperketonaemic ewes and their reproductive performance following the induction of ovarian cyclicity out of the breeding season. *Acta Vet Hungarica* 2006; 54: 235-49.
22. LeValley S. Pregnancy toxemia (ketosis) in ewes and does. 2010, <http://www.ext.colostate.edu/pubs/livestk/01630.pdf>. Erişim tarihi: 23.10.2012.
23. Lewington S, Whitlock G, Clarke R, Sherliker P, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55000 vascular deaths. *Lancet* 2007; 370(9602): 1829-39.
24. Maruotti GM, Rizzo G, Sirico A, Sarno L, Cirigliano L, Arduini D, Martinelli P. Are there any relationships between umbilical artery pulsatility index and macrosomia in fetuses of type I diabetic mothers? *J Matern-Fetal Neo M* 2014; 27(17): 1776-81.
25. Nautrup CP. Doppler ultrasonography of the canine maternal and fetal arteries during normal gestation. *J Reprod Fertility* 1998; 112(2): 310-4.
26. Nix J. Ketosis or pregnancy toxemia in the doe. 2006, http://www.sweetlix.com/media/documents/articles/Goat_Ketosis%20or%20Pregnancy%20Toxemia%20in%20the%20Doe.pdf. Erişim tarihi: 26.10.2012.
27. O'Rourke DP. Disease problems of Guinea pigs. Hillyer EV, Quesenberry KE, eds. In: *Ferrets, Rabbits and Rodents*. Philadelphia: WB Saunders, 1997; pp. 245-54.
28. Panarace M, Garnil C, Marfil M, Jauregui G, Lagioia J, Luther E, Medina M. Transrectal doppler sonography for evaluation of uterine blood flow throughout pregnancy in 13 cows. *Theriogenology* 2006; 66(9): 2113-9.
29. Pare JA, Murphy JP. Disorders of the reproductive and urinary systems. Hillyer EV, Quesenberry KE eds. In: *Ferrets, Rabbits, and Rodents*. Philadelphia: WB Saunders, 1997; pp. 183-93.
30. Pietryga M, Brązert J, Wender-Ożegowska E, Dubiel M, Gudmundsson S. Placental doppler velocimetry in gestational diabetes mellitus. *J Perinatal Med* 2006; 34(2): 108-10.
31. Polisca A, Scotti L, Orlandi R, Brecchia G Boiti C. Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in rabbits. *Theriogenology* 2010; 73(3): 358-66.
32. Prohaczik A, Kulcsar M Huszenicza GY. Metabolic and endocrine characteristics of pregnancy toxemia in the ferret. *Vet Med (Praha)* 2009; 54(2): 75-80.
33. Rook JS. Pregnancy toxemia in ewes, does and beef cows. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 2000; 16(2): 293-318.
34. Rosenthal KL, Forbes NA, Frye FL, Lewbart GA. *Rapid Review of Exotic Animals Medicine and Husbandry*. London: Manson Publishing, 2008; p. 31.
35. Salvesen DR, Higuera MT, Mansur CA, Freeman J, Brudenell JM, Kypros H, Nicolaides KH. Placental and fetal doppler veloci-

- metry in pregnancies complicated by maternal diabetes mellitus. Am J Obstet Gynecol 1993; 168(2): 645-52.
36. Sarno L, Maruotti GM, Saccone G, Maddalena Morlando M, Angelo Sirico A, Martinelli P. Maternal body mass index influences umbilical artery doppler velocimetry in physiologic pregnancies. Prenat Diagn 2015; 35 (2):125-8.
 37. Serin G, Gokdal O, Tarimcilar T, Atay O. Umbilical artery doppler sonography in Saanen goat fetuses during singleton and multiple pregnancies. Theriogenology 2010; 74 (6) 1082-7.
 38. Van Saun RJ. Pregnancy toxemia in a flock of sheep. J Am Vet Med Assoc 2000; 217(10): 1536-9.
 39. Yalçın S. Tavşanların Beslenmesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları. İkinci Baskı. Ankara: Pozitif, 2004; p.600.

Sorumlu Yazar:

Prof. Dr. Güneş ERDOĞAN
Adnan Menderes Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı,
Aydın-TÜRKİYE
E-posta: gunesems@yahoo.com



İstanbul İlindeki Veteriner Kliniklerine Getirilen Kedi Ve Köpeklerde Deri Hastalıklarının Görülme Oranlarının Araştırılması

İbrahim CANPOLAT, Sema ÇAKIR, Cengiz AKTAŞ

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı, Elazığ-TÜRKİYE

Özet: Bu çalışmada, İstanbul ilinde klinik, poliklinik, bakım-barınma ve rehabilitasyon hizmeti veren 26 küçük hayvan kuruluşunda saptanan deri hastalıklarının değerlendirilmesi yapılmıştır. Çalışmada 653'ü köpek ve 347'si kedi olmak üzere toplam 1000 deri hastalığı olan olgu değerlendirilmiştir. Köpeklerin 256'sı (%39.2) genç (0-2), 153'ü (%23.5) orta yaş (2-5) ve 244'ü (%37.3) yaşlı (5-13); kedilerin ise 164'ü (%47.3) genç (0-2), 92'si (%27) orta yaş (2-7) ve 91'i (%26) ise yaşlı (7-19) hayvanlardan oluşmaktaydı. Yapılan değerlendirme sonucunda hastalıkların 276'sı kaşıntılı dermatozlar [kedi: 103 (%29.7); köpek: 173 (%26.5)], 210'unda sinüs oluşumuyla karakterize olan hastalıklar [kedi: 66 (%19); köpek: 144 (%21.9)], 122'sinde uyuz [kedi: 8 (%2.3); köpek: 114 (%17.4)], 98'i dermatofitozis [kedi: 54 (%15.6); köpek: 44 (%6.7)], 87'sinde nodüler dermatozlar [kedi: 28 (%8); köpek: 59 (%9)], 64'ünde komplike vakalar [kedi: 2 (%0.6); köpek: 62 (%9.5)], 31'inde apse [kedi: 22 (%6.3); köpek: 9 (%1.4)], 24'ünde çevresel dermatozlar [kedi: 11 (%3.2); köpek: 13 (%1.9)], 16'sında otitis externa [kedi: 3 (%0.9); köpek: 13(%2)], 13'ünde ülseratif dermatozlar [kedi: 6 (%1.7); köpek: 7 (%1)], 12'sinde endokrin dermatozlar [kedi: 3 (%0.9); köpek: 9 (%1.4)], 11'inde yağlı kuyruk sendromu [kedi: 11 (%3.2)], 10'unda othematom [kedi: 2 (%0.6); köpek: 8 (%1.2)], 7'sinde kabuklanma ve pullanma ile karakterize hastalıklar [kedi: 2 (%0.6); köpek: 5 (%0.8)], 4'ünde fotosensibilizasyon [kedi: 4 (%1.2)], 3'ünde cushing sendrom [köpek: 3 (%0.5)], 3'ü atopi [kedi: 3 (%0.9)], 3'ünde interdigital dermatit [köpek: 3 (%0.5)] 3'ünde miyazis [köpek: 3 (%0.5)], 2'inde leishmaniasis [köpek: 2 (%0.3)] ve 1'inde yaz dermatitinden [köpek: 1 (%0.2)] de görülmüştür. Sonuç olarak, kedi ve köpeklerdeki deri hastalıkları ile ırk, cins, yaş, beslenme, barınma ve bakım gibi faktörler arasında yakın bir ilişkinin olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Deri hastalıkları, kedi, köpek

Investigation of Skin Disease Rates in Dogs and Cats brought to Veterinary Clinics in Istanbul Province

Summary: In this study, it was evaluated the skin diseases detected from a total of 26 small animal institutions providing surgery, polyclinic, care, housing and rehabilitation services in İstanbul province in 2013. A total of 1000 skin diseases cases composed of 653 dogs (21.7%) and 347 cats (15.7%) were used in the study. Of dogs, 256 (39.2%) included younger (0-2), 153 (23.5%) middle-aged (2-5), and 244 (37.3%) old (5-13), and of cats, 164 (47.3%) included younger (0-2), 92 (27%) middle-aged (2-7), 91 (26%) old (7-19) animals. As a result of the evaluation, it was determined itch dermatoses [cat:103 (29.7%); dog:173 (26.5%)] in 276, diseases characterized with sinus formation [cat: 66 (19%); dog: 144 (21.9%)] in 210, scabies [cat: 8 (2.3%); dog: 114 (17.4%)] in 122, dermatopytoses [cat: 54 (15.6%); dog: 44 (6.7%)] in 98, nodular dermatoses [cat:28 (8%); dog: 59 (9%)] in 87, complicated dermatoses [cat: 2 (0.6%); dog: 62 (9.5%)] in 64, abscess [cat: 22 (6.3%); dog: 9 (1.4%)] in 31, environmental dermatoses [cat: 11 (3.2%); dog: 13 (1.9%)] in 24, otitis externa [cat: 3 (0.9%); dog: 13 (2%)] in 16, ulcerative dermatoses [cat: 6 (1.7%); dog: 7 (1%)] in 13, endocrine dermatoses [cat: 3 (0.9%); dog: 9 (1.4%)] in 12, fat tail syndrome [cat: 11 (3.2%)] in 11, autohematom in 10 (cat: 2 (0.6%); dog: 8 (1.2%)) in 10, crusting and scaling diseases [cat: 2 (0.6%); dog: 5 (0.8%)] in 7, fotosensibilizasyon [cat: 4 (1.2%)] in 4, cushing syndrome [dog: 3 (0.5%)] in 3, atopy (cat: 3 (0.9%)) in 3, interdigital dermatitis [dog: 3 (0.5%)] in 3, myiasis [dog: 3 (0.5%)] in 3, leishmaniasis (dog: 2 (0.3%)) in 2 and summer dermatitis [dog: 1 (0.2%)] in 1, cases. In conclusion that there was a close relationship between the skin diseases of dogs and cats and the factors such as breed, sex, age, nutrition, housing and handling the animals.

Key words: Cat, dog, skin diseases

Giriş

Kedi ve köpeklerde beslenme sağlıklı deri ve tüy oluşumunun korunmasında önemli bir rol oynar. Bir hayvanın kürkü onun ilk savunma hattıdır (2). Köpek ve kedilerin her ikisinde subkutis tabakası bağ doku, elastik lifler, kan da-

marları, sinirler ve yağ hücrelerini içermektedir. Bu yapı hayvana sağladığı izolasyonla travmalara karşı daha fazla koruma sağlar (2,5).

Gıda alerjileri genellikle gıdalardaki proteinlere karşı gelişen immun bağlantılı bir yanittir. Pruritis gıda alerjili köpeklerde en sık rastlanılan klinik belirti olarak karşımıza çıkmaktadır. Köpeklerde gıda alerjilerini değerlendirmek için yapı-

lan bazı çalışmalarda; reaksiyonun ortaya çıkışı ile ilgili olarak yaş, cinsiyet ya da ırka özel bir predispozisyon bildirilmemiştir (2,22).

Deri lezyonları genel olarak primer veya sekonder olarak ortaya çıkarlar. Primer olaylarda lezyonların görüntüsü diagnostik öneme sahipken, sekonder olaylarda bu lezyonların diagnostik önemi azdır (7,14,22).

Deri kaşıntısı (pruritus cutaneus), deride bir değişiklik olmaksızın derinin duyarlı hale gelmesi ve istekli bir şekilde tırmalanmasıdır. Deride birçok hastalıkların (ör: ektoparazitler, ekzema) semptomu olarak da kaşıntı meydana gelmektedir (11).

Genel kaşıntılar; tüm vücudun kaşınması şeklinde ortaya çıkar ve karaciğer, kronik böbrek bozuklukları, diabetes mellitus, mide bağırsak nezleleri, konstipasyonlar ve alerjen maddelere maruz kalma (köpeklerde halı, pelüş, şampuan, sabun, mobilya, parke cilaları ve bitki polenleri) sonucu meydana gelir. Ayrıca, hormon dengesizliği (gebelik, kızgınlık) ve toksik gıdaların yenilmesi durumlarında da meydana gelebilir. Lokal kaşıntılar; kuduz, aujeszky, myelitis, askaridozis, teniazis, oxyuridose (anüs civarında), linguatula ve *O.ovis* invazyonları (burun ucunda) gibi olaylarda görülmektedir. Ayrıca, otitis ve konjunktivitislerde baş bölgesinde; hümorale bozukluklarda ve köpeklerde regl dönemi sırasında vulva bölgesinde lokal kaşıntılar oluşmaktadır (6).

Deride iyi (papillom) ve kötü huylu (epiteliom, melanom gibi) çok sayıda tümöre rastlanmaktadır. Ayrıca Epidermoid, dermal, kıl ve yağ kistleri sıklıkla oluşmaktadır (3). Evcil hayvanlarda otoimmün hastalıklar, 1970'lerin ortalarında doğru insanlardaki otoimmün dermatozlara benzetilerek klasifiye edilmiştir (17). Bullöz pemfigoid,

müköz membran pemfigoid, pemfigus eritematosus, lupus eritematosus gibi çeşitleri vardır (4, 8).

Papüller ve püstüler lezyonlar köpek ve kedilerde yaygın olarak gözlenmektedir. Lezyonlar foliküler şeklinde görülürler (4). Deri bütünlüğünü bozan travmalar, ısırık yaraları, keskin ve sivri cisimlerle yaralanmalar sıklıkla görülmektedir (9,13). Ayrıca mantar hastalıklarına ve uyuz gibi paraziter deri hastalıklarına köpek ve kedilerde sıklıkla karşılaşılmaktadır (10,15,16,18,20,23).

Bu çalışmanın amacı, İstanbul yöresinde kedi ve köpeklerde deri hastalıklarının görülme oranlarını belirlemektir.

Gereç ve Yöntem

Çalışma materyalini İstanbul ili kliniklerinde muayene edilen 5200 (3000 köpek, 2200 kedi) olgudan, deri hastalığı teşhisi konulan 1000 olgu (347 kedi, 653 köpek) oluşturmaktadır. Olguların anamnezinin alınmasından sonra klinik muayeneleri yapılmıştır. Çalışma süresince deriden toplanan kazıntıların değerlendirilmesinde; bisturi, lam, lamel, mikroskop, wood lambası, alerji testleri, immuno floresans testi, smear, mantar (saboraud dektroz agar) ya da bakteri (blood agar base) kültürü, kan sayımı, biyokimyasal testler (karaciğer enzim konsantrasyonları), biyopsi ve PCR'dan (*Leishmania*) yararlanılmıştır. Kliniklere getirilen 347 kедiden; 265 (%76.36)'si melez, 17 (%4.89)'si İran, 13 (%3.74)'ü Van, 10 (%2.88)'u Siyam, 10 (%2.88)'u Ankara, 7 (%2)'si Scottish Fold, 7 (%2.01)'si British Shorthair, 7 (%2.01)'si Chinchila, 6 (%1.72)'si Persiyan, 3 (%0.86)'ü Himalaya, 1 (0.28)'i Exotic Shorthair ve 1 (%0.28)'i ise Bonbay ırkından oluşmaktadır. Kliniklere getirilen 347 adet köpek ırkının dağılımı Tablo 1 de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışma kullanılan kedilerin ırklara göre dağılımları

Kedi Irkları	Sayı	Oran %
Melez	265	76.36
İran	17	4.89
Van	13	3.74
Siyam	10	2.88
Ankara	10	2.88
ScottishFold	7	2.01
British Shorthair	7	2.01
Chinchila	7	2.01
Persiyan	6	1.72
Himalaya	3	0.86
Exotic Shorthair	1	0.28
Bonbay	1	0.28

Deri hastalığı şikâyetleri ile kliniklere getirilen 643 adet köpek ırkının dağılımı Tablo 2'de verilmiştir. Deri hastalığı şikâyetleri ile kliniklere getirilen kedi ve köpeklerin yaş dağılımı Tablo 3' de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışma kullanılan köpeklerin ırklara göre dağılımları

Köpek İrkları	Sayı	Oran %
Melez	221	33.84
Golden	109	16.69
Labrador	50	7.65
Cocker	47	7.19
Alman Kurdu	36	5.51
Terrier	33	5.05
Kangal	15	2.29
Pitbull	13	1.99
Setter	13	1.99
Shar-Pei	12	1.83
King Charles	9	1.37
Husky	9	1.37
Yorkshire	8	1.22
Pug	8	1.22
İngiliz Bulldog	6	0.91
Bull Terrier	6	0.91
Danua	5	0.76
Chowchow	5	0.76
Pointer	5	0.76
Rus Finosu	5	0.76
Jack Russel	4	0.61
Dogo Argentina	4	0.61
Beagle	3	0.45
Border Collie	3	0.45
Chivava	3	0.45
Sitzu	3	0.45
Kafkas Çoban Köpeği	2	0.3
Mastiff	2	0.3
Doberman	1	0.15
Afkan Tazısı	1	0.15
American Bulldog	1	0.15
Belçika Kurdu	1	0.15
Fransız Bulldog	1	0.15
Pincher	1	0.15
Saint Bernard	1	0.15
Spitz	1	0.15
Tibet	1	0.15
Weimaraner	1	0.15
West Heighland	1	0.15
Bernese	1	0.15
Flat Coat Retriever	1	0.15

Tablo 3. Kedi ve köpeklerde yaş dağılımı

Tür	Genç (0-2)	Orta Yaş (2-7)	Yaşlı (7-19)
Kedi	164	92	91
	Genç (0-2)	Orta Yaş (2-5)	Yaşlı (5-13)
Köpek	256	153	244

Tablo 4. Köpek ve kedilerde rastlanan deri hastalıklarının sayısı ve % oranları

Hastalık	Köpek		Kedi	
	Sayı	%	Sayı	%
Kaşıntılı dermatozlar	173	26.5	103	29.7
Sinüs oluşumuyla karakterize olan hastalıklar	144	21.9	66	19
Uyuz	114	17.4	8	2.3
Dermatofitozis	44	6.7	54	15.6
Nodüler dermatozlar	59	9	28	8
Komplike vakalar	62	9.5	2	0.6
Apse	9	1.4	22	6.3
Çevresel dermatozlar	13	1.9	11	3.2
Otitis externa	13	2	3	0.9
Ülseratif dermatozlar	7	1	6	1.7
Endokrin dermatozlar	9	1.4	3	0.9
Yağlı kuyruk sendromu	-	-	11	3.2
Othematom	8	1.2	2	0.6
Kabuklanma ve pullanma ile karakterize hastalıklar	5	0.8	2	0.6
Fotosensibilizasyon	-	-	4	1.2
Cushing sendrom	3	0.5	-	-
Atopi	-	-	3	0.9
İnterdigital dermatit	3	0.5	-	-
Miyasis	3	0.5	-	-
Leismaniasis	2	0.3	-	-
Yaz dermatiti	1	0.2	-	-

Bulgular

Muayene edilen 3000 köpeğin 653'ünde (% 21.7) deri hastalığı belirlenmiştir. Muayene edilen 2200 kedinin 347'inde yani (%15.7) deri hastalığı saptanmıştır.

Hastalıkların sınıflandırması yapıldığında en fazla kaşıntılı oranın dermatozlar'dan oluştuğu görülmektedir. Deri hastalıklarında çok çeşitli hastalıklar tespit edilmiş ve tablo 4' de sunulmuştur.

Kaşıntılı dermatozların 105'i (%38) pire ısırığı hipersensitivitesi, 73'ü (%26.4) alerjik ve iritan kontak dermatit, 61'i (%22.1) gıdaya bağlı aşırı duyarlılık, 14'ü (%5.1) atopik dermatit, 14'ü (% 5.1) intertrigo, 7'si (%2.5) psikojenik dermatozlar ve 2'si (%0.7) de malassezia pachydermatis dermatitinden oluşmaktadır.

Sinüs oluşumuyla karakterize olan hastalıkların 79'u (%37.6) derin piyoderma, 55'i (%26.2) ısı- rık yaraları, 44'ü (%21) yabancı cisim sinüsü,

26'sı (%12.4) piyotraumatik dermatitis, 5'i (% 2.4) anal furonküloz ve 1'i (%0.5) de kedide cüzzam hastalıklarından oluşmaktadır. 122 uyuz vakasının 49'u (%40.2) sarcoptescanis, 48'i (39.3) otodectes cynotis, 17'si (%14) demodex ve 8'i (%6.6) notoedrescati'den oluşmaktadır. Gözlenen 87 nodüler dermatozlardan 31'i (%36) meme tümörü, 28'i (%32.2) diğer tümör, 7'si (%8.1) papillom, 6'sı (%6.9) mast hücre tümörü, 5'i (%5.7) fibrosarkom, 4'ü (%4.6) vaginal tümör (TVT), 2'si (%2.3) lipom, 2'si (%2.3) bazal hücre karsinomu ve 2'si (%2.3) de histiyositom tümöründen oluşmaktadır. Çevresel dermatozların 15'ü (%65.2) yanıklar, 5'i (%21.7) myiasis, 3'ü (%13) arı sokması ve örümcek sokmaları ve 1'i (%4.3) sinek ısırığı dermatozlarından oluşmaktadır. Ülseratif dermatozların 13 vakanın 7'si (%53.8) otoimmün dermatoz, 4'ü (%30.7) feline eozinofilik granülom kompleksi ve 2'si (% 15.4) de dekübitis ülserlerinden oluşmaktadır.

Kedilerde yaş dağılımına göre en çok görülen üç hastalıktan biri olan pire alerjik dermatiti; gençlerin 43'de (%12.3), orta yaşlıların 37'sinde (%10.7) ve yaşlıların 6'sında (%1.7); ikinci hastalık olan dermatofitozis; gençlerin 35'inde (%10), orta yaşlıların 10'unda (%2.9) ve yaşlıların 13'ünde (%3.7); üçüncü hastalık olan derin pyoderma ise; gençlerin 19'unda (%5.5), orta yaşlıların 7'sinde (%2) ve yaşlıların 22'sinde (%6.3) görülmüştür.

Köpeklerde yaş dağılımına göre en çok görülen hastalıklar gençlerde sırasıyla; *Sarcoptes canis* 33 (%5.1), gıdaya bağlı aşırı duyarlılık 27 (%4.1), alerjik dermatit 26 (%4). Orta yaşlılarda sırasıyla; gıdaya bağlı aşırı duyarlılık 17 (%2.6), yabancı cisim sinüsü 17 (%2.6), ısırık yaraları 15 (%2.3). Yaşlılarda ise sırasıyla; komplike vakalar 60 (%9.2), nodüler dermatozlar 46 (%7), alerjik dermatit 45 (%6.9)'tir.

Tartışma ve Sonuç

Deri hastalıkları, orjinlerine göre primer ve sekonder özelliktedirler. Primer deri hastalıkları genellikle dış etkilere, sekonder olaylar ise iç organ hastalıklarından (karaciğer, böbrek gibi) ileri gelmektedir (5, 6, 11, 14). Bazı hastalıklar kalıtsal olduğu için yetiştirme (üretim) dikkatle takip edilmelidir. Ayrıca hastalığın ilk olarak hangi yaşta görüldüğünün belirlenmesi önemlidir. Genellikle bazı hastalıklar (gıda ve pire alerjileri, demodikozis, dermatofitozis) gençlerde, bazıları ise (endokrinopatiler, neoplaziler ve otoimmün hastalıklar) orta yaşlı ve yaşlı hayvanlarda yaygındır (3,10).

Dermatolojik bozukluğu olan hasta bir hayvanda anemnezin ayrıntılı olarak alınması ve tam bir fiziksel muayenesinin yapılması önemlidir. Hastalığın seyrinin nasıl değiştiği, lezyonların mevcudiyeti ve iyileşmesiyle kaşıntı arasında bir korelasyonun olup olmadığı saptanmalıdır. Çalışmada tüm olguların anemnez ve fiziki muayeneleri detaylı olarak yapılarak kaydedilmiştir.

Deri hastalıkları çoğunlukla kaşıntı oluşturmaktadır. Pire ısırığına bağlı aşırı duyarlılık reaksiyonu, genellikle gövdenin arka kısmından ve arka bacaklardan başlayarak tüm vücuda yayılır. Alerjiyle ilişkili kaşıntının ise genelde aynı anda tüm vücuda yayıldığı görülür. Otoimmün hastalıklar genellikle yüz bölgesinde ortaya çıkar, değişik derecelerde gövde ve ekstremitelerde de görülebilir (19). Bu çalışmada benzer bulgular elde edilmiştir.

Kanada'da yapılan bir çalışmada köpeklerde %18.8, kedilerde ise %15.2 oranında deri hastalığı

görülmüştür (19). İngiltere de yapılan bir çalışmada muayene edilen 3770 hayvanın 795'inde (%21.4) deri hastalığı saptanmıştır. Van ili çevresinde 2000-2003 yılları arasında toplam 3020 olgu üzerine yapılan bir çalışmada; deri hastalıkları %0.69 olarak saptanmıştır (12). Bu çalışmada muayene edilen 3000 köpeğin 653'ünde yani %21.7'sinde deri hastalığı belirlenmiştir. Muayene edilen 2200 kedinin 347'inde yani %15.7'de deri hastalığı saptanmıştır. Köpek ve kedilerde elde edilen sonuçlar Avrupa ülkeleri oranlarına yakındır. Van ilinde saptanan düşük sonucun, o bölgede kedi ve köpek sayısının ve tedaviye getirilen olgu sayısının az olması nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

Yaklaşık olarak 783 vaka üzerinde yapılan bir çalışmada en sık rastlanan 10 hastalık sırasıyla; pire enfestasyonu (24.1/ %33.3), pire aşırı duyarlılık (22.3, %42.9), dermatofitozis (9.9, %26.2), otodectes (11.5, %19), gıda alerjisi (2.8, %25.2), çeşitli duyarlılık (2.8, %10), atopi (2.4, %22.4), otitis (2.4, %5.6), piyoderma (1.4, %4.7) ve alopesi (1.3, %4.7) olduğu görülmüştür (1).

Köpek ve kedilerde alerjik deri hastalıkları içerisinde pire alerjik deri hastalıkları yüzdesinin %10-20'lik bir paya sahip olduğu görülmüştür (1). Çalışmada bütün hastalıklar içerisindeki pire ısırığı hipersensitivitesi %10.5'lik bir payla oldukça yüksek bir yüzdeye sahiptir. Bunun da en önemli sebebi hasta sahiplerinin pireye karşı yeterli korucuyu önlem almamasıdır veya ilaçlar uygun zaman ve miktarda uygulanmamaktadır. Dermatomikozis, zoofilik, artropofilik ve geofilik olarak bulaşan çeşitli dermatofitlerin derinin epidermal tabakasında meydana getirdiği bir enfeksiyondür. Klinik olarak normal görünümü 559 köpeğin %75'inde, 225 kedinin ise %15'inde *Microsporum* ve *Trichophyton* genusuna ait mantar türleri saptadığını bildirirken, klinik belirti göstermeyen köpeklerin %18.4'ünde, kedilerin ise %30.4'ünde *M. canis* izole edildiği bildirilmiştir (20).

Bir başka çalışmada dermatofitoz şüpheli lezyonlu köpeklerde dermatofitlerin prevalansının %4-10 olduğu bildirilmiştir. Köpeklerden en sık izole edilen dermatofit *M. canis*'tir. *M. canis*'in köpeklerde dermatofit enfeksiyonlarının %70'ine neden olduğu ve köpeklerin %5'inin asemptomatik taşıyıcı olduğu bildirilmiştir. Köpeklerden daha az izole edilen diğer dermatofit *T. mentagrophytes* ve *M. gypseum*'dur. Bu üç tür köpeklerden izole edilen dermatofitlerin yaklaşık %96'ısını oluşturmaktadır. Kuzey Amerikan Vete-

riner Kliniklerinde dermatofitlerin görülme oranları %0.26 ile %5.6 arasında olduğu bildirilmiştir (9,15,16,18,23).

Bu çalışmada deri hastalığı belirlenen 653 köpekten 40'ında (%6.1) ve 347 kediden 58'inde (%16.7) dermatofit vakasına rastlanmıştır. Bu da diğer araştırmalarda Ural ve ark. (21) tarafından elde edilen dermatofit vakalarının yüzdeleleri ile örtüşmektedir.

Primer ve sekonder dermatolojik bozukluğa sahip 86 köpeğin muayene sonuçları incelendiğinde 18'inde sarcoptes uyuz (%20.9), 14'ünde dermatofitoz (%16.2), 12'sinde leishmaniasis (%14), 20'sinde dermodikozis (%23.3), 4'ünde kancalı kurt dermatitisi (%4.7), 2'sinde pelodera dermatitisi (%2.3) ve 2'sinde kutanöz neosporozis tanısı konulmuştur (21).

İstanbul ilindeki veteriner kliniklerine getirilen 1000 vaka içinde 49 (%4.9) *Sarcoptes canis*, 98 dermatofitoz (%9.8) ve 2 leishmaniasis (%0.2) vakasına rastlanmıştır. Diğer taraftan müdahale edilen 114 ısırık vakası üzerinde yapılan bir epidemiyolojik incelemede, ısırık vakalarının erkek köpeklerde dişilerden daha sıklıkla rastlandığı görülmüştür. Isırılan köpeklerin %61'ini küçük cüsseli, %14'ünü orta cüsseli ve %24'ünü iri cüsseli hayvanlar oluşturmuştur. Isırılan köpeklerde ortalama yaş 2, kedilerde ise 1.5 civarında olduğu ve ısırık yaralanmalarının en çok Mayıs (%16), Nisan (%11) ve Ekim (%10) aylarında olduğu tespit edilmiştir. Kedilerdeki ısırık yaralama oranının köpeklerden daha az olduğu rapor edilmiştir (13). Bu çalışmada 6'sı kedi olmak üzere toplam 55 olguda (%5.5) ısırık olayı ile karşılaşmıştır. Kedilerin toplam yaşları 0-2 arasında değişen genç bireylerden olduğu görülmüştür. Köpeklerin 22'si genç (0-2), 14'ü orta yaş (2-5) ve 13'ü de yaşlı (5-13) hayvandan oluşmaktaydı.

Bu çalışmayla İstanbul ilinde dermatolojik hastalıklarla ilgili önemli veriler ilk kez elde edilmiştir. Bu konuda yapılacak çalışmalara kaynak oluşturacaktır. Sonuç olarak İstanbul bölgesinde yapılan çalışmada kedi ve köpeklerde deri hastalıklarının oluşmasında ırk, yaş, bakım, besleme gibi faktörlerin etkili olduğu tespit edilmiştir. Hayvan sahiplerinin belirtilen parametreler ve paraziter hastalıklar hakkında bilinçlendirilmesi ve aldıkları hayvan ırkı ile ilgili ne zaman ve hangi tür deri problemleriyle karşılaşabilecekleri detaylı olarak anlatılmalıdır.

Kaynaklar

1. Bourdeau P, Taylor KW, Nguen P. Skin diseases. Vet Dermatol 2004; 15(1): 41-69.
2. Cebecioğlu VH, Aslıhan D. Deri sağlığı ve tüy kalitesinde beslenmenin önemi. Petinfo 2012; 46: 18-25.
3. Erer H, Kıran MM. Konya'da 1985-1992 yılları arasında köpeklerde görülen tümörler. S Ü Vet Fak Derg 1993; 9(2): 87-9.
4. Frank LA. Atopic dermatitis. Clin Dermatol 1994; 12(4): 565-71.
5. Guaguère E and Beugnet F. Parasitic skin conditions. Guaguère E, Prélaud P and Craig M. eds. In: A Practical Guide to Canine Dermatology. Paris: Kalianxis, 2008; pp.179-226.
6. Gül Y. Deri hastalıkları. İmren HY. ed. In: Kedi ve Köpek Hastalıkları. Ankara: Medisan Yayınevi, 1998; ss. 254-68.
7. Harvey RG, McKeever PJ. Kedi ve köpeklerde deri hastalıkları. Deprem O, Yeşildere T. eds. In: Papüler ve Püstüler Dermatozlar. Ankara: Nobel, 2006; ss.111.
8. Harvey RG, McKeever PJ. Kedi ve köpeklerde deri hastalıkları. Deprem O, Yeşildere T. eds. In: Sinüs Oluşumuyla Karakterize Olan Hastalıklar. Ankara: Nobel, 2006; s.120.
9. Harvey RG, McKeever PJ. Kedi ve köpeklerde deri hastalıkları. Deprem O, Yeşildere T. eds. In: Yama Tarzında Alopesiyle Karakterize Olan Dermatozlar. Ankara: Nobel, 2006; s.210.
10. Hill PB. Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in small animals in general practice. Vet Rec 2006; 158(16): 533-39.
11. İmren HY, Şahal M. Veteriner İç Hastalıkları. Ankara: Medisan Yayınevi, 1994; s.186.
12. Kaya A, Şimşek A. Van ili ve çevresinde 2000-2003 yılları arasında görülen hastalıkların insidansı ve mevsimlere göre dağılımı üzerine araştırmalar. YYÜ Vet Fak Derg 2007; 18(2): 59-64.
13. Kılıç N, Sarierler M. Dog bite wounds: A retrospective study (114 cases). YYÜ Vet Fak Derg 2003;14(2): 86-8.
14. Nuttal T, Harvey RG, McKeever PJ. A Colour Handbook of Skin Disease of the Dog and Cat. Second Edition. London: Manson Publishing Ltd, 2009; pp.10-5.
15. Or E, Kaymaz AA, Dodurka T, Tan H. Zoonotic microsporidium canis infeksiyonu. Tr J

- Vet and Anim Sci 1999; 23(3): 293-96.
16. Outerbridge CA. Mycologic disorders of the skin. Clin Tech Small Anim Pract 2006; 21 (3): 128-34.
 17. Özkaptan I, Aydemir E, Turgut D, Alihosseini H, Haydardedeoglu AE, Çolakoglu E, Cansız F. Köpeklerde kaşıntı sendromu klinik yaklaşım ve ayırıcı tanı. Yedinci Küçük Hayvan Veteriner Hekimleri Derneği Kongresi (KHVHD 7). Kasım, 9-10, 2012; İstanbul, Türkiye.
 18. Scott DW, Millier WH, Griffen CE. The prevalence of dermatophytosis in dogs and cats. William H, Miller J, Griffin CE, Karen L. eds. In: Muller and Kirk's small animal dermatology. Philadelphia PA: W.B. Saunders Company. 2001; pp. 432-38.
 19. Scott DW, Paradis M. A survey of canine and feline skin disorders seen in a university practice: Small animal clinic, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec (1987-1988). Can Vet J 1990; 31(12): 830-35.
 20. Tel OY, Akan M. Kedi ve köpeklerden dermatofitlerin izolasyonu. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2008; 55 (3):167-71.
 21. Ural K, Voyvoda H. Understanding primary and secondary skin lesions among infectious dermatoses in dogs: Lessons we learned from cases. Animal Health Prod and Hyg 2012; 1: 86-9.
 22. Watson TDG. Diet and skin disease in dogs and cats. J Nutr 1998; 128(12): 2783-89.
 23. Yıldırım M. Çiftlik hayvanlarının dermatomikozları. İnfek Derg 2007; 21(ek): 81-3.

Sorumlu Yazar:

Prof. Dr. İbrahim CANPOLAT
Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi
Cerrahi Anabilim Dalı
Elazığ-TÜRKİYE
Tel: 2370000-3862
E-mail: icanpolat@firat.edu.tr



Kızıl Tilkide (*Vulpes vulpes*) Özofagusun Anatomik ve Histolojik Özellikleri

Sema ÖZKADİF, Ayşe HALIGÜR

Çukurova Üniversitesi, Ceyhan Veteriner Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Adana-TÜRKİYE

Özet: Bu çalışmada, kızıl tilki (*Vulpes vulpes*)'de özofagus bölümlerinin anatomik ve histolojik yapılarının tanımlanması amaçlandı. Çalışmanın materyalini, farklı zamanlardaki trafik kazalarında elde edilen dört erkek ve iki dişi olmak üzere toplam altı adet erişkin kızıl tilkiler oluşturdu. Kızıl tilkilerin makro diseksiyonları yapıldı ve özofagusun servikal, torasik ve abdominal bölümlerinden ölçümler alındı. Özofagusun farklı bölümlerinden histolojik inceleme yapmak için %10'luk tamponlu formalin solüsyonuna numuneler alındı. Her bir örnek trimlenerek rutin doku takip prosedürü uygulandı. Özofagusun ilk önce trakeyanın dorsalinde, sonra trakeyanın sol tarafında ve en son tekrar trakeyanın dorsalinde seyrettiği görüldü. Özofagusta servikal bölüm en uzun, abdominal bölüm ise en kısaydı. Histolojik incelemede mukoza epitelinin non-keratinize çok katlı yassı epitelden oluştuğu ve lamina propriada ise bezler (Gl. oesophagea) bulunduğu saptandı. Özofagustan alınan tüm bölgelerde tunika muskularis çizgili kaslardan oluşurken, pars abdominalisinde midenin kardiya girişi düzeyinde düz kaslardan oluştuğu görüldü. Tunika serozanın bu tabakaların dışında bulunduğu, kan damarları ve sinir pleksusları bakımından zengin olduğu tespit edildi. Bu çalışma, kızıl tilkilerin özofagusu hakkındaki ilk makroanatomik ve histolojik çalışma olup tilkilerde özofagus ile ilgili yapılacak çalışmalara katkı sağlayacağı ve ışık tutacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Özofagus, kızıl tilki, anatomi, histoloji

Anatomic and Histologic Properties of Oesophagus in the Red Fox (*Vulpes vulpes*)

Summary: The aim of this study is to describe some gross anatomical and histological structures of parts of oesophagus of the red fox (*Vulpes vulpes*). The study materials consisted of six adult red foxes, four male and two female, obtained from traffic accidents at different times. Gross dissection of red foxes was carried out and morphometric measurements were taken from the cervical, thoracic and abdominal parts of the oesophagus. For histologic examination, oesophagus tissue samples were fixed in 10 % buffered formalin solution. Each sample was trimmed and routine histological technique was conducted. It was seen that oesophagus firstly laid dorsal to the trachea, than laid left side of the trachea and at last again laid on dorsal to the trachea. The cervical length was the longest part and the abdominal length was the shortest part in the oesophagus. Histological examination revealed that mucosa epidermis was non-keratinized stratified squamous epithelium and glands (Gl. oesophagea) in lamina propria. In all regions taken from the oesophagus, the tunica muscularis consisted of the striated muscles, while the muscles of the pars abdominal region were found to have smooth muscle at the cardia entrance level. Tunica serosa was detected on the outside of these layers, rich in blood vessels and nerve plexus. This study was the first macro-anatomical and histological study of oesophagus of red foxes and suggests that it shed light and contributed our knowledge of oesophagus.

Key words: Oesophagus, red fox, anatomy, histology

Giriş

Özofagus, yiyecekleri farinksten mideye sevk etme fonksiyonuna sahiptir. Memelilerin özofagusu pars servikalıs, pars torasika ve pars abdominalıs olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır (1). Özofagusun motor ve duysal fonksiyonları önemli ölçüde duvarının biyomekanik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle duvarın yapısını oluşturan katmanları tanımak önemlidir (2).

Davranışla ilgili adaptasyonlar ve farklı türlerin farklı yiyecekler tüketmesi ile özofagusun anatomi

mi türler arasında farklılıklar gösterir (3). Anatomik farklılıklar yanında, özofagusu oluşturan kas tabakalarının çeşitliliği, kalınlığı ve submukoza bezlerin yerleşim yerleri gibi histolojik farklılıklar da vardır (4).

Kızıl tilki (*Vulpes vulpes*) Carnivora takımına ait bir türdür. Tilikilerin besinlerini yabani ve evcil kuşlar, fare, köstebek, tüm böcek ve larvaları, solucan, kertenkele ve balıklar oluşturur. Bunların yanı sıra, hayvan leşleri, yeni doğmuş yavrular (karaca, dağ keçisi, ceylan) ile meyve, tohum ve evsel atıkları da yerler. Bu hayvanların besinlerini çiğnemediği yuttukları bildirilmiştir (5,6).

Özofagusun anatomik ve histolojik yapısıyla ilgili siyah Bengal keçisi (7), tek hörgüçlü deve

(*Camelus dromedaries*) (4), yılan (*Pituophis catenifer*) (8), Nil varanı (*Varanus niloticus*) (9), posta güvercini (*Columba livia domestica*) (10), kaz (*Anser anser domesticus*) (11), koşucu deve kuşu (*Dromaiusno vaehollandiae*) (12), sincap (*Funisciurus anerythrus*) (13) ve tavuk (14) gibi hayvanlarda çok sayıda araştırma yapılmıştır. Tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada ise özofagusun fizyolojisi hakkında bilgiler kayıt edilmiştir (2). Köpekte özofagektomi ile ilgili bir çalışma yapılmıştır (15). Ayrıca, tilkilerde yapılan bir çalışmada, özofagusta nematod'a rastlanıldığı bildirilmiştir (16). Bütün bunlara rağmen, yapılan literatür taramasında çeşitli hayvanların özofagusu ile ilgili oldukça sınırlı sayıda çalışma bulunurken, tilki özofagusunun anatomisi ve histolojisiyle ilgili çalışmalara rastlanılmamıştır. Bu nedenle de araştırmada tilki özofagusunun bölümlerinin anatomik ve histolojik yapılarının ortaya konulması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Materyaller Orman ve Su İşleri Bakanlığı 26.08.2016 tarih ve 27006244-445.01.01-173572 sayılı yazısı ve Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 20.06.2017 tarih ve 2017/6-1 nolu kararı ile izin alınarak kullanılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan materyaller farklı zamanlarda trafik kazası sonucu ölen 4 erkek, 2 dişi olmak üzere toplam 6 adet kızıl tilki (*Vulpes vulpes*) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Tilkiler dişe edildikten sonra dijital kumpas ile özofagusun pars servikalıs, pars torasika ve pars abdominalıs kısımlarının uzunlukları, Sukon ve ark. (3) tarafından yapılan araştırma referans alınarak ölçülmüştür. Ölçümlerde özofagus başlangıcı ile apertura thoracıs cranialis arasındaki mesafe pars servikalıs uzunluğu, apertura thoracıs

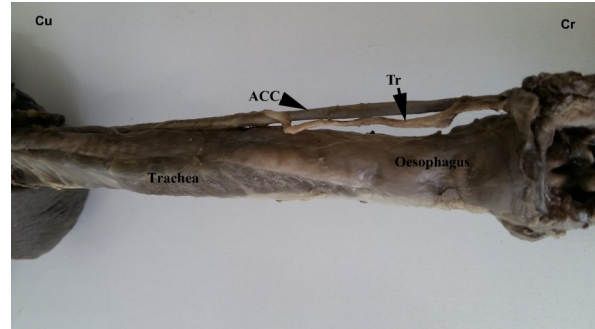
cranialis'den diyaframa kadar olan mesafe pars torasika uzunluğu, diyafram ile midenin kardiya bölümü arasındaki mesafe ise pars abdominalıs'ın uzunluğu kabul edilmiştir

Histolojik inceleme için; pars servikalısın kraniali, pars torasikanın toraksa giriş yeri, kalp hizası ve hiatus esophageus düzeyinden, pars abdominalısdan ise midenin kardiya girişinden kesitler alındı. Dokular %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edildikten sonra trimlendi. Rutin doku takip metodu uygulandı. Daha sonra dokular parafinde bloklandı ve bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak hematoksil-eozin ile boyandı. Preparatlar mikroskopta (Carl Zeiss, Almanya) incelenerek fotoğraflandı.

Bulgular

Anatomik bulgular

Özofagus, farinks ve mide arasında boru şeklinde uzanan bu organın, aditus esophageus olarak larinksin üstünde başladığı, trakeya boyunca dorsal (1/3) seyrettiği belirlendi. Orta 1/3'lük kısımda trakeyanın soluna geçtiği ve alt 1/3'lük kısımda tekrar dorsalinde apertura thoracıs cra-



Şekil 1. Özofagusun dorsalden görünüşü. ACC: Sol arteria carotis communis, Tr: truncus vagosymphaticus, Cr: Cranial, Cu: Caudal

Tablo 1. İncelenen kızıl tilkilerin özofaguslarına ait ölçüm değerleri

Kızıl tilki (<i>Vulpes vulpes</i>)	Pars servikalısın uzunluğu (mm)	Pars torasikanın uzunluğu (mm)	Pars abdominalısın uzunluğu (mm)
1	115.31	63.99	8.99
2	117.18	65.82	9.87
3	116.48	64.09	9.65
4	114.56	63.47	8.73
5	115.75	64.09	8.81
6	116.69	64.15	9.68

Tablo 2. İncelenen kızıl tilkilerin özofaguslarına ait genel ölçüm değerleri (ortalama std. hata)

Kızıl tilki (<i>Vulpes vulpes</i>)	Pars servikalısın uzunluğu (mm)	Pars torasikanın uzunluğu (mm)	Pars abdominalısın uzunluğu (mm)
Genel	115.99± 0.97	64.26±0.80	9.28±0.50

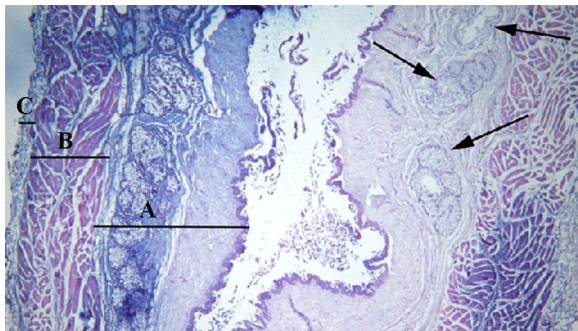
nialis'den toraksa girdiği gözlemlendi. Bu seyri esnasında truncus vagosymphaticus ve arteria carotis communis sinister ile komşu olduğu görüldü (Şekil 1).

Özofagus, toraksda akciğer lobları arasında basis cordis ile bifurcatio trachea üzerinde seyrettiği ve daha sonra diyaframın hiatus esophageus'undan geçtiği görüldü. Karaciğerin üzerinde kısa bir seyirden sonra midenin kardiya bölgesinde sonlandığı belirlendi.

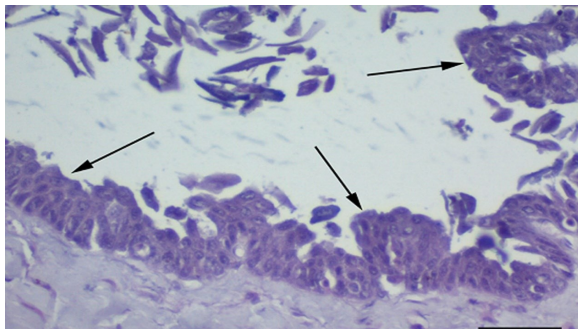
Özofagusun servikal, torasik ve abdominal bölümlerinin uzunlukları Tablo 1 ile tüm bu bölümlerin ortalama ve standart hataları Tablo 2'de verildi. Özofagusun seyri sırasında düz bir boru şeklinde olmadığı görüldü. Organın servikal bölümde geniş olduğu torasik bölüme doğru daraldığı ve daha sonra abdominal bölümde tekrar genişleyerek sonlandığı saptandı.

Histolojik bulgular

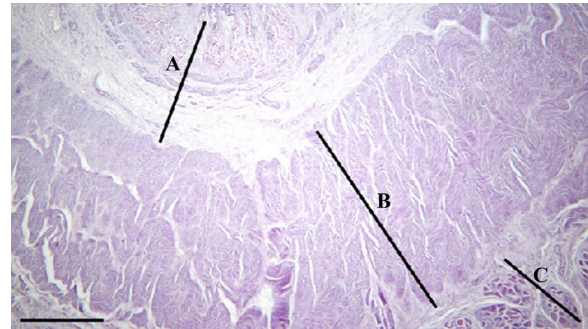
Histolojik incelemede pars servikalisin kraniali, pars torasikanın toraksa giriş yeri, pars torasikada kalp düzeyi, pars torasikada diyaframa girdiği düzey, pars abdominalisin kardiya girişine ait doku kesitleri incelendi. Tüm bu bölgelerden alınan kesitlerde histolojik olarak tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika seroza tabakala-



Şekil 2. Özofagus; A: tunika mukoza, B: tunika muskularis, C: tunika seroza, özofagus'un toraks bölgesindeki bezler (oklar) HxE, Bar=400µm



Şekil 3. Özofagus; toraksa giriş yerindeki non-keratinize çok katlı yassı epitel hücreleri (oklar) HxE, Bar=100µm



Şekil 4. Özofagus; A: tunika mukoza, B, C: tunika muskularis, HxE, Bar=400µm

rının mevcut olduğu saptandı (Şekil 2). Tunika mukozanın lamina epitelyalisi tüm bölgelerde non-keratinize çok katlı yassı epitelden oluşmaktaydı (Şekil 3). Ancak özofagusun uzantısı olan midenin kardiya bölgesindeki kısmı tek katlı prizmatik epitel hücreleri ile döşeliydi (Şekil 4). Tüm bölgelerde lamina propriyada ve submukozada yoğun gevşek bağ doku ile çok sayıda bez (Gll. oesophagea) görüldü. Ancak midenin kardiya girişinde lamina propriya ve submukozada bez yoğunluğunun oldukça az olduğu saptandı. Özofagustan alınan tüm bölgelerde tunika muskularisin çizgili kaslardan oluştuğu saptandı. Ancak midenin girişinde, kardiya bölgesinde düz kasların olduğu görüldü. Tunika muskularisin submukozaya bakan kısmında sirküler, tunika serozaya bakan kısmında longitudinal seyirli kas tabakası gözlemlendi. Tüm bu katmanları dıştan saran tunika serozanın kan damarı ve sinir pleksusları yönünden zengin olduğu saptandı.

Tartışma ve Sonuç

Siyah Bengal keçisi ve tek hörgüçlü deve özofagusunun sadece servikal ve torasik olmak üzere iki bölümden oluştuğu, abdominal bölümün ise bulunmadığı belirtilmiştir (4,7). Kuşlarda yapılan bir çalışmada da özofagusun seyri sadece servikal ve torasik olmak üzere iki kısımdan oluştuğu bildirilmiştir (11). Yapılan çalışmada özofagusun tilkilerdeki anatomik özelliklerine bakıldığında pars servikalis, pars torasika ve kısa pars abdominalisin var olduğu ayrıca, seyri köpek (17) özofagusu ile benzer olduğu görüldü.

Memelilerde özofagusun önce trakeyanın dorsalinde yer aldığı; boynun alt yarımında trakeyanın soluna geçerek göğüs boşluğuna girdiği ifade edilmiştir (18). Köpekte özofagusun servikal bölümü trakeyanın dorsalinde seyrederken torasik bölümü thoracic inlet'ten hiatus esophageus'a kadar uzandığı belirtilmiştir (19). Kuşlar-

da özofagusun seyri trakeyanın sağ tarafında olduğu bildirilmektedir (11). Bu çalışmada tilki özofagusunun, trakeyanın önce dorsalinde, sonra solunda, en sonunda tekrar trakeyanın dorsalinde seyrettiği ve bu pozisyondayken apertura thoracis cranialis'e girdiği görüldü.

Memelilerde özofagusun pars torasikasının, göğüs boşluğu girişinde trakeyaya yaslanmış olarak bulunduğu ve mediastinum craniale'de trakeyanın üstünde yer aldığı, aortanın sağında basis cordis'i geçtiği bildirilmektedir (18). Bu çalışmada tilki özofagusunun literatür ile benzerlik gösterdiği saptandı.

Özofagusun pars abdominalis seyri ruminantta olmadığı (19,20) ancak diğer memelilerde özofagusun pars abdominalis seyri median hattın biraz sol tarafında bulunduğu belirtilmektedir. Ayrıca karın boşluğundaki seyri çok kısa olduğu, midenin kardiya kısmında sona erdiği ifade edilmektedir (18). Yapılan bu çalışmada tilki özofagusunun diyaframın hiatus esophageus'un dan geçerek (incelenen hayvanlarda ortalama 9.28 mm'lik) kısa bir seyirle midede sonlandığı görüldü.

Memelilerde özofagusun histolojik kesiti tunika mukoza, submukoza, tunika muskularis ve tunika adventisya katmanlarından oluşmaktadır (20). Tilkinin özofagusunun histolojik kesitindeki katmanların da literatür bilgisi ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Özofagusda, lamina epitelyalisin keratinizasyon derecesinin türler arasında farklılık gösterdiği ancak karnivorlarda bu yapının bulunmadığı bildirilmektedir (18). Tilkide yapılan bu çalışmada da elde edilen bulguların karnivor için tanımlanan bulgularla benzerlik gösterdiği ve lamina epitelyalisin non-keratinize olduğu saptandı.

Özofagusta submukozadaki müköz bezlerin hayvan türleri arasında farklı yerleşim yerlerinde bulunduğu ifade edilmiştir. Buna göre bezlerin köpekte özofagusun tüm uzunluğu boyunca, domuzda ön yarımında, diğer evcil memelilerde ise sadece başlangıcında olduğu bildirilmektedir (20). Ayrıca, insanda özofagusun üst bölümü ile mideye yakın olan bölümündeki lamina propriyada da bezlerin var olduğu belirtilmiştir (18). Bu çalışmada ise tilki özofagusunun lamina propriyasında çok sayıda beze rastlanırken, midenin kardiya girişinde bez yoğunluğunun düşük olduğu görüldü.

Nil varanının (*Varanus niloticus*) özofagusunda tunika mukozanın silyumlu prizmatik ve kadeh hücrelerinden oluştuğu ifade edilmiştir (9). Ko-

şucu devekuşu özofagusunda ise lamina epitelyalisinin yassı epitel hücreleri tarafından oluşturulduğu kaydedilmiştir (12). Tilkide yapılan bu çalışmada ise özofagusun sadece midenin kardiya girişinde prizmatik hücreleri ile döşeli olduğu tespit edilmiştir.

Memelilerde özofagusun tunika muskularisinin, içte sirküler ve dışta longitudinal kas katmanlarından oluştuğu, ruminant ve köpekte çizgili kastan, domuzda kaudal kısmının son bölümü düz kastan, at ve kedide ise organın ilk 2/3'ü çizgili, kaudal 1/3'ü ise düz kastan şekillendiği rapor edilmiştir (20). Bu çalışmada ise tilki özofagusunun tunika muskularisinin içte sirküler, dışta longitudinal seyirli olduğu ve tüm organ boyunca çizgili kastan oluştuğu saptandı. Bu bilgiler köpek için verilen literatür bilgi ile uyumluydu. Ancak karnivor için bildirilenlerden (20) farklı olarak tilkilerde midenin kardiya girişinin düz kas özelliği gösterdiği tespit edildi.

Koşucu devekuşu özofagusunun tunika muskularisinin sirküler ve longitudinal kas tabakaları arasında kan damarları ve sinir pleksuslarının bulunduğu bildirilmiştir (12). Tilki özofagusunda ise bu yapıların tunika serozada yoğun olduğu görüldü.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışma ile tilki özofagusunun makroanatomisi ve histolojisi ortaya konulmaya çalışılmıştır. İncelenen kızıl tilkilerin özofaguslarında midenin kardiya girişinde düz kas yapısının bulunması ile bez yapısının az olması, pleksus ile damarlaştırmanın tunika serozasında bulunması gibi farklılıklar gözlemlendi. Bu çalışmanın yaban hayvanlarının anatomi ve histoloji bilgi birikimine katkı sağlayarak özofagus üzerinde yapılacak cerrahi girişimlere ve patolojik çalışmalara da katkı sağlayabileceği düşünülmüştür.

Teşekkür

Bu çalışmada histolojik kesitlerin alınmasında ve değerlendirilmesinde yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Mehmet Haligür'e teşekkür ederiz.

Bu çalışmanın ön araştırma sonuçları 26-28 Ekim 2016 tarihinde Adana'da gerçekleştirilen First Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC 2016)'de sözlü olarak sunulmuş ve özeti yayınlanmıştır.

Kaynaklar

1. Parchami A, Dehkordi RAF. Histological characteristics of the esophageal wall of the common quail (*Coturnix coturnix*). WASJ 2011; 14(3): 414-9.
2. Liao D, Cassin J, Zhao J, Gregersen H. The

- geometric configuration and morphometry of the rabbit oesophagus during luminal pressure loading. *Physiol Meas* 2006; 27(8): 703-11.
3. Sukon P, Timm KI, Valentine BA. Esophageal anatomy of the Llama (*Lama glama*). *Int J Morphol* 2009; 27(3): 811-7.
 4. Abass TA. Morphohistological study of the esophagus of the one humped camel (*Camelus dromedaries*). *Al-Anbar J Vet Sci* 2009; 2 (1): 46-52.
 5. Kuru M. Omurgalı Hayvanlar. Beşinci Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık, 1999; p. 675.
 6. Demirsoy A. Yaşamın Temel Kuralları Omurgalılar/Amniyota (Sürüngenler, Kuşlar ve Memeliler) Cilt-III/ Kısım II. Beşinci Baskı. Ankara: Meteksan Yayıncılık, 2003; pp. 749-50.
 7. Islam MS, Awal MA, Quasem MA, Asaduzaman M, Das SK. Morphology of esophagus of black Bengal goat. *Bangl J Vet Med* 2008; 6 (2): 223-25.
 8. Khamas W, Reeves R. Morphological study of the oesophagus and stomach of the gopher snake *Pituophis canenifer*. *Anat Histol Embryol* 2011; 40(4): 307-13.
 9. Ahmed YA, El-Hafez AAE, Zayed AE. Histological and histochemical studies on the esophagus, stomach and small Intestines of *Varanus niloticus*. *J Vet Anat* 2009; 2 (1): 35-48.
 10. Mobini B. The effect of age, sex and region on histological structures of the esophagus in broiler chickens. *Vet Med Zoot* 2014; 66 (88): 46-9.
 11. Shehan. NA. Anatomical and histological study of esophagus in geese (*Anser anser domesticus*). *Bas. J Vet Res* 2012; 11 (1): 13-22.
 12. Madhu N, Balasundaram K, Paramasivan S, Jayachitra S, Vijayakumar K, Tamilselvan S. Gross morphology and histology of oesophagus in adult emu birds (*Dromaius novae-hollandiae*). *AJST* 2015; 6 (1): 969-71.
 13. Gbokwe COI, Obinna SJ. Oesophageal and gastric morphology of the African rope squirrel *Funisciurus anerythrus*. *JALSI* 2016; 4 (2): 1-9.
 14. Kadhim KH, Mohamed AA. Comparative anatomical and histological study of the esophagus of local adult male and female homing pigeon (*Columba livia domestica*). *AL-Qadisiya Journal Vet Med Sci* 2015; 14 (1): 80-7.
 15. Santos CEM, Rahal SC, Damasceno DC, Hossne RS. Esophagectomy and substitution of the thoracic esophagus in dogs. *Acta Bras Cir* 2009; 24 (5): 353-61.
 16. Ferrantelli V, Riili S, Vicari D, Percipalle M, Chetta M, Monteverde V, Gaglio G, Giardina G, Usai F, Poglayen G. Spirocercalupi isolated from gastric lesion in foxes (*Vulpes vulpes*) in Sicily (Italy). *Pol J Vet Sci* 2010; 13 (3): 465- 71.
 17. Pratschke KM, Fitzpatrick E, Campion D, McAllister H, Bellenger CR. Topography of the gastro-oesophageal junction in the dog revisited: Possible clinical implications. *Res Vet Sci* 2004; 76 (3):171-77.
 18. Sağsöz H. Structural properties of oesophagus in the mammalian and avian species. *J Health Sci* 2006; 15 (3): 203-207.
 19. Sisson S, Grossman JD, Getty R. The Anatomy of the Domestic Animals. Fifth Edition. Philadelphia: WB Saunders Company, 1975; pp. 881- 84.
 20. König HE, Liebich HG. Veteriner Anatomi (Evcil Memeli Hayvanlar). Altıncı Baskı. Malatya: Medipres Matbacılık, 2014; pp. 332-33.

Sorumlu Yazar:

Dr. Öğr. Üyesi Sema ÖZKADİF
 Çukurova Üniversitesi,
 Ceyhan Veteriner Fakültesi,
 Anatomi Anabilim Dalı
 Adana- TÜRKİYE
 Tel: +90 322 613 35 07
 E-posta: semaerten80@gmail.com



Köpeklerin Hepatobiliyer Hastalıklarında Rutin Hematolojik ve Biyokimyasal Testler ile Serum Safra Asitlerinin Açlık ve Tokluk Düzeylerinin Klinik Önemi *

Sevgi NEGİŞ¹, Arif ALTINTAŞ²

¹Fulya Veteriner Polikliniği, İstanbul - TÜRKİYE

²Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

Özet: Çalışmada, hepatobiliyer hastalıklı köpeklerde veteriner klinisyenlerin kullandığı rutin laboratuvar test sonuçlarının serum açlık ve tokluk safra asitleri düzeyleri ile birlikte değerlendirilmesi ve safra asitlerinin duyarlılığı ve özgüllüğünün, özellikle zaman ve ekonomi açısından avantaj sağlayıp sağlamadığının incelenmesi amaçlanmıştır. Hepatobiliyer hastalık belirtileriyle getirilen değişik ırktan 10 (hasta) ve klinik olarak sağlıklı 10 (kontrol) olmak üzere toplam 20 köpek çalışmada kullanılmıştır. Hepatobiliyer hastalıklar klinik inceleme, rutin hematolojik ve biyokimyasal analizler, ultrason, histopatolojik inceleme ve biyopsi vb. tanısal testlerle belirlenmiştir. Biyokimyasal kan parametreleri, her biri için hazırlanmış, ticari test kitleri kullanılarak otoanalizörde, hematolojik kan parametreleri ise kan sayım cihazında ölçülmüştür. Hayvanlardan 12 saatlik açlık ve 2 saatlik tokluk kan serumlarında safra asit düzeyleri enzimatik yöntemle tespit edilmiştir. Serum açlık ve tokluk safra asitleri, ALT, ALP ve bilirubin düzeyleri, hepatobiliyer hastalıklı köpeklerde kontrol köpeklerdekinden önemli derecede yüksek bulunmuştur. Köpeklerde hepatobiliyer hastalıkların tanısında, ayırıcı tanısında ve izlenmesinde serum safra asitlerinin açlık ve tokluk düzeylerinin veteriner kliniklerde uygulanmakta olan rutin testlerden daha duyarlı ve özgül olduğu, zaman ve ekonomik olarak veteriner klinisyenlere avantaj sağlayacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: ALP, ALT, karaciğer-safra yolu hastalıkları, köpek, safra asitleri

Routine Hematological and Biochemical Tests for Dogs with Hepatobiliary Diseases and Clinical Importance of Fasting and Toughness Levels of Serum Bile Acids

Summary: In this study, it was aimed to evaluate the routine laboratory test results used by veterinary clinicians in hepatobiliary disease dogs together with serum fasting and postprandial bile acid levels and to investigate whether the sensitivity and specificity of bile acids, especially time and economy, give clinicians an advantage. A total of 20 dogs, 10 animals with hepatobiliary disease symptoms (patient) and 10 clinically healthy (control) animals were the animal materials of this study. Hepatocellular diseases have been determined by clinical examination, routine hematologic and biochemical analyzes, ultrasonography, histopathologic examination and biopsy. Biochemical blood parameters were measured by an autoanalyzer using commercially available test kits. Hematological blood parameters were measured by a blood counter. Bile acid levels were determined by enzymatic method in blood sera taken after 12 h fasting and 2 h toughness. Serum fasting and toughness bile acids, ALT, ALP and bilirubin levels were found significantly higher in dogs with hepatobiliary disease than control dogs. In the case of hepatobiliary diseases in dogs, it has been concluded that starvation and toughness levels of serum bile acids are more sensitive and specific than routine tests applied in veterinary clinics, which would provide veterinary clinicians with advantages of time saving and economic.

Key words: ALP, ALT, bile acids, dog, hepatobiliary diseases

Giriş

Karaciğer, pankreas, safra kanalları ve safra kesesi hepatobiliyer sistem içinde yer alırlar ve sindirim için gereklidirler. Bu sistemin hastalıkları genel olarak hepatobiliyer hastalıklar olarak bilinir (4). Sindirim sistemi içerisinde yer alan ve

çok sayıda fonksiyonu gerçekleştiren karaciğer; üstlendiği metabolik şeflik görevi (14) yanında, safra asitlerini üretir ve birçok endojen ve eksojen bileşiğin detoksifikasyonunu sağlar (13). İlaçlar safra ile uzaklaştırılır, eritrosit döngüsü safra sistemi içerisinde gerçekleşir ve yağlar bağırsakta safranin varlığında sindirilir (18). Safranin önemli bir bileşeni olan safra asitleri, lipid sindirimi yanında, sinyal moleküller ve hormonlar olarak da görev alırlar (1,12,16). Hepatobiliyer hastalıkların tedavisinde safra asitlerinin ya da safra asit reseptörlerini etkileyen etkenlerin kullanımında, onların uyarıcısı oldukları resep-

Geliş Tarihi/Submission Date : 06.06.2017

Kabul Tarihi/Accepted Date : 03.10.2017

*Bu çalışma Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 16.12.2009 gün ve 2009-52-263 sayılı kararı ile gerçekleştirilen "Köpeklerde karaciğer-safra kanalı hastalıklarında kan ALT, ALP, bilirubin ve safra asitleri düzeyleri" adlı yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

törlere olan ilgileri önem arz eder (15). Karaciğer fonksiyonlarının karmaşıklığı, birbirlerine olan bağılıkları ve aynı zamanda farklı derecedeki hasarlara farklı oranda direnç göstermesi hepatobiliyer hastalıkların klinik tanısını zorlaştırmaktadır (24). Bilindiği gibi, karaciğer geniş bir rezerv kapasiteye ve rejenerasyon yeteneğine sahiptir (14). Üstelik karaciğer yıkımı primer ya da sekonder nedenli olabilir ve bunun sonucu olarak da klinik tablolar her zaman karaciğer hastalığını işaret etmeyebilir. Hepatobiliyer sisteme ait organlardan birinin rahatsızlığı diğerlerini de etkiler. Hepatopatinin sekonder olup olmadığını belirlemek bu açıdan önemlidir. Bu durumda gerekli olmayan bazı hepatik muayenelerden (biyopsi vb.) kaçınılır, böylece gerçek sorunun tanı ve tedavisi için ekonomi yapılmış ve zaman boşa harcanmamış olur (10). Hepatobiliyer hastalıkların tanısında ve izlenmesinde serum ALT, AST, ALP ve GGT enzim analizleri uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Günümüzde de, klinisyenlerin birçoğu karaciğerle ilgili fonksiyonları değerlendirmede, karaciğer enzimleri ve bilirubin gibi değerleri tercih etmektedirler. Her ne kadar bu enzimler hasta-

hastalıkların tespit edilmesinde yararlanılabilir. Safra asitleri testinin kedi ve köpeklerde hepatobiliyer hastalıklar ve portosistemik vasküler anormallikler için tanısal test olarak kullanılacağı bildirilmiştir (17). Bu nedenle çalışmada, hepatobiliyer hastalıklarda rutin test sonuçlarının açlık ve tokluk safra asit düzeyleri (ASA ve TSA) ile birlikte değerlendirilmesi ve hepatobiliyer hastalıkların tanısında ve izlenmesinde safra asit düzeylerinin veteriner klinisyenlere ne kadar yardımcı olabileceğinin, ekonomik ve zaman açısından neler kazandırabileceğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

İstanbul'da özel bir veteriner polikliniğine gelen karaciğer ve safra sistemi hastalıklarından şüpheli 10 köpek ile sağlıklı olup rutin aşılama ve kontrol için gelen 10 köpek olmak üzere değişik ırklardan toplam 20 köpek çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Çalışma, Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'nun 16.12.2009 gün ve 2009-52-263 sayılı kararı ile gerçekleştirilmiştir. Köpeklere ait bireysel özellikler Tablo 1'de verilmiştir. Hayvanlarda yaş, ırk ve cinsiyet dikkate alınmamıştır.

Tablo 1. Klinik olarak hastalıklı ve sağlıklı (kontrol) görünen köpeklerde bireysel özellikler

No	Hastalıklı Köpekler			Sağlıklı Köpekler		
	İrk	Cinsiyet	Yaş (yıl)	İrk	Cinsiyet	Yaş (yıl)
1	Teriyer melezi	Dişi	13	Golden Retriever	Dişi	1
2	Melez	Erkek	7	Melez	Erkek	4
3	West Highland	Dişi	6	Boxer	Dişi	6
4	Doberman Pinscher	Erkek	6	Chiwawa	Dişi	5
5	Alman çoban köpeği	Dişi	0.5 (6ay)	Labrador Retriever	Erkek	3
6	Teriyer melezi	Dişi	15	Melez	Erkek	2
7	Cocker Spaniel	Dişi	11	Alman çoban köpeği	Dişi	9
8	Dachshund	Erkek	11	Rottweiler	Erkek	5
9	Cocker Spaniel	Erkek	8	Golden Retriever	Erkek	2
10	Labrador Retriever	Erkek	6	Rottweiler	Erkek	3

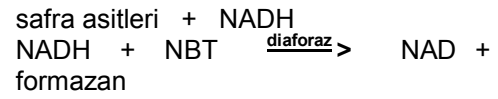
lıkların belirlenmesinde yüksek bir hassasiyete sahip olsalar da, özgüllüklerinin az olması nedeniyle zaman zaman laboratuvar sonuçlarının hatalı şekilde yorumlanmasına neden olurlar. İşte bu noktada serum safra asitleri tayini önem arz edebilir. Özellikle klinik olarak, siroz, portosistemik şant gibi gizli seyreden hepatobiliyer

Köpeklerin bacak venalarından usulüne uygun olarak alınan kan örneklerinden serumlar çıkarılmış ve biyokimyasal (toplam protein, kan üre azotu (BUN), kreatinin, ALT, AST, ALP, glikoz, Na, K, Ca, P, amilaz, lipaz, kolesterol, toplam bilirubin, ASA, TSA) ve hematolojik (RBC, HCT, MCV, HGB, MCH, MCHC, PLT, WBC) analizle-

re tabi tutulmuştur. Hastalardan bazılarında tanıyı güçlendirmek için idrar analizi, histopatolojik analiz ve ultrason, biyopsi vb. tanısal incelemeler de yapılmıştır. Bu uygulamalar özel bir veteriner laboratuvarı'nda (Vetlab, İstanbul) gerçekleştirilmiştir.

Serum biyokimyasal parametrelere ait değerler otoanalizör (Prestij 24i Biyokimya Analizörü) kullanılarak ölçülmüştür. Hayvanlardan 12 saatlik açlık ve 2 saatlik bir tokluk durumunda alınan kanların serum örneklerinde safra asitleri enzimatik yöntemle (Spinreact) tespit edilmiştir (19). Yönteme göre; 3-alfahidroksisteroid dehidrogenaz (3 α -HSD) enzimi ile safra asitlerindeki 3-alfa-hidroksil grupları oksidasyonla 3-keton gruplarına çevrilirken aynı anda NAD⁺ NADH'a indirgenir. Elde edilen NADH sonrasında nitrotetrazolyum mavisi (NBT) ile reaksiyona sokulur ve diaforaz enzimi ile formazan boya meydana gelir. Bu boyanın 540nm dalga boyunda ışık absorbansı ölçülerek serum safra asit düzeyleri hesaplanır (toplam safra asidi miktarı: mg/Lx2.547= μ mol/L olarak bulunur). Absorbans safra asidi miktarı ile doğru orantılıdır.

Test yüksek spesifite ve duyarlılığa sahiptir ve reaksiyonlar şu şekildedir (3):



Çalışmada elde edilen verilerin istatistik analizi için SPSS 14.1 paket programından yararlanılmıştır. İstatistik analize geçilmeden önce verilerin dağılımını incelemek ve parametrik test varsayımlarını kontrol etmek için Shapiro Wilks ve Levene Testi uygulanmıştır (22). Hasta ve kontrol gruplarında elde edilen ortalama değerler arası farklılıkların önemi, parametrik test varsayımlarını sağlayan değişkenler için student t-testi, parametrik test varsayımlarını sağlayamayan değişkenler için ise Mann Whitney- U testi kullanılmıştır.

Bulgular

Hepatobiliyer hastalıklı köpeklerde, klinik olarak daha çok (%50 ve üzeri) uyuşukluk, iştahsızlık, kusma, ateş ve dehidrasyon gözlenmiştir (Tablo 2). Hastalık belirtileri gösteren köpeklere ait klinik bulgular ve derecelendirme ile olgular arasındaki %'lik dağılım Tablo 2'de verilmiştir.

İncelenen parametreler açısından hasta ve kontrol gruplarına ait ortalama değerler arası farklılıkların istatistik önemliliği Tablo 3'te sunulmuştur. Hepatobiliyer hastalıklarda kan lökositlerinde de önemli bir artış gözlenmiş ve artışın

Tablo 2. Hastalıklı köpeklerde gözlenen klinik bulgular, derecelendirmeler ve %'lik dağılım

Olgu	İştahsızlık	Uyuşukluk	Kusma	Kilo kaybı	Sarılık	Ateş	Asites	Karın ağrısı	Su kaybı	Deri lezyonu	Sinirsel bulgu	Polidipsi Poliüri	Dispne
1	++	++	+		+++								
2	+	+		+			+		+				
3	+		+					+					+
4	+	++	+	+	++	++			++	+			
5		+									+		
6	++	++	+		+++	++			++				+
7						+				+		+	+
8	++	+	+			+	+	+	++				
9		++	+			+		+	++				
10	+	+	+			+							
Sıklık	%70	%80	%70	%20	%30	%60	%20	%30	%50	%20	%10	%10	%30

İştahsızlık: += yenilen miktarda azalma, ++= hiçbir şey yememe
Kusma: += mevcut
Sarılık: ++= gözler ve deride, +++=gözler, deri ve mukozalarda
Asites: += mevcut
Dehidrasyon: += orta düzeyde, ++= oldukça
Sinirsel bulgular: += mevcut
Dispne: += mevcut

Uyuşukluk: += hareketlilikte azalma, ++= devamlı uyuma hali
Kilo kaybı: += mevcut
Ateş: += 38.5-39°C, ++= 39-40°C
Abdominal ağrı: += mevcut
Deri lezyonu: += mevcut
Polidipsi-poliüri: += mevcut

Tablo 3. Hasta ve Kontrol gruplarından elde edilen hematolojik ve biyokimyasal verilerin istatistik analizi.

Parametre	Hasta Grup (n=10) X±Sx	Kontrol Grup (n=10) X±Sx	P
RBC (x 10 ⁶ /mm ³)	6.41±0.27	6.63±0.20	0.510
HCT (%)	42.63±3.19	43.04±2.14	0.915
MCV (µm ³)	67.4±2.0	67.6±1.1	0.912
Hemoglobin (g/dL)	14.31±0.85	15.94±0.48	0.103
MCH (pg)	21.7±0.5	21.4±0.4	0.637
MCHC (g/dL)	33.01±0.69	33.10±0.50	0.917
PLT (x 10 ³ /mm ³)	308.67±31.43	337.10±29.44	0.518
Lökosit (x 10 ³ /mm ³)	21.18±3.06	11.15±0.73	0.004
Toplam Protein (g/dL)	6.53±0.46	6.64±0.19	0.808
BUN (mg/dL)	23.89±10.33	18.20±1.74	0.601
Kreatinin (mg/dL)	1.81±0.93	0.90±0.06	0.356
ALT (U/L)	460.22±141.64	54.00±6.78	0.021
AST (U/L)	85.33±11.70	34.30±2.68	0.043
ALP (U/L)	1174.78±545.46	88.10±9.79	0.005
Glikoz (mg/dL)	92.89±6.95	102.30±5.20	0.287
Na (mmol/L)	145.22±2.62	149.60±0.70	0.141
K (mmol/L)	3.87±0.22	4.36±0.14	0.074
Ca (mg/dL)	9.75±0.53	10.34±0.18	0.324
P (mg/dL)	5.94±1.58	5.00±0.29	0.525
Amilaz (U/L)	880.40±112.66	675.50±71.52	0.094
Lipaz (U/L)	1795.00±1089.03	264.90±40.59	0.028
Toplam Kolesterol (mg/dL)	418.22±156.23	210.10±12.47	0.220
Toplam Bilirubin (mg/dL)	3.46±0.99	0.33±0.06	0.013
Açlık SA (µmol/L)	79.11±12.49	4.30±0.67	0.000
Tokluk SA (µmol/L)	101.67±14.87	11.70±1.02	0.000

sağlıklı hayvanlardakinin yaklaşık iki katı olduğu hesaplanmıştır (Tablo 3).

Kontrol grubunu oluşturan köpeklerde hematolojik ve biyokimyasal analiz sonuçları normal değerlerde bulunmuştur. Açlık ve tokluk serum safra asitleri ortalama değerleri sırasıyla 4.30±0.67 µmol/L ve 11.70±1.02 µmol/L; ALT ve ALP aktiviteleri sırasıyla 54.00±6.78 ve 88.10±9.79 U/L, T.bilirubin ortalama değeri ise 0.33±0.06 mg/dL olarak hesaplanmıştır (Tablo 3). Hepatobiliyer hastalıklı köpeklerde ise, bu parametrelere ait ortalama değerlerin kontrol değerlerden oldukça yüksek oldukları saptanmıştır. Özellikle açlık serum safra asitleri ortalama değerinin (79.11±12.49 µmol/L) kontrol değerden yaklaşık 18 kat, tokluk serum safra asit ortalama değerinin ise (101.67±14.87 µmol/L) kontrol değerlerden yaklaşık 9 kat yüksek olduğu bulunmuştur. Tokluk safra asitleri ortalamala-

rının değeri olarak yüksek seviyelere ulaştığı hesaplanmıştır (Tablo 3).

Serum ALT, ALP, toplam bilirubin ve safra asitleri seviyelerinin hastalıklara göre karşılaştırılması Tablo 4'te verilmiştir. Tabloda verilen hastalıklar içinde böbreküstü bezin aşırı aktivitesi (hiperadrenokortisizm) hepatobiliyer hastalıklar içinde olmamasına rağmen klinik muayene sırasında karıştırılabileceği düşüncesiyle ve test sonuçlarını hepatobiliyer hastalıklar ile karşılaştırmak amacıyla tabloya dahil edilmiştir. Diğerleri primer ya da sekonder olarak hepatobiliyer hastalıklar içinde değerlendirilmiştir.

Rutin biyokimyasal analizlerden ALT, AST, ALP, lipaz ve toplam bilirubin ortalama değerlerinin hasta köpeklerde kontrollere göre istatistik açıdan önemli artışlar sergilediği saptanmıştır (P<0.05). Bunlardan çok daha güçlü olarak açlık ve tokluk serum safra asit ortalama değerlerinin

Tablo 4. Köpeklerde serum ALT, ALP, toplam bilirubin ve safra asit düzeylerinin çalışmada gözlenen hastalıklardaki dağılımı

Ör- nek No	Gözlenen Hastalıklar	Açlık Safra asitleri	Tokluk Safra asitleri	ALT	ALP	Toplam Bilirubin
1	Kolestaz	150 (+++)	135 (++)	1254 (+++)	4642 (++++)	8.8 (++++)
2	Siroz	75 (++)	80 (++)	29	140	0.6
3	Akut pankreatit nedenli kolestaz	82 (++)	76 (++)	240 (+)	534 (+)	1.4 (+)
4	Leptospiroz	56 (++)	62 (++)	120 (+)	161 (+)	4.3 (++)
5	Portosistemik şant	78 (++)	189 (+++)	181 (+)	261 (+)	0.7
6	Kolestaz	82 (++)	114 (+++)	786 (++)	3257 (+++)	6.7 (++++)
7	Hiperadrenokortisizm	3	14	105 (+)	2090 (+++)	0.5
8	Biliyar Peritonit	115 (+++)	128 (+++)	159 (+)	457 (+)	3.4 (++)
9	Akut pankreatit nedenli kolestaz	57 (++)	58 (++)	478 (+)	1035 (++)	4.7 (++)
10	NSAID nedenli karaciğer zehirlenmesi	17 (+)	43 (+)	895 (++)	108	0.5

Safra Asitleri: <50: +, 50-100: ++, >100: +++

ALT: <500: +, 500-1000: ++, >1000: +++

ALP: <500: +, 1000-2000: ++, 2000-3500: +++, >3500: ++++

TB: <3: +, 3-5: ++, 5-7: +++, >7: ++++

kontrol grubuna göre önemli artışlar gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 3). Bu artışlar tüm hepatobiliyer hastalıklarda (9/10) gözlenmiştir (Tablo 3). Özellikle kolestaz ve biliyar peritonit olgularında hem açlık hem de tokluk safra asitlerinin çok daha anlamlı artışlar (>100µmol/L) gösterdiği dikkati çekmiştir (Tablo 4). Hepatobiliyer bir hastalık olmayan hiperadrenokortisizmde serum safra asitlerinin açlık ve tokluk değerlerinin normal sınırlarda kaldığı (3 ve 14 µmol/L) gözlenmiştir. Kolestazis olgularında serum ALT değerlerinin en yüksek değerlere (1254 U/L ve 786 U/L) eriştiği, ALP düzeylerinin 4542 U/L ve 3257 U/L olduğu ve toplam bilirubin değerlerinin de çok önemli artışlar sergilediği (8.8 ve 6.7mg/dl) tespit edilmiştir (Tablo 4).

Serum lipaz aktivitesinin köpeklerde büyük varyasyon gösterdiği ve kontrol grubuna (264±40.59 U/L) oranla hepatobiliyer hastalıklı köpeklerde yaklaşık yedi kat arttığı (1795±1089.03 U/L) saptanmıştır (Tablo 3).

Tartışma ve Sonuç

Karaciğer fonksiyonlarının karmaşıklığı, birbirlerine olan bağılıkları ve aynı zamanda farklı derecedeki hasarlara farklı oranda direnç göstermeleri hepatobiliyer hastalıkların klinik tanısını zorlaştırır (24). Diğer taraftan, karaciğer yıkımı primer ya da sekonder nedeni olabilir ve bunun sonucu olarak da klinik tablolar her zaman karaciğer hastalığını işaret etmeyebilir (10). Hepato-

biliyer hastalıklarda gözlenen halsizlik, kusma, iştahsızlık, kilo kaybı ve uyuşukluk (letarji) gibi klinik bulgular genellikle hastalıkları ayırıcı özellikte değildir. Hastalar birçok hastalıkta da gözlenen genel bir klinik tablo sergilerler. Çalışmada hepatobiliyer hastalıklardan şüpheli dokuz köpekte yaygın olarak uyuşukluk (9/10), kusma (7/10), iştahsızlık (5/10), dehidrasyon (6/10), yüksek ateş (6/10) gibi genel bulgular tespit edilmiştir (Tablo 2). Fazla belirleyici olmayan bu tür klinik bulgularda çoğu zaman serumda biyokimyasal analizler yapılmadan, karaciğer ya da safra sistemindeki bir problemden şüphelenilmez (21). Bu durumda, veteriner kliniklerde rutin olarak daha çok hepatobiliyer enzimler (ALT, AST, ALP, GGT), bilirubin serum değerleri ölçülür ve bazı görüntüleme tekniklerinden yararlanılır (14).

Hemogram ve formül lökosit analizleri 10 hastanın 8'inde yangısal bir reaksiyonun varlığına ve onun karakterine dair fikir vermiştir. Lökosit dışında bu hematolojik değerlerin hiçbiri tanısız açıdan gruplar arasında önemli bir farklılık oluşturmamıştır (Tablo 3). Kan lökositlerindeki bu artış sağlıklı hayvanlardakinin yaklaşık iki katı olup (Tablo 3), karaciğer hastalıklarında muhtemelen sekonder hastalıkların devreye girmesi ile ilişkilendirilebilir.

Çalışmada serum biyokimyası açısından öne çıkan ortak veri 10 hastanın 9'unda hepatobili-

yer enzimlerin (+lipaz) ve serum safra asit değerlerinin yüksek oluşudur (Tablo 3). Bu parametrelerin hepatobiliyer hastalıklara göre dağılımı anlamlıdır (Tablo 4). Özellikle safra asit değerleri 10 hastanın dokuzunda çok anlamlı bir artış göstermiştir. Hiperadrenokortisizm'de ise normal seviyelerinde kalmıştır (3 ve 14 $\mu\text{mol/L}$). Bu şekilde, hiperadrenokortisizm klinik muayene ve anamnez sonunda hepatobiliyer bir hastalıktan şüphelenilirse serum safra asitlerinden ayırıcı tanıda yararlanılabileceği belirlenmiştir. Açlık ve tokluk safra asitlerinin hepatobiliyer hastalıklardaki dağılımında bilhassa kolestazda ve biliyar peritonitte her ikisi de $>100 \mu\text{mol/L}$ değerlere ulaşmıştır. Buna karşın, portosistemik şant (PSS)'da sadece tokluk safra asit değerleri $>100 \mu\text{mol/L}$ bulunmuştur (Tablo 3).

Kolestazda diğer karaciğer fonksiyon testleri ile birlikte serum safra asitleri de (açlık ve tokluk) çok önemli artış göstermiştir (Tablo 4). Akut pankreatit nedenli kolestazda (sekonder) da benzer artışlar saptanmıştır. Fakat bu artışlar primer kolestazdaki kadar yüksek değerlere ulaşmamıştır. Sirozda diğer karaciğer fonksiyon testleri normal iken hem açlık hem de tokluk serum safra asitleri önemli artış göstermiştir (Tablo 4). Steroid olmayan ağrı kesici ilaçlardan (NSAID) kaynaklı karaciğer zehirlenmesinde safra asitleri açlık ve tokluk serum değerleri hafif artış gösterirken; diğer karaciğer fonksiyon testlerinden sadece ALT çok yüksek değerlere ulaşmıştır (Tablo 4). Bu artış hepatositlerin hasarı ile ilişkilendirilebilir.

Kontrol grupta ise, açlık ve tokluk safra asitleri ortalama düzeyleri sırasıyla $4.30 \pm 0.67 \mu\text{mol/L}$ ve $11.70 \pm 1.02 \mu\text{mol/L}$ olarak hesaplanmıştır (Tablo 3). Serum safra asit ortalama değerleri referans değerler içinde (ASA: 0-12 $\mu\text{mol/L}$ ve TSA: 0-16 $\mu\text{mol/L}$) bulunmuştur (23). Kontrol grubundaki köpeklerde saptanan diğer biyokimyasal parametrelere ait ortalama değerlerin de köpekler için bildirilen normal sınırlar içinde kaldıkları belirlenmiştir (2).

Kedi ve köpekler için referans aralık değerleri; enzimatik yöntemde 12 saat açlık sonrası için $<10 \mu\text{mol/L}$ ve beslenmeden 2 saat sonrası için $<20 \mu\text{mol/L}$ (8). Bir başka kaynakta ise (3), köpek ve kedide preprandiyal (öğün öncesi) normal değerler sırasıyla $\leq 10 \mu\text{mol/L}$ ve $\leq 5 \mu\text{mol/L}$; postprandial (öğün sonrası) normal değerler ise sırasıyla $\leq 25 \mu\text{mol/L}$ ve $\leq 15 \mu\text{mol/L}$ olarak verilmiştir. Köpeklerde $>25 \mu\text{mol/L}$ serum safra asit düzeyleri anormal kabul edilmiştir (17).

Çalışmada, hepatobiliyer hastalıklı dokuz hayvanın sadece üçünde (3/9) ALT seviyesi ciddi oranda bir artış göstermiştir (Tablo 3 ve Tablo 4). Direkt karaciğer sorunu olan sirozda ise (Olgu 2) seviyeleri normal bulunmuştur. Diğer 5 köpekte karaciğer hastalıkları haricinde, sistemik olan rahatsızlıklarda görülebilecek bulguların varlığında (kilo kaybı, kusma, ishal, hepatomegali, asites, depresyon, anoreksi gibi) veya sekonder hastalıklarda bu değerler hafif oranlarda yükselmesine neden olabilir (26). Her ne kadar bu değer başlangıçta karaciğeri düşündürse de, gerek hepatobiliyer hastalıklar gerekse karaciğerde yıkıma neden olabilecek diğer sekonder sorunların ayırımında klinik olarak yardımcı olmamıştır.

Serum ALP değerlerini incelediğimizde (Tablo 3 ve Tablo 4), kolestazlı hastalarda (Olgu 1 ve 6) normal değerlerin üç katından daha fazla olmak üzere ciddi bir artış gösterdiği saptanmıştır ($P < 0.01$). Siroz ve karaciğer toksikasyonu gözlenen hastalarda (Olgu 2 ve 10) serum ALP değerleri normal seviyede kalmıştır. Genel olarak ALT ile benzer artışlar gösteren bu enzim, sadece kolestaz tanısı aşamasında oldukça yüksek seviyeleri nedeniyle önemli bir bulgu olarak ortaya çıkmıştır. Ancak sindirim sistemi, pankreas ve kemik ile ilgili rahatsızlıklarda da artış gösterdiği için serum ALP değeri sadece karaciğere spesifik bir bulgu değildir (14). Karaciğerin ilaç metabolizmasında oynadığı merkezi rolü, yüksek kan akımına sahip olması ve sindirim sistemi ile sistemik dolaşım arasındaki yakın anatomik pozisyonu onu sekonder bozukluklara karşı oldukça hassas bir duruma sokar. Bu nedenle, birçok klinik olguda karaciğer enzimleri artış gösterebilir ancak, önemli bir hepatobiliyer hastalık durumu mevcut olmayabilir. Aynı zamanda, enzim aktivitelerinin yükselme seviyesi karaciğerin fonksiyonel kapasitesiyle de ilgili bir bilgi vermez, prognozun göstergesi de değildir (7).

Bilirubin enzimlere oranla çok daha spesifiktir, ancak hassasiyeti düşüktür (10). Kedi ve köpeklerde genellikle bilirubin seviyesi henüz yükselmeden, mevcut karaciğer hastalığı kısmen ciddi bir seviyeye gelmiş olabilir. Buna rağmen tanı ve prognoz açısından fazla değeri yoktur. Sekonder karaciğer hastalıklarında da (septisemi, toksemi ya da enfeksiyon gibi), primer olanlara benzer bir sarılık tablosu görülebilir (26). Yüksek bilirubin seviyesinin mutlaka prehepatik, hepatic ya da posthepatik olup olmadığı da in-

celenmelidir (10). Bu bağlamda serumda direk ve indirek bilirubin testleri uygulanabilir (14). Bilirubin de ALP gibi kolestazlı hastalarda ciddi oranda bir artış göstermişken (Olgu 1, 6, 9), bu hastaların ikisinde (Olgu 1 ve 6) sarılık durumu klinik incelemede de gözlenmiş (Tablo 4) fakat Olgu 9'da klinik muayene ile uyumlu bulunmamıştır. Kolestaz dışında yine sarılığın gözle görüldüğü leptospiroz olgusunda ve direkt safra sistemi ile ilişkili biliyar peritonitte de artış gösteren bilirubin, karaciğeri direkt etkileyen toksikasyon, siroz ve PSS rahatsızlıklarında normal seviyede kaldığı için hassasiyeti düşük olarak değerlendirilmiştir. Buna karşın, çalışmada serum safra asitlerinin açlık ve tokluk düzeylerinin tayini klinik olarak çok daha yararlı olduğu kanısına varılmıştır. Özellikle siroz, portosistemik şant ve biliyar peritonit tespit edilmesinde önemli olduğu gözlenmiştir (Tablo 4). Serum lipaz aktivitesinin kontrol gruba oranla hepatobilyer hastalıklı köpeklerde yaklaşık 7 kat arttığı gözlenmiş (Tablo 3), ancak köpeklerde büyük varyasyon nedeniyle klinik olarak önem taşımadığı kanısına varılmıştır.

Sağlıklı 10 köpekte açlık ve beslenmeden 2 saat sonrası (tokluk) safra asit ortalama değerleri sırasıyla 4.30 ± 0.67 $\mu\text{mol/L}$ ve 11.70 ± 1.02 $\mu\text{mol/L}$ bulunmuştur. Çeşitli karaciğer hastalıklarından şikayet edilen 9 köpekte ise, ortalama değer olarak açlık 79.11 ± 12.49 ve tokluk 101.67 ± 14.87 $\mu\text{mol/L}$ hesaplanmıştır (Tablo 3). Portosistemik şantlı bir köpekte açlık safra asit değerleri 78 ve tokluk değerleri 189 $\mu\text{mol/L}$ hesaplanmıştır. Hiperadrenokortisizm'li bir köpekte ALT aktivitesi 105 IU/L(+) ve ALP aktivitesi 2090 IU/L(+++) olmasına rağmen açlık ve tokluk safra asit düzeyleri sırasıyla 3 ve 14 $\mu\text{mol/L}$ bulunmuştur. Buradan safra asit değerlerinin hepatobilyer hastalıkların tanısında çok daha önemli ve hassas olduğu sonucunu çıkarabiliriz. Buna karşın, sirozda $75/80$ $\mu\text{mol/L}$ (++); akut pankreatit nedeniyle kolestazda $82/76$ ve $57/58$ $\mu\text{mol/L}$ (++) ve NSAİD nedeniyle karaciğer zehirlenmesinde $17/43$ (+/++) hesaplanmıştır (Tablo 4). Benzer bir çalışmada (25) sağlıklı 66 köpekte, açlık ve beslenmeden 2 saat sonrası safra asitleri değeri 2.5 $\mu\text{mol/L}$ bulunmuştur. Çeşitli karaciğer hastalıklarından muzdarip 62 köpekte açlık 86.9 ve tokluk 78.7 $\mu\text{mol/L}$ bulunmuştur. Portosistemik şantlı köpeklerde açlık/tokluk safra asit değerleri $114/221$ $\mu\text{mol/L}$, sirozda ise $62/149$ $\mu\text{mol/L}$ hesaplanmıştır. Portosistemik şant için en yaygın kullanılan tarama testleri safra asitleri

değeri ve plazma amonyak düzeyleridir. Genel bir popülasyonda ve karaciğer hastalığı olan köpeklerde plazma amonyak derişimi portosistemik şant varlığını saptamak için oldukça duyarlı ve spesifik bir parametredir (9).

Karaciğer hastalığı tanısında açlık serum safra asitlerinin spesifitesi, 5 $\mu\text{mol/L}$ 'ye eşit ve 15 $\mu\text{mol/L}$ 'nin üzerinde veya daha yüksek bir seviyede %100'e ulaştığı bildirilmiştir (5).

Yapılan bu çalışmada ise, karaciğer hastalıklarının tanısında, serum safra asitlerinin <50 $\mu\text{mol/L}$:+, 50-100 $\mu\text{mol/L}$:+, >100 $\mu\text{mol/L}$:+ olarak değerlendirilmiştir. Buna göre açlık değerleri kolestaz ve biliyar peritonit olgularında >100 $\mu\text{mol/L}$ (+++) olduğu tespit edilmiş, siroz, akut pankreatit nedeniyle kolestaz, leptospiroz, portosistemik şant gibi hepatobilyer hastalıklarda ise 50-100 $\mu\text{mol/L}$ (++) olduğu saptanmıştır (Tablo 4). Böylece, serum safra asitleri açlık ve tokluk değerlerinin diğer parametrelere göre çeşitli karaciğer hastalıklarının (kolestaz, siroz, leptospiroz, portosistemik şant, biliyar peritonit, karaciğer zehirlenmesi) en spesifik ve duyarlı göstergeleri olduğu ve klinik hastalık derecesi ile ilişki içinde bulunduğu söylenebilir.

Serum safra asitleri derişimi hepatosellüler, kolestazik hastalıklar ve PSS'de artış gösterir (11,14). Özellikle hem açlık hem de tokluk safra asitleri belirlendiğinde bu testlerin hassasiyeti diğer bütün karaciğer fonksiyon testlerinden çok daha fazladır. Bugün için, klinik bulgularda sarılık varsa, hepatik ya da ekstrahepatik bir sorunu olan hastalar hakkında serum safra asitleri değeri daha fazla bilgi vermez. Sarılık olmayan ve karaciğer hastalığından şüphelenilen olgularda ise, sonraki tanısız değerlendirmelere de destek olacak iyi bir inceleme testidir. Açlık safra asitlerinin 10 $\mu\text{mol/L}$ 'den, tokluk safra asitlerinin ise 20-25 $\mu\text{mol/L}$ 'den fazla olması önemli bir hepatik hastalığın ya da PSS'nin varlığını belirtir ve daha ileri karaciğer değerlendirmelerinin, mümkünse karaciğer biyopsisinin yapılması gerektiğini hatırlatır (6). Çünkü kronik hepatit, hepatik nekroz, kolestaz ve hepatik neoplazinin de olduğu birçok hastada serum safra asit değerleri anormal olup genellikle hepatik olmayan bozukluklardan kaynaklanan sekonder karaciğer hastalıklarında belirgin bir artış göstermezler (26). Bu durum, ultrason veya biyopsi gibi tanı yöntemlerinin yapılması/yapılmaması kararının alınmasını kolaylaştırır (20).

Siroz ve PSS'li olgularda serum parametreleri arasında safra asitleri en belirgin artışı göster-

miştir (Tablo 4). Ayrıca olgu 10'da yüksek ALT değerinin karaciğerle ilişkili olabileceği düşüncesini destekleyen tek parametre olarak hassasiyetini belli etmiştir. Hiperadrenokortisizm de ise enzimlerin yükselmiş olmasına karşılık, normal kalan safra asitleri değeri karaciğer haricinde başka bir sorunun (sekonder) olma ihtimalini kuvvetlendirmiştir. Bilirubin ve ALP değerlerinin de hep yüksek seyrettiği kolestaz olgularında ise anlamlı artışlar tespit edilmiş ve böylece tanıda olasılıkların azaltılmasına yardımcı olmuştur. Siroz ve karaciğer zehirlenmesindeki yüksek seviyeleri sayesinde safra asitleri bu hastalarda biyopsinin gerekliliğini göstermiş ve bu sayede kesin tanıya varılmıştır. Safra asitlerinin açlık ve tokluk değerlerinin Olgu 7'de normal sınırlarda kaldığı (3 ve 14 $\mu\text{mol/L}$) gözlenmiştir. Böylece, klinik muayene ve anamnez sonucunda hepatobiliyer hastalık olarak değerlendirilecek sekonder hastalıkları ayırmada serum safra asitlerinden yararlanılabileceği anlaşılmıştır. Olgu 7 dışındaki hastaların tümünde serum safra asitleri düzeyleri yüksek bulunmuş ve bu artışlar kontrol grubuna göre istatistik açıdan da önemli hesaplanmıştır. Olguların çoğunda özellikle tokluk safra asit düzeylerinde daha ciddi artışlar saptanmıştır (Tablo 3 ve Tablo 4). Dolayısıyla sadece açlık safra asitleri test edilir ve normal bir sonuç çıkarsa, tokluk safra asitleri düzeyinin de mutlaka tespit edilmesi gerekliliği (26) bu çalışma ile de desteklenmiş ve doğrulanmıştır.

Sonuç olarak, serum safra asitlerinin açlık ve tokluk değerlerinin hepatobiliyer hastalıklarda tanısal önemde olduğu ve safra asitlerinin fraksiyonel incelenmesinin klinisyenlere çok daha yararlı olacağı ve hepatobiliyer hastalıkların tanısında, ayırıcı tanısında ve izlenmesinde klinisyenlere zaman kazandıracığı, maddi açıdan da tasarruf sağlayacağı kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

1. Alnouti Y. Bile acid sulfation: A pathway of bile acid elimination and detoxification. *Toxicol Sci* 2009; 108(2): 225-46.
2. Altıntaş A, Fidancı UR. Evcil Hayvanlarda ve insanda kanın biyokimyasal normal değerleri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1993; 40(2): 173-86.
3. Anonim 1. Serum safra asit tayini. <http://www.eclinpath.com/chemistry/liver/liver-functiontests/bile-acids>. Erişim tarihi: 22.10.2015.
4. Anonim 2. Hepatobiliary diseases. https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_hepatobiliary_diseases. Erişim tarihi: 18.04.2017.
5. Center SA, Baldwin BH, Erb H, Tennant BC. Bile acid concentrations in the diagnosis of hepatobiliary disease in the cat. *J Am Vet Med Assoc* 1986; 189(8): 891-6.
6. Center SA, ManWarren T, Slater MR, Wilentz E. Evaluation of twelve-hour preprandial and two-hour postprandial serum bile acids concentrations for diagnosis of hepatobiliary disease in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199(2): 217-26.
7. Ettinger SJ, Feldman EC. *Textbook of Veterinary Internal Medicine. Seventh Edition. Vol 2.* Canada: Saunders Elsevier, 2010; p: 1609-710.
8. Freeman KP, Simpson J. Blood biochemistry: Bile acids. <https://www.vetstream.com/lapis/content/labtest/lab00294.asp>. Vetstream Ltd, 2014. Erişim tarihi: 15.12.2016.
9. Gerritzen-Bruning MJ, Van den Ingh TS, Rothuizen J. Diagnostic value of fasting plasma ammonia and bile acid concentrations in the identification of portosystemic shunting in dogs. *J Vet Intern Med* 2006; 20(1): 13-9.
10. Hall EJ, Simpson JW, Williams DA. *British Small Animal Veterinary Association. BSAVA Manual of Canine and Feline Gastroenterology, 2nd ed.* *Can Vet J* 2006; 47(7): 634.
11. Hofmann AF, Hagey LR. Bile Acids: chemistry, pathochemistry, biology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(16): 2461-83.
12. Houten SM, Watanabe M, Auwerx J. Endocrine functions of bile acids. *EMBO J* 2006; 25(7): 1419-25.
13. Kahn CM. *The Merck Veterinary Manual. Ninth Edition.* USA: John Wiley and Sons, 2005.
14. Karagül H, Altıntaş A, Fidancı UR, Sel T. Karaciğer Fonksiyonları. *Klinik Biyokimya Bölüm 7.* Ankara: Medisan Yayın Serisi No: 45, 2000.
15. Koç H, Altıntaş A. Safra asitleri ve obezite. *TVHB Dergisi* 2016; 16(3-4): 100-108.
16. Li T, Chiang JY. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. *Pharmacol Rev* 2014; 66(4): 948-983.
17. Morris DD. Diagnostic testing for liver disease. Careful selection and interpretation of diagnostic tests is key in determining cause and treatment. *Banfield Pet Hospital*. <https://>

- www.banfield.com/getmedia/0bc44376-daed-4531-99a0-cec65aa063fb/4_3Diag-nostic-testing-for-liver-disease. Erişim tarihi: 30.12.2016.
- 18.Önür ND, Beyler AR. Safra asitleri metabolizması. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2001; 54(1): 65-76.
 - 19.Qureshi MY, Smith SM, Murphy GM. Colorimetric enzymatic measurement of serum total 3 alpha-hydroxy bile acid concentrations without extraction. J Clin Pathol 1984;37(3): 317-20.
 - 20.Rothuizen J, Bunch SE, Charles JA, Cullen JM, Desmet VJ, Szatmari V, Twedt DC, van Den Ingh T, van Winkle TJ, Washabau RJ. WSAVA Standarts for Clinical and Histological Diagnoses of Canine and Feline Liver Diseases. First Edition. p 144. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006.
 - 21.Schlesinger DP, Rubin SI. Serum bile acids and assessment of hepatic function in dogs and cats. Can Vet J 1993; 34: 215-220.
 - 22.Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 1965; 52(3/4): 591-611.
 - 23.Sharma KR. Review on bile acid analysis. Int J Pharm Biomed Sci 2012; 3(2): 28-34.
 - 24.Simpson JW, Else RW. Digestive disease in the dog and cat (Library of Veterinary Practice). p 300. Wiley-Blackwell, USA, 1991.
 - 25.Stockham SL, Scott MA. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. p 908. USA: Wiley-Blackwell, 2013.
 - 26.Willard MD, Tvedten H. Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods. Fourth Edition. p 448. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2004.

Sorumlu Yazar:

Prof. Dr. Arif ALTINTAŞ
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Ankara-TÜRKİYE
Tel: 0312 3170315/4420
E-posta: aaltintas@ankara.edu.tr



Kültür Balıklarındaki *Vibrio anguillarum*'un İmmunohistokimyasal Yöntemle Teşhisi*

Tülay AKAYLI, Buket AYDIN

İstanbul Üniversitesi, Su Bilimleri Fakültesi, Balık Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul-TÜRKİYE

Özet: Bu çalışma ile yurdumuzda kültürü yapılan levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) balıklarında görülen *Vibrio (Listonella) anguillarum* kaynaklı enfeksiyonların bakteriyolojik, histopatolojik ve immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak teşhisinin yapılması amaçlanmıştır. Hastalık belirtisi gösteren ağırlıkları 150-220 gr arasında değişen toplam 10 adet levrek balığı ve ağırlıkları 150-200 gr arasında değişen toplam sekiz adet çipura balığı örneği bakteriyolojik ve histopatolojik yöntemler kullanılarak incelenmiştir. Etkenin dokulardaki varlığı ve lokalizasyonu ise immunohistokimyasal yöntem (streptavidin-biotin boyama) kullanılarak tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen bakteriyolojik, histolojik ve immunohistokimyasal çalışmalar sonucunda, hastalığın klinik semptomlarını gösteren levrek ve çipura balıklarında vibriosis hastalığının teşhisi yapılmış ve etkenin dokulardaki varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada bakterinin enfekte balık dokularındaki varlığının tespiti amacıyla kullanılan ve indirekt immunoenzimatik yöntemlerden olan streptavidin-biotin boyama yöntemi (StrepABC-IHC) *Listonella anguillarum*'un teşhisinde ilk kez kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Balık, immunohistokimya, *V. anguillarum*, vibriosis

Diagnosis of *Vibrio anguillarum* by Using Immunohistochemical Method in Cultured Fish

Summary: In this study, diagnosis of *Vibrio (Listonella) anguillarum* infections in cultured European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) in Turkey by using bacteriological, histopathological and immunohistochemical methods was aimed. In total, 10 European sea bass samples weighing between 150-220 g and eight gilt-head sea bream samples weighing between 150-200 g showing disease signs were investigated by using bacteriological and histopathological methods. The presence and the distribution of the agent in the tissues were detected by using immunohistochemical method (streptavidin-biotin staining). As a result of the bacteriological, histological and immunohistochemical studies, the diagnosis of vibriosis was made and the presence of *V. anguillarum* was detected in the tissues of affected European sea bass and gilt-head sea bream samples showing clinical symptoms. Also an immunoenzymatic method, streptavidin-biotin staining method (StrepABC-IHC) was used for the first time in this study for the detection of the presence of this bacterium in the infected fish tissues.

Key words: Fish, immunohistochemistry, *V. anguillarum*, vibriosis

Giriş

Levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura balıkları (*Sparus aurata*) yetiştiricilik koşullarında hızlı büyüyen önemli deniz balığı türlerindedir. Bu nedenle bu iki balık türünün Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi yurdumuzda da yetiştiriciliği başarılı bir şekilde yapılmaktadır (2). *Vibrio* türü bakterilerin neden olduğu vibriosis bakteriyel ve bulaşıcı bir hastalıktır. Hastalık dünya genelinde kültür balıkçılığı yapan tatlı su ve deniz işletmelerinde ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (3,17). Kültürü yapılan levrek ve çipura gibi de-

niz balıklarında (10,16) vibriosise neden olan en önemli patojen *Vibrio (Listonella) anguillarum*'dur (3,12,13,20). Araştırmacılar daha çok adı geçen patojen bakterinin virülans mekanizmasını aydınlatılması, hızlı tespiti ve neden olduğu hastalığın önlemesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Günümüzde etkenin teşhisinde mikrobiyolojik, serolojik, moleküler, histopatolojik ve immunohistokimyasal teknikler farklı araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (3,4,11,12,19).

L. anguillarum ile ilgili yapılan immunohistokimyasal çalışmalar; enfekte balık ve su canlılarının dokularındaki bakteri varlığının teyit edilmesi, dokulardaki lokalizasyonunun belirlenmesi, antijenin dokulardaki yoğunluğunun tespit edilmesi ve patojenin patogenezesinin belirlenmesi üzerine yoğunlaşmıştır (5,6,8,11). Ayrıca *L. anguillarum*'a karşı probiyotik etkisi olan bakterilerin

Geliş Tarihi/Submission Date : 04.04.2017
Kabul Tarihi/Accepted Date : 17.10.2017

*Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından 41630 no'lu proje ile desteklenmiş ve World Aquaculture Adelaide- Australia 2014'te sunulmuştur.

tespit edilmesi ve aşı etkinliğinin belirlenmesine yönelik araştırmalarda da immunohistokimyasal yöntemlerden yararlanılmıştır (1,17). Ülkemizde ise *L. anguillarum* serotip O1 ile deneysel olarak enfekte edilen gökkuşuğu alabalıklarının doku ve organlarındaki antijenlerin varlığını ve dokudaki dağılımının belirlenmesi amacıyla immunohistokimyasal teknikler kullanılmıştır (4).

Bu çalışmada; ülkemizde kültürü yapılan levrek ve çipura balıklarında görülen *V. anguillarum* kaynaklı enfeksiyonların bakteriyolojik, histopatolojik ve immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak teşhisinin yapılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada kullanılan balık materyali

Bu çalışmada incelenen balık materyalleri Ege Bölgesi'nde bulunan farklı deniz işletmelerinden temin edilmiştir. Hastalık belirtisi gösteren ve ağırlıkları 150-220 g arasında değişen toplam on adet levrek balığı ve ağırlıkları 150-200 g arasında değişen toplam sekiz adet çipura balığı incelenmiştir. İşletme sahiplerinden alınan bilgeye göre en yüksek ölüm oranı hasta levrek balıklarında görülürken (%70), çipuralarda ise ölüm oranının oldukça düşük olduğu (%10) belirtilmiştir.

Bakteriyolojik örnekleme

Hastalık belirtisi gösteren balıkların iç organlarından (dalak, böbrek ve karaciğer) %1.5 NaCl içeren Trypticase Soy Agar (TSA) (Merck 1.05458, Almanya) besiyerine ekimler yapılmıştır. Ekim yapılan petriyeler 22-23 °C'de 48-72 saat boyunca inkübe edilmiş ve izole edilen bakterilerin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin tespiti için rutin bakteriyolojik metotlar kullanılmıştır (3,7,18). Bu çalışmada referans bakteri (R) olarak İspanyadaki çipura balığından izole edilmiş olan bir adet *V. anguillarum* suşu kullanılmıştır.

Histopatolojik muayene

Histopatolojik inceleme için hasta balık örneklerine ventral, lateral ve operkular insizyon teknikleri uygulanarak iç organları ortaya çıkartılmıştır. Daha sonra balıkların dalak, karaciğer ve böbrek gibi iç organları yanı sıra solungaç ve kas dokularından da makas yardımı ile 0.5-1cm³ büyüklüğünde örnekler alınarak %10'luk formaldehit içerisinde 72 saat fikse edilmiştir. Tespit edilen doku örneklerinden rutin doku işleme prosedürü uygulanarak 5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Bu kesitler Hematoksilen-Eosin boyama yöntemi ile boyanarak histolojik olarak incelenmiştir (9,18).

İmmunohistokimyasal boyama (streptavidin-biotin yöntemi)

Araştırmada immunohistokimyasal metot olarak immunoenzimatik yöntemlerden streptavidin-biotin boyama yöntemi (StrepABC-IHC) kullanılmıştır. Hasta balıkların iç organlarından alınan doku örnekleri formalin ile fikse edildikten sonra rutin doku işleme basamağının ardından parafine gömülmüş ve bu parafin bloklardan 4µm kalınlığında kesitler poly-L-lysin kaplı lam üzerine alınmıştır. Daha sonra kesitler %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 30 dakika bekletilmiş ve sonrasında PBS ile yıkanmıştır. Lamaların üzerine 1:1000 oranında sulandırılmış anti-*V. anguillarum* monoklonal antikorundan (İbt FM-040AX-5) 30µL ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir. Kesitlere biotin ile işaretli sekonder antikor eklenmiş, 15 dakika inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrasında PBS ile yıkanan kesitlere streptavidin peroksidaz eklenmiş ve 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Yıkamadan sonra doku kesitleri üzerine 30µL AEC (Three-amino-9-ethylcarbazole) solüsyonu damlatılarak 15-20 dakika nemli ortamda bekletildikten sonra yıkanmıştır. İmmun boyamanın ardından preparatlar Mayer's hematoxylin ile boyanmış, entellan ile kapatılarak ışıklı mikroskop altında incelenmiştir. Antijen-antikor birleşmesinin gerçekleştiği immün pozitif odaklar, normal doku hücrelerinden farklı olarak kahverengi boyanmaları ile tespit edilmiştir (5,16,18).

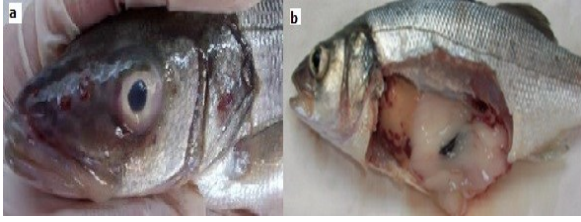
Bulgular

Klinik ve nekropsi bulguları

Hasta balıklarda dış bakıda genel olarak hareketlerde durgunluk, iştahsızlık, solungaçlarda solgunluk ve vücut yüzeyinde az miktarda pul kaybı gibi benzer klinik bulgular dikkati çekmiş



Şekil 1. (a) Hasta çipura balıklarının yüzgeç diplerinde kanama (b) solungaç filamentlerinde erozyon ve karaciğerde solgunluk



Şekil 2. (a) Levrek balıklarının baş bölgesindeki hemorajik odaklar ve (b) karaciğer üzerinde peteşiyel kanama odakları, iç organlarda aşırı yağlanma ve iç organların genel görünümü

tir. Çipura balıklarının pelvik, anal ve pektoral yüzgeç diplerinde hemoraji görülürken (Şekil 1a.) hasta levrek balıklarında ise bu bölgeler yanı sıra baş ve karın bölgesinde yoğun hemorajik alanlar dikkati çekmiştir (Şekil 2a). Çipura balıklarının iç bakısında solungaç filamentlerinde erozyon yanı sıra karaciğerin anemik görünüşü dikkati çekmiştir (Şekil 1b). Levrek balıklarında aşırı solgun karaciğer üzerinde hemorajik odaklar, dalakta büyüme, bağırsakta sarı renkli ve kokulu sıvı birikimi ve iç organlarda yağlanmanın olduğu gözlenmiştir (Şekil 2b).

Tablo 1. Örneklemeler sonucu izole edilen bakteri izolatlarının biyokimyasal özellikleri

Karakterler	1	2	3	4	5	6	7	8	R
Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram Boyama	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Sitokrom Oksidaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TCBS'de üreme	S	S	S	S	S	S	S	S	S
VAM'da üreme	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Sitrat kullanımı	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-galaktosidaz (ONPG)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Metil Red	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arjinin dihidrolaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lizin dekarboksilaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornitin dekarboksilaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrat indirgeme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Üreaz üretimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jelatinaz üretimi	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nişasta	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glukoz, gaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glukoz, asit	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinoz, asit	-	+	+	+	+	+	+	+	-
myo-İnositol, asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Laktoz, asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol, asit	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannoz, asit	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Maltoz, asit	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sukroz, asit	+	+	+	+	+	+	+	+	+
İnositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salisin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
% 0 NaCl'de üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-
% 3 NaCl'de üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
% 8 NaCl'de üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-
% 10NaCl'de üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37 °C'de büyüme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O/129'a duyarlılık	+	+	+	+	+	+	+	+	+

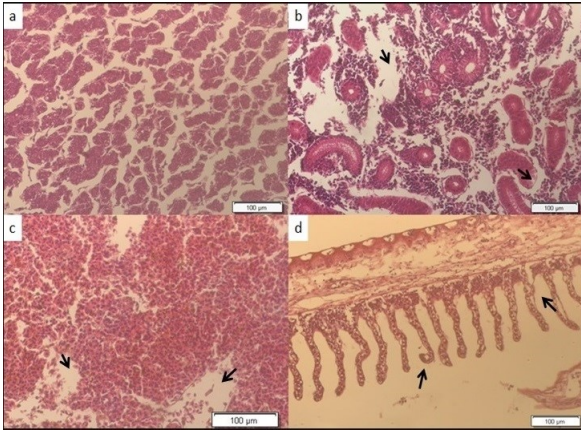
(+): Pozitif reaksiyon, (-): Negatif reaksiyon, S: Sarı, F: Fermantatif, VAM: *Vibrio anguillarum* Medium, TCBS: Tiyosülfat sitrat safra tuzu, O/F: oksidatif/fermentatif

Bakteriyolojik bulgular

%1.5 NaCl içeren TSA besiyerine yapılan ekimlerin inkübasyonu sonucu yuvarlak, konveks, hafif kabarık, parlak ve krem renkli 20 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. Bu izolatların 8 tanesi referans suşa benzer şekilde, Gram-negatif karakterli, hareketli bakteriler olmaları, O/F glukoz testinde fermentatif özellik göstermeleri, O/129 vibriostat testine duyarlı olmaları ile genus düzeyinde *Listonella* genusuna mensup olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca izolatlar sitokrom oksidaz, katalaz, indol, β -galaktosidaz (ONPG) gibi testlere pozitif reaksiyon vermeleri yanı sıra yapılan diğer biyokimyasal özellikleri nedeniyle *L. anguillarum* olarak teşhis edilmiştir (Tablo 1).

Histolojik bulgular

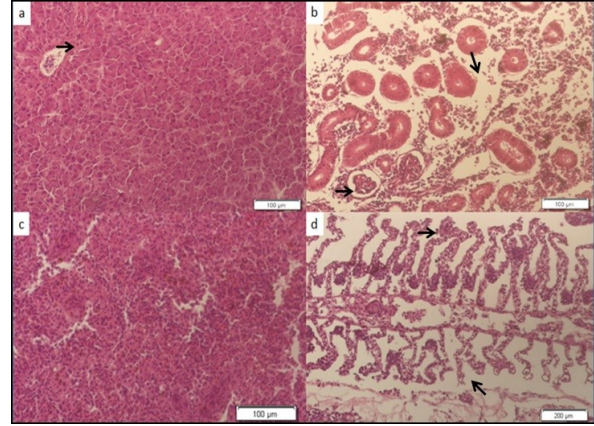
L. anguillarum ile enfekte çipura balıklarının karaciğer hücrelerinde vakuoler dejenerasyon, ve nekroz (Şekil 3a), böbrek dokusunda interstisyel alanda hücre ve matriks kaybı, böbrek tübül-lerinde dejenerasyon (Şekil 3b), dalak dokusunda nekroz (Şekil 3c) ve solungaç lamellalarının epitel hücrelerinde nekroz (Şekil 3d) ve solungaç lamellalarının



Şekil 3. (a) Hasta çipura balığının karaciğer hücrelerinde vakuoler dejenerasyon, (b) böbrek dokusunda interstisyel alanda hücre ve matriks kaybı (oklar), böbrek tübül-lerinde dejenerasyon (c) dalak dokusunda nekroz (d) solungaç lamellalarının epitel hücrelerinde nekroz (oklar).

epitel hücrelerinde nekroz dikkati çekmiştir (Şekil 3d).

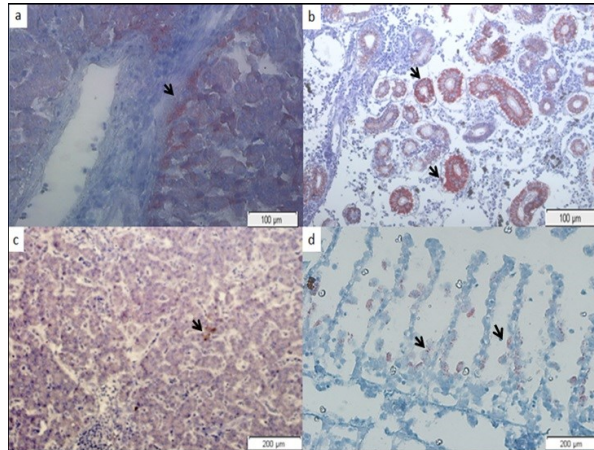
Hasta levrek balıklarının iç organlarının ve solungaçlarının histopatolojik incelemesinde karaciğerde küçük hemorajik odaklar (Şekil 4a), böbrek dokusunda interstisyel alanda hücre ve matriks kaybı, böbrek tübül-lerinde dejenerasyon, melanomakrofaj merkezlerinde hemosiderin depozitleri (Şekil 4b), dalak dokusunda nekroz (Şekil 4c) ve solungaç filamentlerinin yanı sıra solungaç lamellalarının epitel hücrelerinde nekroz tespit edilmiştir (Şekil 4d).



Şekil 4. (a) Levrek balıklarının karaciğerinde küçük hemorajik odaklar (okla gösterilmiştir) (b) böbrek dokusunda interstisyel alanda hücre ve matriks kaybı, periglomeruler ödem (oklar), böbrek tübül-lerinde dejenerasyon (okla gösterilmiştir), melanomakrofaj merkezlerinde hemosiderin depozitleri (c) dalak dokusunda nekroz (d) solungaç lamellalarında nekroz (oklar).

İmmunohistokimyasal bulgular

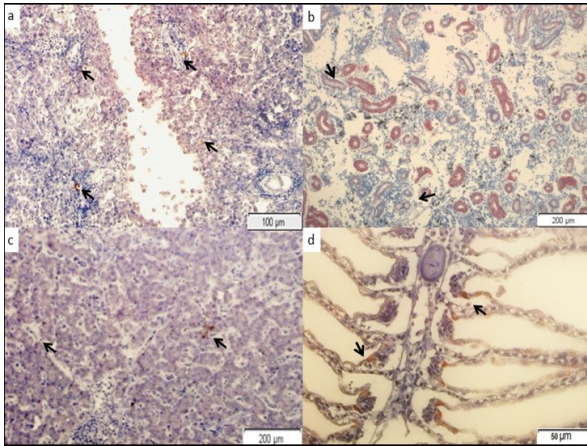
Çalışmada incelenen *V. anguillarum* ile enfekte çipura balıklarının solungaç ve iç organlarının immunohistokimyasal incelemesi sonucunda; karaciğerde bir arterin etrafındaki karaciğer hücrelerinde koyu kahverengi renkte boyanmış immun pozitif odaklar (Şekil 5a), böbrek tübül-lerinde (Şekil 5b), dalak dokusunda sinuslarda (Şekil 5c) ve solungaç filamentlerinde ve özellikle filament diplerinde immun pozitif alanlar görülmüş-tür (Şekil 5d).



Şekil 5. (a) Enfekte çipura balığının karaciğerinde arterin etrafındaki karaciğer hücrelerinde, (b) böbrek tübül-lerinde, (c) dalak dokusunda ve (d) solungaçlarda kahverengi renkte boyanmış immun pozitif odakların görünümü (oklar)

Hasta levrek balıklarının iç organlarının immunohistokimyasal incelemesi sonucunda; karaciğerde sinuzoidlerde, nekrotik alanlar içinde ve

damar etrafında (Şekil 6a), böbrekte tübüllerde (Şekil 6b), dalakta sinuslarda, damar kenarlarında ve nekrotik alanlarda (Şekil 6c), solungaç ve solungaç filamentlerinde antijen antikor birleşmesi sonucu oluşan kahverengi renkteki immun pozitif odaklar gözlenmiştir (Şekil 6d).



Şekil 6. (a) Hasta levrek balığının karaciğer dokusunun nekrotik alanlarında, sinuzoidlerinde ve damar etrafında, (b) böbrek dokusundaki tübüllerde, (c) dalak dokusunun sinuslarında ve (d) solungaçlarda kırmızı renge boyanmış immun pozitif alanlar (oklar)

Tartışma ve Sonuç

Vibrio anguillarum' un neden olduğu klasik vibriosis, deniz ve tatlı sularda yetiştiriciliği yapılan balıklarda yüksek mortalitelere neden olmaktadır (4,7,13,19). Bu çalışma ile Türkiye'de kültürü yapılan levrek ve çipura balığı işletmelerindeki vibriosisin klinik belirtilerini gösteren hasta balık örneklerinden *V. anguillarum* izole ve identifiye edilmiş ve bu patojenin balık dokularında sebep olduğu hasar histopatolojik olarak tespit edilmiş ve streptavidin-biotin boyama yöntemi kullanılarak etkenin immunohistokimyasal olarak teşhisi yapılmıştır.

Hasta levrek ve çipura balıklarının iç organlarının ve solungaçlarının histopatolojik yönden incelenmesi sonucunda diğer araştırmacılara benzer olarak karaciğerde küçük hemorajik odaklar, böbrek tübüllerinde dejenerasyon gibi bulgularda benzerlik gözlenmiştir (14,18). Enfekte çipura balık dokularının histopatolojik olarak incelenmesi sonucunda ise Korun ve Timur (14)'un bildirdiği gibi böbrek dokusunda interstisyel alanda hücre ve matris kaybı, böbrek tübüllerinde dejenerasyon, dalakta doku kaybı, yanı sıra solungaç lamellalarının yapısal düzeyinde bozulma tespit edilirken incelediğimiz *L. anguillarum* ile yapılan çalışmalarda daha çok

immunokimyasal yöntemlerden olan peroksidaz antiperoksidaz (4,8) ve avidine-biotin-alkaline fosfataz metodu kullanırken (11), Planas ve ark. (17) probiyotik özelliği olan *Roseobacter sp.*'nin kalkan balıklarında görülen *V. anguillarum* enfeksiyonunda enfekte balık dokuları üzerindeki etkisinin belirlenmesinde streptavidin-biotin tekniğini tercih etmişlerdir. Balıkların solungaçlarında yoğun antijen antikor birleşmesine bağlı olarak kahverengi renkte immun pozitif alanların görülmesi diğer araştırmacıların verileri ile benzerlik gösterirken (4,11), Laurencin ve Germon (15) tarafından belirtildiği gibi *L. anguillarum*'un solungaçları birincil giriş yolu olarak kullandığının göstergesi olabileceği düşünülmektedir.

Karaciğer dokularında immun pozitif alanların sinuzoidlerde, nekrotik alanlarda gözlenmesi diğer araştırmacıların hasta gökkuşuğu alabalığı (4) ve kalkan balıklarındaki (12) bulgularına benzerlik göstermesine rağmen bu çalışmada incelenen balıkların karaciğer dokularında özellikle arter etrafındaki hücrelerde yaygın immun pozitif alanlara rastlanılmıştır. Balıkların böbrek dokularında ise immun pozitif alanların daha önce yapılan araştırmaların sonuçlarına benzer şekilde sadece böbrek tübüllerinde yoğun olduğu tespit edilmiştir (4).

Dalak dokularında immunohistokimyasal incelemeler sonucunda levrek ve çipura balıklarının dalak kesitlerinde immun pozitif alanlar Avcı ve ark. (4)' nın yaptığı çalışmanın sonucuna benzer şekilde sinus ve nekrotik alanlarda tespit edilmiştir. Bu çalışmada daha önce yapılan çalışmalardan farklı olarak levrek balıklarına ait dalak dokularında damara yakın bölgelerde immun pozitif reaksiyonlara rastlanırken çipura balığına ait balık dokularında gözlenmemiştir. İki balık türüne ait dalak ve karaciğer dokularında damara yakın bölgelerde de immun pozitif alanlara rastlanması Grisez ve ark. (12)'nin belirttiği gibi bu bakterilerin bağırsağın lamina propria-sından kan yolu ile karaciğer ve diğer iç organlara taşındığının bir göstergesidir.

Sonuç olarak; bu çalışma ile *L. anguillarum*'un streptavidin-biotin yöntemi ile teşhisi levrek ve çipura balıklarının dokularında ilk kez yapılmış olup elde edilen verilerin bu yöntemin immun hassasiyetinin yüksek olması nedeniyle bu bakterinin tanısında güvenilirliğinin de yüksek olabileceğini göstermiştir. Dolayısı ile çalışmanın sonuçları *V. anguillarum* kaynaklı enfeksiyonların teşhisinde diğer immun yöntemlere göre daha yaygın kullanımının önünü açacaktır.

Kaynaklar

1. Afonso A, Gomes S, Silva J, Marques F, Henrique M. Side effects in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) due to intraperitoneal vaccination against vibriosis and pasteurellosis. *Fish Shellfish Immunol* 2005; 19 (1): 1-16.
2. Alpbaz A ed. Su Ürünleri Yetiştiriciliği. İkinci Baskı. Bornova-İzmir: Alp Yayınları, 2005; s. 576.
3. Austin B, Austin A. Vibrionaceae representatives. Austin B, Austin A. eds. In: *Bacterial Fish Pathogens: Diseased of Farmed and Wild Fish*. Third Edition. Chichester: Praxis Publ, 1999; pp. 369-89.
4. Avcı H, Birincioğlu S, Çağırğan H. Pathological and immunohistochemical investigations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) experimentally infected with *Vibrio anguillarum*. *Rev Med Vet* 2012; 163 (1): 31-9.
5. Bancroft JD ed. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Seventh Edition. Nottingham: Elsevier, 2008; p. 654.
6. Bergh O. Bacteria associated with early life stages of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., inhibit growth of a pathogenic *Vibrio* sp. *Fish Dis* 1995; 18(1): 31-9.
7. Buller NB, ed. *Bacteria from Fish and other Aquatic Animals: A practical Identification Manual*. UK: CABI Publishing, 2004; p. 361.
8. Chaves-Pozo E, Pelegrin P, Garcia-Ayala J, Garcia-Ayala A, Mulero V, Meseguer J. Acidophilic granulocytes of the marine fish gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.) produce interleukin-1b following infection with *Vibrio anguillarum*. *Cell Tissue Res* 2004; 316(2): 189-95.
9. Culling CFA. *Handbook of Histopathological Techniques*. Culling CFA ed. Second Edition. London: Butterworth Co Ltd, 1963; p. 683.
10. Çağırğan H. A study on diagnosis and treatment of bacterial diseases in cultured sea bass (*Sparus aurata* L.) and sea bream (*Dicentrarchus labrax* L.), Doktora tezi, Ege Üniv Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 1993; s. 117.
11. Engelsens AR, Sandlund N, Fiksdal IU, Bergh O. Immunohistochemistry of atlantic cod larvae *Gadus morhua* experimentally challenged with *Vibrio anguillarum*. *Dis Aqua Org* 2008; 80(1): 13-20.
12. Grisez L, Chair M, Sorgeloos P, Ollevier F. Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. *Dis Aqua Org* 1996; 26(3): 181-87.
13. Knappskog DH, Rødseth OM, Slinde E, Endersen C. Immunochemical analyses of *Vibrio anguillarum* strains isolated from cod, *Gadus morhua* L., suffering from vibriosis. *Fish Dis* 1993; 16(4): 327-38.
14. Korun J, Timur G. Marine vibrios associated with diseases sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *J Fishscicom* 2008; 2(1), 66-76.
15. Laurencin, FB, Germon E. Experimental infection of rainbow trout, *Salmo gairdneri* R., by dipping in suspension of *Vibrio anguillarum*: Ways of bacterial penetration; influence of temperature and salinity. *Aquaculture* 1987; 67 (1-2): 203-72.
16. Öztay F. The functional morphology of the pulmonary neuroendocrine cells in the lung of larval and adult *Rana ridibunda* (Amphibia-Anura). *IUFS J Biol* 2008; 67(2): 145-51.
17. Planas M, Perez-Lorenzo M, Hjelm M, Gram L, Fiksdal IU, Bergh O, Pintado J. Probiotic effect in vivo of *Roseobacter* strain 27-4 against *Vibrio (Listonella) anguillarum* infections in Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Aquaculture* 2006; 255(1-4): 323-33.
18. Timur G, Timur M. eds. *Balık Hastalıkları*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayını, 2003; s. 519.
19. Toranzo AE, Barj JL. A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Dis Aqua Org* 1990; 9 (1): 73-82.
20. Toranzo AE, Magarinos B, Romalde JL. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 2005; 246 (1-4): 31-67.

Sorumlu Yazar:

Prof. Dr. Tülay Akaylı
 İstanbul Üniversitesi, Su Bilimleri Fakültesi,
 Balık Hastalıkları Anabilim Dalı.
 İstanbul-TÜRKİYE
 Tel: +90 212 4555700 (Dahili: 16473)
 Fax: 0212-5140369
 E-posta: takayli@istanbul.edu.tr



Antibiotic Susceptibility of Motile *Aeromonas* spp. Isolated from Foods of Animal Origin and Water *

Fulya OCAK

Manisa Celal Bayar University, Faculty of Art and Letters, Department of Biology, Manisa-TURKEY

Summary: In this study, presence of motile *Aeromonas* spp. in different foods of animal origin and water by cultural method and detection to antibiotic susceptibilities of the isolates were investigated. A total of 224 food samples such as fish, chicken, fishery products, milk, meat and water supplied from points of sale like market and bazaar in and around Izmir have been examined. *Aeromonas* selective agar was used for *Aeromonas* spp. isolation. Gram-negative and oxidase positive colonies were assessed in Vitek 2 system (France) for identification. Of 224 food samples (meat, chicken, fish, fishery products, milk and water) 87 have been found to be positive for motile *Aeromonas* spp. According to the study, 51 (22.76%) of them were determined as *A. hydrophila*, 26 (11.6%) of them as *A. caviae* and 10 (4.6%) of them as *A. sobria*. Antibiotic susceptibility of *Aeromonas* isolates was determined according to the Kirby Bauer disk diffusion method. All *Aeromonas* spp. isolates have been found to be susceptible to imipenem and ciprofloxacin.

Key words: Antibacterial susceptibility, food, isolation, motile *Aeromonas* spp.

Hayvansal Gıdalardan ve Sudan İzole Edilen Hareketli *Aeromonas* Türlerinin Antibiyotik Duyarlılığı

Özet: Bu çalışmada hareketli *Aeromonas*'ların farklı hayvansal gıdalar ve sudaki varlığını ortaya koymak ve elde edilen izolatların antibiyotik duyarlılıklarının saptanması amaçlanmıştır. Çalışmada İzmir ve çevresindeki market ve pazar gibi faaliyet gösteren satış noktalarından tedarik edilen toplam 224 adet gıda (balık, balıkçılık ürünü kıyma, tavuk, süt ve su) örneği incelenmiştir. *Aeromonas* spp. izolasyonu için *Aeromonas* selektif agar kullanılmıştır. Gram-negatif, oksidaz pozitif koloniler, identifikasyon için Vitek 2 sistemi (Fransa) ile değerlendirilmiştir. İncelenen 224 gıda örneğinin 87'si hareketli *Aeromonas* spp. yönünden pozitif bulunmuştur. Örneklerin 51'inde (%22.76) *Aeromonas hydrophila*, 26'sında (%11.6) *Aeromonas caviae* ve 10'unda (% 4.46) *Aeromonas sobria* saptanmıştır. *Aeromonas* izolatlarının antibiyotik duyarlılığı Kirby Bauer disk difüzyon metodu ile belirlenmiştir. Tüm izolatlar, imipenem ve siprofloksasine duyarlı bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Antibakteriyel duyarlılık, gıda, izolasyon, hareketli *Aeromonas* spp.

Introduction

Motile *Aeromonas* spp. exists in the environment especially in marine water, drinking water, fresh and brackish water (10). The reason for defining the motile *Aeromonas* spp. as food pathogens is that they exist widely in the environment (7). Since they have psychrophilic structures, they can reproduce in the foods kept at 4°C, and pose a potential danger for human health (3,5,13). *Aeromonas* spp. have a number of different putative virulence factors such as enterotoxins, haemolysin or cytotoxins and antibiotic resistance to some antibiotics (3,11,13), and are responsible for intestinal and extraintes-

tinal infections in humans (13).

Aquatic environment plays an important role in the dissemination of *Aeromonas* spp., while fish and seafood, raw and cooked meat, chicken, vegetables, and milk can be potential carriers for human and animal infections (13).

This study was conducted both to determine the existence of motile *Aeromonas* spp. in foods of animal origin and in water by a cultural method and to reveal the antibiotic susceptibilities of the isolates.

Material and Methods

Standard strain

Standard *Aeromonas hydrophila* ATCC 7512 strain was obtained from the Bornova Veterinary Control Institute, Culture Collection.

Isolation of *Aeromonas* spp. from the samples

Each sample was subjected to bacteriological

Geliş Tarihi/Submission Date : 22.11.2016

Kabul Tarihi/Accepted Date : 07.11.2017

*The study was supported by Scientific Research Project Office of Manisa Celal Bayar University, the Project number is 2010-086.

examination under aseptic conditions. Twenty grams were taken from the samples and placed in sterile sample bags, 225 ml alkaline peptone water was added, and homogenized in stomacher for 2 minutes, and then were left for incubation at 28°C for 18-24 hours. A loopful of the enrichment culture was streaked onto *Aeromonas* Agar (Oxoid, CM0833A, England) used with Ampicillin Selective Supplement (Oxoid, SR0136, England) and the inoculated plates incubated at 28°C for 18-24 hours. After the incubation, the colonies that reproduced in the plates in the form of green, and the button-green colonies in their middle parts were accepted as suspected *Aeromonas* spp. The colonies were plated on the nutrient agar with needle-point loop in the form of single colony, and incubated at 30°C for 24 hours. The Gram-negative and oxidase positive colonies were assessed in the Vitek 2 device for identification (Vitek 2 system-France) (2).

cin (5 mcg), vancomycin (30 mcg), cefuroxime (30 mcg), imipenem (10 mcg), chloramphenicol (30 mcg), tobramycin (10 mcg), ciprofloxacin (10 mcg) antibiotic disks (Oxoid, England) were placed.

After the disks were placed, the agars were taken to an incubator and incubated at 37°C for 18-24 hours. Then, the zone diameters were measured.

Results

In this study, 224 different food samples supplied from the points of sale like market in and around Izmir have been investigated.

Eighty-seven (87%) of the 224 food samples including 46 fish, 25 shrimps, 30 mussels, 43 chickens, 35 minced meat samples, 25 milk and 20 water samples have been found to be positive in terms of motile *Aeromonas* spp. Fifty one (22.76%) of these were observed to have *Aeromonas hydrophila*, 26 (11.6%) to have *Aeromonas caviae*, 10 (4.46%) to have *Aeromonas sobria* (Table 1).

Table 1. The prevalence and distribution of motile *Aeromonas* spp. in various food samples

	Examined Food Samples (n)	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. sobria</i>
Fish	46	15 (32.6%)	9 (19.56%)	3 (6.5%)
Mussel	30	9 (30%)	5 (16.6%)	2 (6.6%)
Shrimp	25	8 (32%)	3 (12%)	1 (4%)
Meat	35	5 (14.2%)	3 (8.5%)	1 (2.85%)
Chicken	43	6 (13.9%)	3 (6.9%)	2 (4.6%)
Milk	25	5 (20%)	3 (12%)	1 (4%)
Water	20	3 (15%)	-	-

n=number of samples

Antibiotic Susceptibility Testing

The antibiotic susceptibility of *Aeromonas* isolates was determined according to the Disk Diffusion Method. They were taken from the liquid culture with a 0.1 ml sterile pipette, and was spread on Muller Hinton Agar (Oxoid, CM0337, England) with a glass rod, In order to determine the antibiotic susceptibility of the isolates, erythromycin (15 mcg), streptomycin (10 mcg), gentamicin (30 mcg), amikacin (30 mcg), tetracycline (10 mcg), ampicillin (25 mcg), cephalothin (30 mcg), amoxicillin 20 mcg/clavulanic acid 10 mcg (30 mcg), trimethoprim 1.25 mcg/sulfamethoxazole 23.75 mcg (25 mcg), ofloxa-

The antibiotic susceptibility of 87 *Aeromonas* spp. isolates obtained in the study has been determined according to the disk diffusion method. The zone diameters of the inhibitions have been measured with caliper cage in mm. In this context, it has been observed that 51 *A. hydrophila* species were susceptible to amoxicillin clavulanic acid, ciprofloxacin and imipenem at a rate of 100%, and 81% of the strains were determined to be resistant to erythromycin, 85.4% of the strains were determined to be resistant to vancomycin, trimethoprim/sulfamethoxazole at a rate of 64.1%, respectively. Moreover, the 26 *Aeromonas caviae* isolates were susceptible to

imipenem, amikacin and ciprofloxacin at a rate of 100%; 88.6% of the isolates were determined to be resistant to erythromycin; 76.5% were determined to be resistant to vancomycin; 41% were detected to be resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole; 21.5% were detected to be resistant to amoxicillin clavulanic acid and chloramphenicol; 10.9% were detected to be resistant to gentamicin and tetracycline. It was determined that the 10 *A. sobria* isolates had susceptibility to ciprofloxacin and amikacin at a rate of 100%, ampicillin and trimethoprim/sulfamethoxazole at a rate of 66.5%, and 90% were seen as resistant to streptomycin. The antibacterial susceptibility testing results of *Aeromonas* spp. isolates against antibiotics are given in Table 2.

the risk of infection in humans. Especially the fish, mussels, shrimps, living in sea and consumed as food by humans are contaminated with the pathogen bacteria that blend in the sea water together with waste water and pose an important threat for public health.

These examinations were conducted to detect the existence of motile *Aeromonas* spp. which contaminates the products especially food products in a cultural manner, and to reveal the antibiotic susceptibilities of the *Aeromonas* spp.

The frequency of existence and the antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in fish in Malaysia were investigated in 2003 (8). The researchers studied a total of 87 fish samples, and *Aeromonas* spp. were found in 69% of the samples. In the study, a total of 87 fish were used and

Table 2. Antibacterial susceptibility testing results of *Aeromonas* spp. isolated from food samples

Antibiotics	<i>A. hydrophila</i> (n=51)			<i>A. caviae</i> (n= 26)			<i>A. sobria</i> (n=10)		
	R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)
Amikacin	2.4	18.5	79.1	-	-	100	-	-	100
Amoxicillin/ clavulanic acid	-	-	100	21.5	-	78.5	7.1	-	92.9
Ampicilin	28.6	7.1	21.5	12.4	12.4	75.2	66.5	-	33.5
Cefuroxime	14.3	21.4	64.3	-	-	100	11.6	-	88.4
Ciprofloxacin	-	-	100	-	-	100	-	-	100
Erythromycin	81.9	-	18.1	81.00	-	19.00	82.7	-	17.3
Gentamycin	34.6	7.8	57.6	10.9	11	78.1	32.5	-	67.5
Imipenem	-	-	100	-	-	100	4.4	-	95.6
Chloramphenicol	9.9	-	90.1	21.5	-	78.5	13.3	-	84.7
Cephalotine	85.8	7.1	7.1	66.7	-	33.3	83.3	-	16.7
Streptomycine	9	10.5	80.5	-	-	100	90	-	10
Tetracyline	8.3	11.4	80.3	10.9	18.9	70.2	-	16.7	83.3
Tobramycin	35.7	14.3	50	22.2	-	77.8	14.6	-	85.4
Trimethoprim/ sulfamethoxazole	64.1	14.4	21.5	41.00	-	59.00	66.5	-	33.5
Vancomycin	85.4	7.3	7.3	76.5	-	23.5	85.4	-	14.6
Ofloxacin	92.9	7.1	-	88.4	11.6	-	88.2	11.8	-

n=number of isolates

Discussion and Conclusion

The existence of motile *Aeromonas* spp. in healthy animals and in drinking water increases

sixty nine percent of the samples have been found positive for *Aeromonas* spp. *Aeromonas* isolates were defined as *A. sobria*, *A. hydrophila*,

and *A.caviae* at the rates of 55%, 11.5% and 2.3% respectively. All the isolates were found to be resistant to ampicillin, and susceptible to ceftazidime (8). Eighty-two *Aeromonas* spp. isolates were defined in 250 frozen fish samples in biochemical and genetic terms in Mexico (4). In a previous study, antibiotic susceptibility of 57 *Aeromonas* spp. isolates, which were isolated from different foods and water samples, were examined, and the majority of the isolates were found to be resistant to erythromycin, and susceptible to tetracycline, nitrofurantoin, chloramphenicol, quinolone and aminoglycosides (amikacin, gentamicin, tobramycin) (1). Sratev et al. (12) conducted different studies on *A.hydrophila* isolated from milk, dairy products, meat, meat products and vegetables, and reported that it was an opportunistic pathogen, and was resistant to commercial antibiotics. The existence of *A.hydrophila* in foods and its antibiotic resistance pose a threat for public health and for the health of living organisms in aquatic environments (12).

The reason of motile *Aeromonas* spp. for becoming more important in recent years is that their various virulence factors have been defined, and it has been understood better that these virulent factors lead to enteropathogenic. These factors are hemolysins, enterotoxins and cytotoxins (11).

In a study conducted in Ankara in 2006, it was detected that the *A.hydrophila* strains that were obtained from chicken and meat doner kebab samples were susceptible to gentamicin, chloramphenicol, tetracycline, cephalothin and chloramphenicol at a rate of 100%, and resistant to ampicillin and vancomycin at a rate of 100% (14).

In the present study, the *Aeromonas* spp. Isolates have been found to be susceptible to imipenem and ciprofloxacin at a rate of 100%. It has been reported that *Aeromonas* spp. may sustain their lives even in refrigerator temperatures because they are psychotropic. The selection of proper antibiotics is important for the treatment of the diseases caused by the bacteria. The antibiotic resistance of motile *Aeromonas* spp. must be handled with care because of these characteristics. One of the most important infection sources is the water contaminated with motile *Aeromonas* species. In order to prevent this, hygienic rules must be strictly followed, and some precautions must be taken

in the stages from food production to consumption.

With this study, the antibiotic susceptibility of motile *Aeromonas* spp. was investigated. The motile *Aeromonas* spp. are considered as opportunistic pathogens for humans and are isolated especially from fish, sea products, and various foods that are used for human consumption. The selection of proper antibiotic is important in terms of gastrointestinal infections stemming from food, contaminated by the bacteria.

References

1. Awan BM, Maqbool A, Bari A, Krovacecek K. Antibiotic susceptibility profile of *Aeromonas* spp. isolates from food in Abu Dhabi, United Arab Emirates. *New Microbiol* 2009; 32(1): 17-23.
2. Biomerieux, Vitek 2 Technology. Online software user manual, 510773-3EN1, Marcy l'etoile, France, 05/2006.
3. Daskalov H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control* 2006; 17(6): 474-83.
4. Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernandez-Rendon E, Aparicio GO, Guarro J, Chacon MR. Characterisation of *Aeromonas* sp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int J Food Microbiol* 2003; 84(1): 41-9.
5. Gobat PT, Jemmi T. Distribution of mesophilic *Aeromonas* in raw and ready-to-eat fish and meat products in Switzerland. *Int J Food Microbiol* 1993; 20(2):117-20.
6. Gonzalez-Rodrigues MN, Santos JA, Otero A, Garcia-Lopez ML. PCR detection of potentially pathogenic *Aeromonad* in raw an cold-smoked freshwater fish. *J Appl Microbiol* 2002; 93(4): 675-80.
7. Neyts K, Huys G, Uytendaele M, Swings J, Debevere J. Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp from retail foods. *Lett Appl Microbiol* 2000; 31(5): 359-63.
8. Radu S, Ahmad N, Ling FH, Reezal A. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malasia. *Int J Food Microbiol* 2003; 81(3): 261-6.
9. Santos Y, Toranzo AE, Barja JL, Nieto TP, Villa TG. Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish. *Infect Immun* 1988; 56(12):

- 3285-93.
10. Sechi LA, Deriu A, Falchi MP, Fadda G, Zanetti S. Distribution of virulence genes in *Aeromonas* sp. isolated from Sardinian waters and from patients with diarrhoea. J Appl Microbiol 2002; 92(2): 221-7.
 11. Seethalakshmi I, Subashkumar R, Saminathan P. Distribution of putative virulence genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida* isolated from marketed fish samples. J Fish Aquat Sci 2008; 3(2) 145-51.
 12. Stratev D, Odeyemi OA. Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review. J Infect Public Health 2016; 9(5): 535-44.
 13. Praveen K, Debnath H, Shekhar S, Dalai N, Ganguly S. Incidence of *Aeromonas* spp. infection in fish and chicken meat and its related public health hazard: A review. Vet World 2016; 9(1): 6-11.
 14. Topçu S. Ankara'da satışa sunulan döner kebab çeşitlerinden *L. monocytogenes* *S.aureus* *A. hydrophila* izolasyonu ve çeşitli antibiyotik dirençlilikleri Yüksek Lisans Tezi, Gazi Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2003; p. 1-40.

Corresponding Author:

Asst. Prof. Dr. Fulya OCAK
Manisa Celal Bayar University,
Faculty of Science and Letters
Manisa-TURKEY
Tel: +90 236 2013281/3281
E-mail: fulyaocak@hotmail.com



The Effect of Thyme Essential Oil Added to Quail Diets on Antioxidative Metabolism in Breast Meat*

Recep GÜMÜŞ¹, Nazlı ERCAN², Halit İMİK³

¹University of Cumhuriyet, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Disorders, Sivas- TURKEY

²University of Cumhuriyet, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry Sivas- TURKEY

³ University of Ataturk, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Disorders, Erzurum-TURKEY.

Summary: This study was conducted to determine the effect of diets containing different levels of thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) on antioxidative metabolism in breast meat of quails. A total of 200 sixteen-day-old Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) were used in this study. Animals were divided into four groups with five replicates of 10 animals each; control group was fed only basal diet but 150, 300 and 450 mg/kg thyme essential oil were added to diet of groups thyme 1, thyme 2 and thyme 3, respectively. At the end of the study, ten quails were selected randomly from every group and decapitated. The analyses were made on their breast meat. In thyme groups, glutathione peroxidase (GSH-Px) activity was significantly higher than the control group (P<0.05). However, the superoxide dismutase (SOD) activity was significantly higher only in group thyme 2 (P<0.05). It was determined that the level of malondialdehyde (MDA) decreased in the thyme 1 and thyme 3 groups (P<0.05). Among all groups, catalase (CAT) activity did not differ. In conclusion, thyme essential oil had a significant effect on the antioxidant metabolism in breast meat.

Key words: Antioxidant metabolism, breast meat, quail, thyme essential oil

Bıldırcın Rasyonlarına Katılan Kekik Esansiyel Yağının Göğüs Etinde Antioksidan Metabolizma Üzerine Etkisi

Özet: Bu çalışmada, bıldırcın rasyonuna katılan farklı miktarlardaki kekik esansiyel yağının göğüs etinde antioksidan metabolizma üzerine etkisi araştırıldı. Çalışmada toplam 200 adet 16 günlük yaşta Japon bıldırcını (*Coturnix coturnix japonica*) kullanıldı. Hayvanlar, kontrol, kekik 1, kekik 2 ve kekik 3 olmak üzere dört gruba, her grup ta her birinde 10 hayvan olacak şekilde beş alt gruba ayrıldı. Gruplara sırasıyla bazal rasyona ilave olarak 0, 150, 300 ve 450 mg/kg kekik esansiyel yağı katıldı. Çalışmanın sonunda her gruptan rastgele seçilen 10 adet bıldırcın kesilerek göğüs etinde analiz yapıldı. Kekik esansiyel yağı uygulanan gruplarda Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi kontrol grubuna göre önemli oranda yüksek bulundu (P<0.05). Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin sadece kekik 2 grubunda yüksek olduğu belirlendi (P<0.05). Malondialdehit (MDA) seviyesinin kekik 1 ve kekik 3 gruplarında önemli oranda azaldığı belirlendi (P<0.05). Gruplar arasında katalaz (CAT) aktivitesi yönünden fark bulunmadı. Sonuç olarak kekik esansiyel yağının göğüs etinde antioksidan metabolizma üzerine önemli etkisinin olduğu görüldü.

Anahtar kelimeler: Antioksidan metabolizma, bıldırcın, göğüs eti, kekik esansiyel yağı

Introduction

Upon surfacing the fact that synthetic additives used as feed preservation have harmful effects, natural additives have gained popularity in recent years (13). It was discovered that the essential oils and extracts of the plants prevent

the microorganism that cause diseases from residing in the digestion systems in addition to increasing the effects of the digestive enzymes and strengthening the antioxidant metabolism (19). One of the above mentioned natural/herbal additives is thyme plant which and whose products can be used as feed additives in feeding animals (9,19).

Thymus vulgaris belongs to the *Lamiaceae* family and has plenty of phenolic components primarily thymol and carvacrol with antioxidant activities (8). It was revealed that these components manifest their antioxidant effect by eliminating free radicals and preventing the for-

Geliş Tarihi/Submission Date : 25.05.2017

Kabul Tarihi/Accepted Date : 07.11.2017

*This work is supported by the Scientific Research Project Fund of Cumhuriyet University under the project number 'V-026'. This study was presented in International Symposium on Advances in Lamiaceae Science, April 26-29, 2017, Antalya, Turkey

mation of chelates formed by metal ions (14). The study carried out showed that thyme essential oil significantly decreases lipid oxidation in meat (24). Thyme was also found out to have various biological effects such as antibacterial, anti-inflammatory and immunity booster in addition to its antioxidant effects (6).

In this study, the effects of thyme essential oil which is added to quail ration at different amounts upon the malondialdehyde (MDA) levels, a lipid peroxidation product, as well as upon catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), the antioxidant metabolism enzymes were investigated.

13.02.2015. The animals were hosted in Cumhuriyet University Faculty of Veterinary Medicine Department of Research and Implementation throughout their feeding trial period which lasted 35 days. Two hundred Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) of 16 days old were used as the materials of the study. The study was designed to consist of four groups as control, thyme 1, thyme 2 and thyme 3. In addition to basal ration, the groups were given 0,150,300 and 450 mg/kg thyme essential oil respectively (Thyme oil[®], Çiftçizade Herbal Products Ltd. Antalya/Turkey) (Table 1).

Each group was divided into five subgroups

Table 1. Formulation and analysis of the basal diet (%)

Contents	Groups			
	Control	Thyme1	Thyme2	Thyme3
Maize	58.740	58.740	58.740	58.740
Maize gluten	20.000	20.000	20.000	20.000
Wheat bran	7.000	6.985	6.970	6.955
Soybean oil	3.720	3.720	3.720	3.720
Soybean meal	7.140	7.140	7.140	7.140
Calcium carbonate	1.230	1.230	1.230	1.230
Dicalcium phosphate	0.910	0.910	0.910	0.910
L-lysine	0.420	0.420	0.420	0.420
Sodium chloride	0.270	0.270	0.270	0.270
Vitamin-mineral premix**	0.200	0.200	0.200	0.200
Toxin binder	0.100	0.100	0.100	0.100
Coccidiostat	0.100	0.100	0.100	0.100
Sodium bicarbonate	0.090	0.090	0.090	0.090
DL-Methionine	0.050	0.050	0.050	0.050
Phyzyme XP TPT	0.030	0.030	0.030	0.030
Thyme oil*	-	0.015	0.030	0.045
Calculated nutrient contents				
Metabolisable energy (MJ/kg)	13.400	13.400	13.400	13.400
Crude protein %	21.000	21.000	21.000	21.000

*the thyme essential oil was added in place of wheat bran.

**the vitamin-mineral premix provides the following (per kg): all-rac- α -tocopherol acetate 1.25 mg; all-transretinyl acetate 1.8 mg; thiamine (thiamine mononitrate) 1.1 mg; menadione sodium bisulphate 1.1 mg; Ca-pantothenate 10 mg; vitamin B12 0.02 mg; choline chloride 175 mg; niacin 35 mg; manganese (from manganese oxide) 40 mg; vitamin B6 2.2 mg; folic acid 0.55 mg; iron (from iron sulphate) 12.5 mg; iodine (from potassium iodide) 0.3 mg; copper (from copper sulphate) 3.5 mg; riboflavin 4.4 mg; d-biotin 0.1 mg; zinc (from zinc oxide) 25 mg; selenium (from sodium selenite) 0.15 mg.

Material and Method

Animals, trial design and feed

This study was carried out with the permission of Cumhuriyet University, Animal Experiments Local Ethics Board numbered 15 and dated

(with 10 quails in each subgroup). Each subgroup was hosted in cages with 100×45×20 cm sizes. Feed and water were provided *ad libitum*. Throughout the study animals were provided with thermal comfort (24°C) and 23 hours of

lightness and 1 hour of darkness daily. The rations of the animals were formulized in compliance with the national research council (16) recommendations and chemical analysis were carried out in line with official methods of analysis (3).

Biochemical analysis

At the end of the experiment (age 51 days), 10 randomly selected quails from each group were cut in the appropriate medium and the breast meats was removed. The breast meats were homogenized using liquid nitrogen and homogenization buffer was added after the liquid nitrogen flow was expected. The samples were homogenized via a tissue homogenizer (Bioprep24, Allsheng). The homogenized samples were centrifuged prior to 2500 g for 10 min +4°C and then for 12 min at 20.000 g +4°C of supernatant. The supernatant was then stored at -80°C until the day of the biochemical analysis.

1. Determination of lipid peroxidation (LP) by MDA

For measuring MDA levels, the method put forward as described (25) was used. Dilutions in amount of 10,5,2.5,1.25 and 0.625 µmol/L were prepared out of 20 µmol/L standard solution. Samples amount of 0.5 mL were put into test tubes while 0.5 standard dilutions were put into standard tubes. Amount of 3 mL of TCA of 20% was added into blank tube while for other tubes this amount was 2.5 mL. Upon adding 1 ml of TBA into each tubes, the tubes were closed and incubated for 30 minutes in water baths of 95°C. After the incubation all the tubes were cooled in ice bath and then centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes with 4 ml n-butanol added into each. N-butanol layer absorbance was seen in 535 nm.

2. Determination of SOD activity

The method developed as described was used for the determination of superoxide dismutase (SOD) activity in the meats taken from the quails (23). The principle of the method, is to compose formazan by reducing the colorants, such as nitro blue tetrazolium (NBT), that are formed during the oxidation of xanthine oxidase (XO) with xanthine. At the presence of SOD, which allows the dismutation of superoxide anion's to H₂O₂ by consuming the O₂ produced by XO reaction, the amount of O₂ that would react with NBT will decrease and the formation of formazan would be prevented. SOD activity of a reaction catalyzed by XO was measured depending on the degree of inhibition of NBT re-

duction. The formed NBT is based on the spectrophotometric measure of the absorbance of the color at 560 nm.

3. Determination of CAT activity

Catalase activity was calculated using method as described (1). Amount of 50 mM phosphate buffer with pH 7.0 was prepared; also 30 mM hydrogen peroxide solution was prepared. And then 1mL H₂O₂ was added to 2 mL sample whereas 1mL phosphate buffer was added to the formed solution and measurements were made at 230 nm.

4. Determination of GSH-Px activity

Glutathione is a chemical substance with tripeptide structure and it is mostly found in animals. Glutathione is an important molecule that acts as an electron donor for enzyme glutathione peroxidase, which is used in the detoxification of harmful molecules in biochemical metabolism. Catalytic activity detection was performed according to the method (17). The decrease of NADPH's absorbance was monitored at 340 nm and determined kinetically.

Statistical analysis

The output data were evaluated by using SPSS 20 statistical package program (22). In order to identify whether there is a statistical difference or not between antioxidant parameter data, one-way analysis of variance (ANOVA) was made. For paired comparisons Duncan's multiple range test was applied (P<0.05).

Results

The analyses were made on their breast meat. In thyme groups, GSH-Px activity was significantly higher than the group of control (P<0.05). However, the SOD activity was significantly higher in only group thyme 2 (P<0.05). It was determined that the level of MDA decreased in the thyme 1 and thyme 3 groups (P<0.05). The all groups did not differ for CAT activity (Table 2).

Discussion and Conclusion

So far synthetic antioxidants have been used as preservers in feed industry; yet with the recent developments showing the harmful effects of those, natural agents/products have started to appear on shelves. It was stated that there is a positive relation between the phenolic compounds within the plants used for this purpose and antioxidant activity and that polyphenol compounds that thyme plant includes prevent the formation of free radicals (24).

Superoxide radical is one of the free radicals mostly responsible from the oxidative damage

Table 2. The effects of thyme essential oil in quail ration on antioxidant metabolism in breast meat

Parameters	Groups				p Value
	Control	Thyme 1	Thyme 2	Thyme 3	
SOD, U/g pro	69.309±2.71 ^b	73.182±1.24 ^{ab}	77.227±1.82 ^a	72.346±1.84 ^{ab}	0.032
GSH-Px, U/g pro	40.318±11.76 ^b	120.079±25.67 ^a	161.111±33.22 ^a	171.27±33.23 ^a	0.021
CAT, U/mg pro	0.066±0.01	0.059±0.02	0.040±0.01	0.058±0.02	0.642
MDA nmol/g	12.69±2.27 ^a	6.90±0.68 ^b	8.22±1.97 ^{ab}	5.87±0.82 ^b	0.030

All values are given as mean ± standard error of mean (SEM), ns: not significant ($p > 0.05$).

^{a, b}: A letter in the same line means significantly different (*: $p < 0.05$),

Control: basal ration alone, thyme1: basal ration+150 mg/kg of thyme essential oil, thyme 2: basal ration+300 mg/kg of thyme essential oil, thyme 3: basal ration+450 mg/kg of thyme essential oil. CAT; catalase, SOD; superoxide dismutase, GSH-Px; glutathione peroxidase, MDA; malondialdehyde

and SOD enzyme catalyzes this radical to convert into hydrogen peroxide and molecular oxygen (7). It was highlighted that under various stress conditions radical formation is accelerated and thus SOD activity might be more effective in fending these radicals off the environment (4,21). This study found out that the thyme essential oil of 300 mg/kg added to the ration increased SOD activity, while other dosages did not have any such effect. Similarly, it was also stated that thymol+carvacrol in 60, 100 and 200 mg/kg dosages did not have any effect upon the SOD activity in thigh and breast meat (12). Gümüş et al. (10) reported that essential oil at doses of 100, 300 and 450 mg/kg increased the activity of SOD in quail the liver, but not for serum levels (10). In this study, only 300 mg/kg dose significantly increased SOD activity and but doses of 150 and 450 mg/kg because of like low dose of thyme essential oil to high level of essential oil did not have the positive effect.

Glutathione, consisting an important part of the antioxidant defense system is the substrate of the GSH-Px enzyme and the changes in GSH level under oxidative stress were suggested to have an effect upon this enzyme (11). The studies carried out on broiler revealed that thymol and carvacrol positively affect the GSH-Px activity in serum under oxidative stress (20). This study also put forward that 150, 300 and 450 mg/kg thyme essential oil significantly increased the activity of GSH-Px enzyme in breast meat when compared to the control group. In addition to these results, 200 and 400 mg/kg thymol added onto broiler rations were discovered to raise GSH levels both in thigh and breast meats significantly (26). In their studies on broiler Hashemipour et al. (12) also reported that thymol+carvacrol added into ration increased GSH-Px activity in thigh meat yet had no effect upon

breast meat (12).

Lipid peroxidation is a reaction process which starts with the oxidation of poly unsaturated fatty acids with radicals and continues with auto-catalytic chain reactions causing overall damage in most biological structures (5). One of the most outstanding results of this study is that in thyme1 and thyme2 groups intervened with thyme essential oil, MDA level which is a marker of lipid peroxidation significantly decreased when compared with the control group. Gümüş et al (9) reported that oregano essential oil at doses of 200 and 400 mg/kg significantly reduced the level of LPO in the muscles but only lowered the level of LPO 200 mg/kg in serum levels and that 400 mg/kg dose didn't differ of LPO. Similar to these results, in this study it can be said that statistically not affecting the MDA level of 300 mg/kg thyme essential oil dose although in a numerical lower. It may be due to the fact that there is no linear ratio between the effect and doses of thyme essential oil applied. Another study (26) affirmed that 200 and 400 mg/kg thymol added to the ration decreased the MDA levels significantly in breast and thigh meats. Similarly, thyme powder of 0.5% dosage added to the broiler ration was found to decrease the MDA level in thigh meat significantly (18). On the other hand, it was also found out that thymol+carvacrol of 60,100 and 200mg/kg added to the broiler ration did not have any effect upon the MDA levels in thigh and breast meats (12); for rabbits 3% of thyme powder added to the ration did not have any effect upon the MDA levels in plasma (15).

Catalase is an enzyme which can be found in all live cell types at different concentrations with antioxidant effect and it breaks the hydrogen peroxide of free radicals down into molecular oxygen and water (2). Studies carried out on

lambs proved that oregano essential oil added to the ration significantly increased CAT activity in liver and meat tissues (9). Contrary to these findings, this study found no effect of thyme essential oil added to the ration upon CAT enzyme activity.

To conclude, thyme essential oil added to the quail ration was shown to have a clear effect upon GSH-Px enzyme which has an active role on the metabolism and to have a limited effect upon SOD while having no effect upon CAT activity at all. Thyme essential oil was also seen to have effects upon antioxidant enzymes and significantly decreased MDA level, marker of the oxidation in the meats. The results of this study can contribute to further studies in showing that thyme essential oil has clear effects upon antioxidant metabolism.

References

1. Aebi HE. Catalase in vitro. *Method Enzymol* 1984; 105: 121-6.
2. Amorim AM, Qasques MGM, Andreus J, Scharf M. The application of catalase for the elimination of hydrogen peroxide residues after bleaching of cotton fabrics. *An Acad Bras Ciênc* 2002; 74(3): 433-36.
3. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Fifteenth Edition.* Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists, 1990; pp. 69-88.
4. Back P, Matthijssens F, Vlaeminck C, Braeckman BP, Vanfleteren JR. Effects of sod gene over expression and deletion mutation on the expression profiles of reporter genes of major detoxification pathways in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol* 2010; 45(7): 603-10.
5. Davies KJ, Goldberg AL. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J Biol Chem* 1987; 262(17): 8220-6.
6. Dhama K, Latheef SK, Saminathan M, Samad HA, Karthik K, Tiwari R, Khan RU, Alagawany M, Farag MR, Gazi MA, Laudadio V, Tufarelli V. Multiple beneficial applications and modes of action of herbs in poultry health and production: A review. *Int J Pharm* 2015; 11(3): 152-76.
7. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64(1): 97-112.
8. Grigore A, Paraschiv I, Colceru S, Buebuanu C, Draghici E, Ichim M. Chemical composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris L.* volatile oil obtained by two different methods. *Rom Biotechnol Lett* 2010; 15(4): 5436-43.
9. Gümüş R, Erol HS, İmik H, Halıcı M. The effects of the supplementation of lamb rations with oregano essential oil on the performance, some blood parameters and antioxidant metabolism in meat and liver meats. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2017; 23(3): 395-401.
10. Gumus R, Ercan, N, Imik H. The effect of thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) added to quail diets on performance, some blood parameters, and the antioxidative metabolism of the serum and liver tissues. *Rev Bras Cienc Avic* 2017; 19(2): 297-304.
11. Halıcı M, İmik H, Koç M, Gümüş R. Effects of α -lipoic acid, vitamins E and C upon the heat stress in Japanese quails. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2012; 96(3): 408-15.
12. Hashemipour H, Kermanshah H, Golian A, Veldkamp T. Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. *Poult Sci* 2013; 92(8): 2059-69.
13. Huyghebaert G, Ducatelle R, Van Immerseel F. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Vet J* 2011; 187(2):182-8.
14. Khan RU, Naz S, Nikousefat Z, Tufarelli V, Laudadio V. *Thymus vulgaris*: alternative to antibiotics in poultry feed. *Worlds Poult Sci J* 2012; 68(03): 401-8.
15. Kovács M, Tuboly T, Mézes M, Balogh K, Gerencsér Z, Matics Z, Milisits G. Effect of dietary supplementation of spirulina (*Arthrospira Platensis*) and thyme (*Thymus vulgaris*) on serum biochemistry, immune response and antioxidant status of rabbits. *Ann Anim Sci* 2016; 16(1): 181-95.
16. National Research Council (NRC). *Poultry in Effect of Environment on Nutrient Requirements of Domestic Animals.* National Academy Press, Washington, DC, 1981; p:109–34.
17. Paglie DE, Valantine WN. Studies on qualitative and quantitative characterization of

- erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Met 1967; 7(70): 158-69.
18. Pirmohammadi A, Daneshyar M, Farhoomand P, Aliakbarlu J, Hamian F. Effects of *Thyme vulgaris* and *Mentha pulegium* on colour, nutrients and peroxidation of meat in heat-stressed broilers. S Afr J Anim Sci 2016; 46(3): 278-84.
 19. Popović S, Puvaca N, Kostadinovic L, Dzinic N, Bosnjak J, Vasiljevic M, Djuragic O. Effects of dietary essential oils on productive performance, blood lipid profile, enzyme activity and immunological response of broiler chickens. Eur Poult Sci 2016; 80: 1-12.
 20. Saadat SH, Mazhari M, Esmaeilipour O, Khosravinia H. Effects of thymol and carvacrol on productive performance, antioxidant enzyme activity and certain blood metabolites in heat stressed broilers. IJAS 2016; 6(1):195-202.
 21. Sathiyaraj G, Lee OR, Parvin S, Khorolragchaa A, Kim YJ, Yang DC. Transcript profiling of antioxidant genes during biotic and abiotic stresses in *Panax ginseng* CA Meyer. Mol Biol Rep 2011; 38(4): 2761-9.
 22. SPSS. Statistical Packages for the Social Sciences. Twentieth Edition. Chicago: IBM Inc., 2011.
 23. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 1998; 34(3): 497-500.
 24. Yesilbag D, Gezen SS, Biricik H, Bulbul T. Effect of a rosemary and oregano volatile oil mixture on performance, lipid oxidation of meat and hematological parameters in Pharaoh quails. Br Poult Sci 2012; 53(1): 89-97.
 25. Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. Am J Obstet Gynecol 1979; 135(3): 372-6.
 26. Zidan DE, Kahilo KA, El-Far AH, Sadek KM. Ginger (*Zingiber officinale*) and thymol dietary supplementation improve the growth performance, immunity and antioxidant status in broilers. Glob Vet 2016; 16(6): 530-8.

Corresponding author:

Assist.Prof.Nazlı Ercan
University of Cumhuriyet
Faculty of Veterinary Medicine
Department of Biochemistry
Sivas-TURKEY.
Phone: +90 (346) 2191010-2575
E-mail: nazliercan@yahoo.com



Yabani ve Evcil Hayvanların Neden Olduğu Cerrahi Problemlerin Değerlendirilmesi Üzerine Retrospektif Bir Çalışma

Başak KURT

Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı, Kars, TÜRKİYE

Özet: Bu retrospektif çalışmada 6 yıllık periyotta (2012-2018) Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Kliniğine getirilmiş olan hastalarda, yabani ve evcil hayvanların neden olduğu cerrahi problemlerin değerlendirilmesi amaçlandı. Bu süre içerisinde kliniklerimize getirilen 4239 hastanın 159'unda hayvan saldırıları sonucu oluşmuş cerrahi problem belirlendi. Olguların 75'i büyük ruminant, 67'si karnivor, 9'u at ve 8'i küçük ruminant idi. Olguların 68'i köpek ısırığı, 53'ü boynuz darbesi, 12'si yavrunun üzerine basma, 12'si kurt saldırısı, 5'i at ısırığı, 4'ü yılan sokması, 2'si çifte darbesi, 1'i aşımaya bağlı travma, 1'i ayı ve 1'i sansar saldırısıydı. Hastalık tanısı konulduktan sonra probleme yönelik sağaltımları yapılan hayvanların 135'i iyileştirildi, 19'u kesime sevk edildi, 3'ünde ötenazi ve 2'sinde amputasyon gerçekleştirildi. Sonuç olarak hayvanlar, diğer hayvanların saldırılarından zarar görmekte, daha çok kendi türleri ve hemcinsleri tarafından travmaya uğratılmaktadırlar. Özellikle çiftlik hayvanlarında rastlanan olguların önlenmesi için boynuz köreltmenin zamanında yapılması ve barınak şartlarının düzenlenmesi konusunda hayvan sahipleri bilinçlendirilmelidir. Sahipsiz hayvanlara barınak sağlanmalı, popülasyon kontrol altında tutulmalı, evcil ve yabani hayvanların yaşam alanları birbirinden ayrılmalıdır.

Anahtar kelimeler: Boynuz darbesi, çifte darbesi, ısırık, köpek, kurt

A Retrospective Study to Evaluate Surgical Injuries Caused by Wild and Domestic Animals

Summary: This retrospective study reviewed surgical injuries caused by wild and domestic animal attacks in animals admitted to the Surgery Department, Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University in six years (2012-2018). A total of 4239 animals were examined and diagnosed animal-related injuries in 159 of them (75 large ruminants, 67 carnivores, 9 horses and 8 small ruminants). Sixty-eight animals suffered from dog bites, 53 animals from horn gores, 12 animals from traumas as a result of being stepped on, 12 animals from wolf bites, 5 animals from horse bites, 4 animals from snake bites, 2 animals from kicks, 1 animal from mating injury, 1 animal from bear and 1 animal from weasel attack. After the diagnosis, the animals were treated. 135 of treated animals were healed, 19 were slaughtered, 3 were euthanized and 2 were amputated. In conclusion; animals are vulnerable to attacks of other animals and most of them are subjected to traumas by their own sex and species. The owners should be educated about dehorning and the improvement of shelters for the prevention of these cases especially in farm animals. The stray animals should be provided shelter and population of them should be kept under control. The habitats of domestic and wild animals should be separated from each other.

Key words: Bite, dog, horn gore, kick, wolf

Giriş

Evcil hayvanlara, gerek yabani gerekse diğer evcil hayvanlar tarafından gerçekleştirilen saldırılar ile ilgili olgular azımsanmayacak kadar çoktur. Yabani hayvanların neden olduğu saldırılar daha çok gıda arayışı ve yaşam alanlarının ihlal edilmesi durumunda meydana gelmektedir. Evcil hayvanlar ise rekabete bağlı ya da savunma davranışları olarak kendi türlerine ve diğer evcil hayvanlara zarar verebilmektedirler. Bu saldırılar sonucunda hafif veya şiddetli yaralanmalar

ya da ölümler ile karşılaşılabilir. Veteriner kliniklerine getirilen kedi ve köpeklerde en fazla karşılaşılan olguların ısırık yaraları olduğu bildirilmiştir (12). Kedilerde en yaygın ikinci, köpeklerde ise üçüncü travma nedeni olarak görülen ısırık yaralarının kedilerde rastlanma oranı %15 iken köpeklerde %10 olarak belirlenmiştir (10). Isırık yaraları, minör travmalardan (deri lezyonları) komplike yaralara (derin doku ve organ yaralanmaları) kadar geniş bir yelpazede cerrahi problemlere yol açar. Özellikle dişler aracılığıyla bakterilerin derin dokulara taşınması açısından bu tip travmalar büyük önem taşımaktadır (12). Evcil hayvanlar içerisinde

de farklı türlerin birbirlerine vermiş oldukları zararlar daha çok köpekler tarafından gerçekleştirilse de diğer türlerde de bu durum gözlemlenmektedir. Sığırlar boynuzları ile çevreden gelen tehditleri uzaklaştırmaya çalışırken etrafındaki canlılara zarar verebilmektedirler. Boynuz darbelerine bağlı olarak kontüzyon, kas veya iç organ yaralanmaları ve fitiklar oluşabilmektedir (11,14). Bu nedenle erken yaşlarda boynuz köreltme çoğu işletmede rutin olarak tercih edilen bir uygulamadır (16).

Buzağılarda doğum sonrasında, yavruların ayrı bir bölüme yerleştirilmemeleri sonucu ahırdaki diğer hayvanların tekme darbeleri veya annenin yavrunun üzerine basması ekstremite kırıklarının başlıca sebeplerindedir. Doğum sonrası travmalar, buzağılarda karşılaşılan kırık olgularının yaklaşık %25'inin etiolojisinde rol oynamaktadır (2,6).

Atlar oldukça sosyal hayvanlar olduklarından gerek çiftliklerde gerekse doğada serbest olarak diğer atlarla sürekli iletişim halindedirler. Özellikle sürü halinde yaşayan ve barınakta yetiştirilen atlarda hiyerarşiye bağlı olarak, serbest gezen atlarda su ve gıda rekabeti ya da kendisini koruma amacıyla, taylarda ise oyun oynama esnasında ısırma ve çifte atma davranışlarına rastlanmaktadır (7). Çifte darbeleri genellikle kırıklar, ısırıklar ise kontüzyon ve açık yaraların şekillenmesiyle sonuçlanır (9).

Yabani hayvanlar, insanların yaşam alanlarının yakınlarında bulduklarında, evcil hayvanlar için tehdit oluşturmaya başlarlar. Özellikle nesli tükenmekte olan yaban hayvanlarını koruma çalışmalarında bu hayvanların sayıları artmakta, ormanlık ve dağlık bölgede yaşayan insanlar ve evcil hayvanları için tehlike arz etmektedirler. Kurtlar insanların yaşadığı alanlara kolaylıkla adapte olduklarından bu tip karşılaşmaların riski daha yüksektir (15). Ayıların diğer canlılarla direkt olarak karşılaşmadıkları sürece saldırmadıkları bilinmektedir. Evcil hayvanlara yönelik ayı saldırıları genellikle dağlık alanlarda bulunan barınaklara gerçekleştirilen beslenme amaçlı saldırılardır. Bir çalışmada bu saldırılar sonucunda meydana gelen ölüm oranları tavuk ve domuzlarda %100, koyunlarda %66.66 ve sığırlarda %87.50 olarak belirlenmiştir (5). Evcil hayvanlarda yılan sokmasına bağlı yaralanmalara ise oldukça sık rastlanmaktadır. Çiftlik hayvanlarında özellikle mera mevsiminde görülen bu saldırılarda hayvanların uğradığı zararın ciddiyeti, yılanın zehirli olup olmamasına ve zehrin

yapısına göre değişiklik göstermektedir (4).

Bu kapsamda, çalışmamızda cerrahi kliniğine getirilen hastalarda yabani ve evcil hayvanların neden olduğu problemlerin saptanması, tedavi seçeneklerinin belirlenmesi ve alınması gereken önlemlerin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışma materyalini, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Kliniği'ne 01.01.2012 – 01.01.2018 tarihleri arasında getirilen hastalar oluşturdu. Alınan anamnez bilgileri ve yapılan klinik muayeneler sonucu, evcil ve yabani hayvanların saldırılarına bağlı olarak oluşmuş travma tanısı konulan toplam 159 hasta değerlendirilmeye alındı.

Travma tanısı konulan hastaların gerekli tedavi ve cerrahi müdahaleleri gerçekleştirildi.

Bulgular

Söz konusu tarihler arasında kliniklerimize toplam 4239 hasta hayvan getirilmiş ve bunların 159'unda (%3.75) hayvan saldırıları sonucu oluşmuş travmatik olgu saptanmıştır.

Olguların 75'ini (%47.16) büyük ruminantlar (40 inek, 19 buzağı, 9 dana, 7 boğa), 67'sini (%42.13) karnivorlar (58 köpek, 9 kedi), 9'unu (%5.66) at ve 8'ini (%5.03) küçük ruminantlar (4 koyun, 2 kuzu, 2 oğlak) oluşturdu. Hastaların 68'i köpek ısırığı, 53'ü boynuz darbesi, 12'si yavrusunun üzerine basma, 12'si kurt saldırısı, 5'i at ısırığı, 4'ü yılan sokması, 2'si çifte darbesi, 1'i aşımaya bağlı travma, 1'i ayı ve 1'i sansar saldırısına maruz kalmıştı.

Yapılan muayeneler sonucunda travma tanısı konulan olgular ve yüzdeleri Şekil 1'de, travmaya maruz kalan hayvan türleri ve yüzdeleri Şekil 2'de sunulmuştur.

40 inekteki hasarın 37'sinin yine başka bir inek tarafından, 1'inin boğa, diğer 2'sinin ise yılan sokması sonucu oluşturulduğu öğrenildi. İneklerin neden olduğu 37 olgunun tamamının boynuz darbesine bağlı olarak gerçekleştiği bilgisi alındı. Boğanın neden olduğu 1 olguyu aşım sırasında meydana gelen yumuşak doku travması oluşturdu. Bu olaylar sonucunda yapılan muayenelerde 24 abdominal fitik, 9 kolleksiyo-sero-sanguin, 3 yumuşak doku travması, 1 rumen fistülü ve 1 ekzoftalmus olgusuna rastlandı. Abdominal fitik olgularının 12'sinde operatif tedavi gerçekleştirildi. Diğer 12 olguda ise fitik geçidinin büyüklüğü ve hasta sahiplerinin istekleri dikkate alınarak hayvanlar kesime sevk edildi. Kolleksiyo-sero-sanguin olgularında rutin tedavi uygulandı. Ekzoftalmus olgusunda hasta kesi-

me sevk edildi. Yumuşak doku travması ve yılan sokması ile ilgili olgularda ise medikal tedavi gerçekleştirildi.

Buzağılarda meydana gelen problemlerin 14'ünün inekler, 3'ünün kurtlar, 1'inin at ve 1'inin köpek tarafından oluşturulduğu öğrenildi. İneklerin neden olduğu 8 olgunun, yetişkin sığırların buzağının üstüne basması sonucu, 6 olgunun ise boynuz darbesi sonucu gerçekleştiği bilgisi alındı. Basma sonucu oluşanlarda kırık, boynuz darbesi sonucunda oluşanlarda ise yumuşak doku travması tanısı konuldu. Kırıklarda duruma göre bandaj veya operatif osteosentez tekniklerinden faydalanılırken, yumuşak doku travmalarında rutin tedavi gerçekleştirildi. Kurt ve köpek saldırıları sonucu oluşan yaralarda açık yara sağaltımı uygulandı. At çiftesine bağlı olarak gelişen 1 tortikollis olgusunda medikal ve fizik tedavi uygulamaları yapıldı.

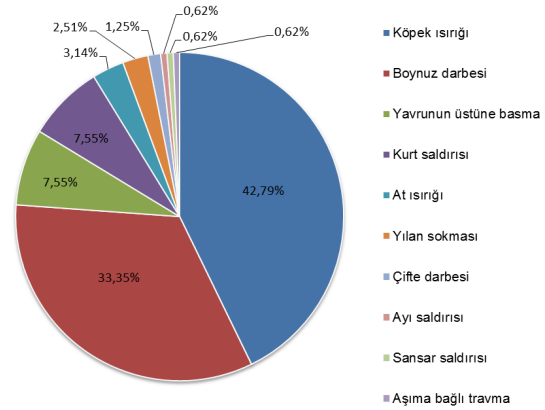
Danalardaki travmaların, 5'inin sığırlar (4 inek, 1 boğa) ve 4'ünün ise kurtlar tarafından oluşturulduğu belirlendi. İneklerin boynuz darbesi sonucu neden olduğu 4 olgunun 3'ünde kolleksiyo-sero-sanguin, 1'inde ise abdominal fitik tanısı konuldu. Boğanın neden olduğu olguda; hayvanın, dananın üzerine atlaması sonucu femurda kırık şekillendiği belirlendi. Kurt saldırılarına bağlı olarak tüm olgularda açık yaralara rastlandı. Olguların tamamında yukarıda bahsedildiği gibi uygun sağaltım yöntemlerinden yararlandı. Boğalardaki olguların 5'inin hemcinsleri tarafından, 1'inin kurt ve 1'inin ise yılan tarafından oluşturulduğu belirlendi. Hemcinslerin neden olduğu olguların boynuzla vurma sonucu olduğu bilgisi alındı. Bu olguların klinik muayenesinde 4'üne abdominal fitik, 1'ine ise kolleksiyo-sero-sanguin tanısı konuldu. Kurt saldırısı olgusunda açık yara tedavisi, yılan sokmasında ise medikal tedavi uygulandı.

Köpeklerdeki olguların 56'sına diğer köpekler, 1'ine ayı ve 1'ine de yılanın neden olduğu bilgisi alındı. Klinik muayenede tüm olgularda açık yara şekillendiği belirlendi. İhtiyaç duyulan olgularda dikiş, diğerlerinde açık yara tedavisi uygulandı. Kedilerdeki olguların 8'ine köpek, 1'ine ise sansar saldırısının neden olduğu bildirildi. Olguların 5'inde açık yara, 3'ünde yumuşak doku travması ve 1'inde gangren tanısı konuldu. Açık yara ve yumuşak doku travmaları medikal olarak tedavi edilirken, gangren şekillenen olguda prognozun olumsuz olması nedeniyle hastanın ötenazisi gerçekleştirildi.

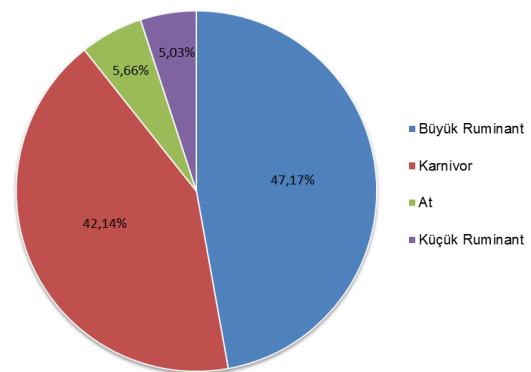
Atlarda oluşan travmaların 6'sına diğer atlar, 3'üne kurtların sebep olduğu öğrenildi. Yapılan

muayenelerde 7 olguda açık yara, 1 olguda falanks kırığı, 1 olguda ise abdominal fitik tanısı konuldu. Kurt saldırısına uğramış olan hastalarda muhtelif yerlerde açık yaralar görüldü. Bu olguların sağaltımlarında duruma uygun olarak operasyon, bandaj ya da açık yara tedavisinden faydalanıldı.

Küçük ruminantlarda karşılaşılan travmatik olgularda, başka koyunlar tarafından üzerine basılma sonucunda 2 kuzudan birisinde evantrasyon ve diğerinde yumuşak doku travması, 2 oğlaktan birisinde kırık diğerinde ise yumuşak doku travması tespit edildi. Koyunların birinde kurt, diğer 3'ünde ise köpek saldırısı sonucu doku kayıplı yaralar görüldü. Hastaların medikal ve operatif tedavileri gerçekleştirildi.



Şekil 1. Hayvan saldırıları ve yüzleri



Şekil 2. Travmaya maruz kalan türler ve yüzdeleri

Tartışma ve Sonuç

Çalışmamızda; altı yıllık süre içerisinde kliniklerimize getirilen 4239 hasta değerlendirilmiş olup, bu hastaların 159'unda diğer hayvanlar tarafından meydana getirilen travmalara rastlanmıştır. Hayvanların birbirine saldırması veya savunma davranışları sonucunda şekillenen travmalar incelendiğinde köpek ısırıkları ve sığır boynuz darbeleri ile yüksek oranda karşılaşıldığını görmekteyiz.

Veteriner hekimlerin karşılaştığı travmatik olguların yaklaşık %10'luk kısmı köpek ısırıklarına bağlı yaralardır. Yavru köpekler daha çok oyun sırasında heyecana bağlı olarak, yetişkin köpekler ise agresif mizaçlarına, algıladıkları tehdide, içinde buldukları rekabete veya aldıkları motivasyona bağlı olarak diğer hayvanları ısırırlar (17). Çalışmamızda hayvanların neden olduğu travmaların %42.76'sını köpek ısırıkları oluşturmakta, bu olguların tamamında açık yaraların meydana geldiği görülmektedir. Karnivor ısırıkları deri bütünlüğünün bozulmasına neden olmasının yanı sıra dişlerle derin dokulara enfeksiyon etkenlerinin taşınması ve kuduz gibi ölümlü sonuçlanan hastalıkların ısırlan hayvana bulaştırılması nedeniyle tehlikeli penetran travmalar olarak bilinmektedirler (8). Bu çalışmada değerlendirmeye alınan süre içerisinde hayvan saldırılarına bağlı kuduz olgusuna rastlanmıştır. Ancak köpek ısırıklarının hayvanların sebep olduğu diğer travmalara göre daha yaygın olması ve bu yaralama olgularının daha çok sahipsiz hayvanlar tarafından gerçekleştirildiği bilgisinin alınması bölgede kontrolsüz üremeye işaret etmektedir.

Sığırların boynuzlarının çeşitli şekil ve büyüklükte yaralanmalara neden olduğu bilinmektedir. Darbenin yönüne ve derinliğine göre bu yaralanmalar kontüzyon ya da laserasyon şeklinde olabileceği gibi perforasyon gelişen olgularda yaşamsal önem arz etmektedir (3,14). Bu çalışmada boynuz darbelerine bağlı travmaların %33.33'lük oranla hayvanların neden olduğu problemler arasında ikinci sırada geldiğini görmekteyiz. Bölgede büyükbaş hayvan yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapılması nedeniyle bu tip travmaların oluşma riski yüksektir. Buna karşın hayvan sahiplerinin boynuz köreltme konusundaki isteksizliği düşündürücüdür. Al-Sobayil ve ark. sığırlarda abdominal fitik nedenlerinden biri olarak boynuz darbelerini göstermişlerdir (1). Nitekim çalışmamızda da boynuz darbelerine bağlı travmalar sonucunda en fazla rastlanan

olguların abdominal fitikler olduğunu görmekteyiz. Bu olguların %50'si tedavi edilebilecek durumda iken diğer %50'lik kısmın kesime sevk edilmiş olması çiftlik hayvanlarında bu tip travmaların neden olduğu ekonomik kayıplara iyi bir örnektir.

Buzağı, kuzu ve oğlaklarda, hayvanların barındıkları alanın sıkışık ya da küçük olması veya annenin yavrusunu koruma içgüdüleriyle kontrolsüz adımlar atmasının yavruda çeşitli travmatik hasarlara neden olduğu bilinmektedir (13). Çalışmamızda da %7.54'lük oranda karşılaşılan bu olgular incelendiğinde buzağuların en çok inekler tarafından travma aldığı ve bu travmaların yarıdan fazlasının yavrunun üstüne basma sonucu meydana geldiği görülmektedir. Karşılaşılan olguların bir kısmının tesadüf eseri gerçekleşmiş olması mümkün olsa da sayıca fazla olması ahır şartlarının düzenlenmesinin gerekliliğine dikkat çekmektedir.

Çalışmamızda %7.54'lük oranda kurtlar tarafından oluşturulan ısırıklara bağlı cerrahi olguya rastlanmıştır. Bu hastaların çok ciddi zarar görmemiş olması nedeniyle tedavileri başarıyla gerçekleştirilmiştir. Treves ve ark. İse yaptıkları bir çalışmada 24 yıllık süre içerisinde 377 evcil hayvanın (sığır, tavuk, köpek, geyik, koyun, hindi) kurt saldırısına maruz kaldığı ve bu hayvanların 358'inin öldüğünü bildirmişlerdir (15). Kurt saldırılarına bağlı yüksek ölüm oranı dikkate alındığında yabani ve evcil hayvanların yaşam alanlarının birbirinden ayrılması konusu üzerinde ciddiyetle durulması gerektiği ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda at ısırıklarına bağlı olarak meydana gelen travmalara %3.14, çifte darbelerine bağlı olarak meydana gelen travmalara ise %1.25 oranında rastlanmıştır. Atların bir arada bulunduğu alanların her zaman ısırık ve çifte darbeleri için travma potansiyeli taşıdığı bilinmektedir (9). Nitekim bu çalışmada da at ısırıklarına büyük oranda yine atların maruz kaldığı görülmektedir. Bu tip travmalar savunma veya saldırı amaçlı gerçekleştirilmiş olabileceği gibi kazara da meydana gelebilmektedirler. Bölgede cirit için yetiştirilen safkan ve yerli atlar ve bunların yanı sıra yazın iş gücünden faydalanıp kışın doğaya bırakılan yıldı atları bulunmaktadır. Knubben ve ark. yaptıkları bir çalışmada at çiftliklerinde barınak sisteminin değişmesine bağlı olarak ısırma ve çifte atma davranışlarının daha sık görüldüğünü bildirmişler, bu durumu grup içi hiyerarşi ve ırka özgü barınak koşulları-

nın sağlanamaması ile ilişkilendirmişlerdir (9). Benzer şekilde, çalışmamızda yer alan atların gerek oyunlarda ekstra efor harcayarak stres altında kalmaları, gerekse zorlu iklim koşullarında doğada verdikleri yaşam mücadelesi sonucunda birbirlerine zarar verebildikleri görülmektedir.

Çalışmamızda %2.51 oranında yılan, %0.62 oranında ayı ve aynı oranda sansar saldırısı sonucu şekillenen travmalarla karşılaşmıştır. Çeşitli evcil ve yabani hayvan tarafından saldırıya maruz kalan toplam hasta sayısına bakıldığında bu oranlar bölgede yaşayan, yaşam alanları ihlal edilen ya da gıda sıkıntısı çeken yabani hayvan türleri hakkında bilgi vermesi açısından önem taşımaktadır. Benzer şekilde aşırma bağlı travmaların (%0.62) nadir olarak şekillendiğini görmekteyiz. Bu tip olguların sayıca az da olsa örnek teşkil ederek koruyucu hekimlik çalışmalarında göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Sonuç olarak; yapılan değerlendirme hayvanların daha çok kendi türleri ve hemcinsleri tarafından travmaya uğradıklarını göstermektedir. Tedavi giderleri yönünden karşılaşılan olgular değerlendirildiğinde önemli derecede ekonomik kayıp ortaya çıkmaktadır. Çiftlik hayvanları için bu kayıplar çok daha büyüktür. Sığırcılık işletmelerinde bu tür olguların önlenmesi için özellikle boynuz köreltmenin erken dönemlerde yapılması ve ahır şartlarının düzeltilmesi, at çiftliklerinde ise barınak konforu ve hayvanlar arasındaki hiyerarşinin göz ardı edilmemesi konusunda hayvan sahiplerine önerilerde bulunulmalıdır. Buzağuları doğum sonrası oluşabilecek kazalardan korunmak için ahır içerisinde gerekli önlemler alınmalıdır. Sahipsiz hayvanların gerek diğer evcil hayvanlardan gerekse yabani hayvanlardan uzak tutulması amacıyla barınaklarda muhafazası sağlanmalı ve kontrolsüz üreme engellenerek popülasyon kontrol altında tutulmalıdır. Yabani hayvanları sürülerden uzak tutmak için hayvancılık işletmelerinin etrafı çevrilmeli, hayvanlar meraya bırakılıyorsa gün boyu otlatılıp gece barınaklara alınmalıdır. Yabani hayvanların fazla sayıda bulunduğu bölgelerde Çevre ve Orman Müdürlükleri ile ortak çalışılarak yaban hayat koridoru oluşturulmalı, evcil ve yabani hayvanların yaşam alanları birbirinden ayrılmalıdır.

Kaynaklar

1. Al-Sobayil FA, Ahmed AF. Surgical treatment for different forms of hernias in sheep and goats. *J VetSci*2007;8: 185-191.
2. Arıcan M. Buzağı ekstremite kırıklarında sağıltım seçenekleri. *Türk Klinikleri J Vet Sci – Special Topics* 2015; 1(1): 98-106.
3. Braun U, Gerspach C, Stettler M, Grob D, Sydler T. Rumen perforation caused by horn injury in two cows. *Acta Vet Scand* 2016; 58 (5): 1-5.
4. Cihan M. Zehirli yaralar ve ısırıklarda ilkyardım ve ilk müdahale. Özaydın İ. ed. In: *Veteriner Acil Klinik*. Erzurum: Eser Ofset Matbaacılık, 2004;pp. 310-315.
5. Dumitru LM, Stoian AC, Darie L, Ciobotaru E. Brown bear maulings on domestic animals in Romania-preliminary study. *Scientific Papers, Series D, Anim Sci* 2017; 60: 343-347.
6. Durmuş AS, Karabulut E, Sağlıyan A. Yenidoğan bir buzağıda suprakondüler femur kırığı olgusu ve operatif sağıltımı. *FÜ Sağ Bil Vet Derg* 2009; 23(2): 119-122.
7. Feh C. Relationships and communications in socially natural horse herds. Mills DS, McDonnell SM. eds. In: *The Domestic Horse: The Origins, Development and Management of Its Behaviour*. Cambridge: Cambridge University Press, 2005;pp. 83-93.
8. Hampson K, Dushoff J, Cleaveland S, Haydon DT, Kaare M, Packer C, Dobson A. Transmission Dynamics and prospects for the elimination of canine rabies. *PLoS Biol* 2009; 7(3): 462-471.
9. Knubben JM, Fürst A, Gyax L, Stauffacher M. Bite and kick injuries in horses: Prevalence, risk factors and prevention. *Equine Vet J* 2008; 40(3): 219-223.
10. Kolata RJ, Kraut NH, Johnston DE. Patterns of trauma in urban dogs and cats: A study of 1000 cases. *J Am Vet Med Assoc* 1974; 164: 499-502.
11. Onoja II, Mshelia WP, Usman B, Andrew AA, Sambo WK, Muhammad ST, Ocheja BO, Awai DE. Severe horn-gore injury in a 5-year-old Bunaji bull and a 10-month-old Yankasa ram-lamb: Case reports. *Sokoto J Vet Sci* 2011; 9(1): 43-45.
12. Shamir MH, Leisner S, Klement E, Gonen E, Johnston DE. Dog bite wounds in dogs and cats: A retrospective study of 196 cases. *J Vet Med* 2002; 49: 107-112.

13. Thomas HS. 2015. How to treat leg fractures in young calves. <http://www.beefmagazine.com/health/how-treat-leg-fractures-young-calves> Erişim tarihi: 08.01.2018.
14. Tijjani AN, Muhammad AS, Mohammed K, Abba Y, Chung ELT, Adamu L, Osman AY, Saharee AA, Lila MAM, Haron AW, Abdullah FJ. Management o horn gore injury and urticaria in a dairycow: A casereport. J Adv Vet Anim Res 2015; 2(3): 366-368.
15. Treves A, Jurewicz RR, Naughton-Treves L, Rose RA, Willging RC, Wydeven AP. Wolf depredation on domestic animals in Wisconsin, 1976-2000. Wildl Soc Bull 2002; 30(1): 231-241.
16. Whay HR, Main DCJ. Improving Animal Welfare: Practical Approaches for Achieving Change. Grandin T. ed. In: Improving Animal Welfare. Cambridge: Cambridge University Press, 2010; pp. 227-251.
17. Yuill C. 2017. Bite wounds in dogs. <https://vcahospitals.com/know-your-pet/bite-wounds-in-dogs> Erişim tarihi:10.01.2018.

Sorumlu Yazar:

Dr. Öğr. Üyesi Başak KURT
Kafkas Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Cerrahi Anabilim Dalı
Kars-TÜRKİYE
E-posta: basakyakin@hotmail.com



Ters Zoonotik Viral Enfeksiyonlar

Cüneyt TAMER, Semra GÜMÜŞOVA

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Samsun-TÜRKİYE

Özet: Son on yılda insanlarda ortaya çıkan yeni enfeksiyonların yaklaşık olarak %64'ünün hayvan veya hayvansal kaynaklı ürünlerden kaynaklandığı saptanmıştır. Zoonoz enfeksiyonlarda hayvanların adeta enfeksiyon havuzu gibi davrandığını ve bu nedenle insanlar için büyük risk oluşturduklarını yeniden gündeme getirmiştir. Genellikle hayvanlardan insanlara bulaşan enfeksiyonlar olarak algılanan zoonoz enfeksiyonlar, aslında insanlardan hayvanlara bulaşan hastalıklar olarak da düşünülmelidir. Bu durum ters zoonoz olarak adlandırılıp, insanlardaki viral enfeksiyonların yakın temasta olunan hayvan türlerinde saptanmasıyla ortaya konmuştur. Bu derleme ile viral ters zoonoz enfeksiyonlar konusunda yapılmış çalışmaların verileri değerlendirilmiş ve bu enfeksiyonların hayvan ve insan sağlığı için önemine dikkat çekilmiştir.

Anahtar kelimeler: Hayvan sağlığı, insan sağlığı, ters viral zoonozlar

Reverse Zoonotic Viral Infections

Summary: Last ten years, it is detected that approximately 64% of the diseases that have affected human have been caused by animal pathogens. It has been reviewed that animals acts almost like an infection pool in zoonotic infections and for this reason they pose a great risk for human health. Zoonotic infections, which are generally perceived as infections that are transmitted to humans from animals, should also be considered as diseases that are actually transmitted to humans from animals. This is called reverse zoonosis and has been demonstrated by the detection of viral infections in humans in closely related animal species. Importance of reverse zoonosis that can be transmitted from human to animals have been demonstrated by the viral zoonotic infections in human are detected in close contact animals with people. In this review, the data from studies on viral reverse zoonotic infections were evaluated and attention was drawn to the importance of these infections for both animal and human health.

Key words: Animal health, human health, reverse viral zoonosis

Giriş

Son yıllarda hayvan veya hayvansal kaynaklı ürünlerden kaynaklanan enfeksiyonların ve bu enfeksiyonlar konusunda yapılan araştırmaların çoğalmasından dolayı, ters zoonozlar olarak tanımlanan insanlardan hayvanlara bulaşabilen enfeksiyonlara olan ilgi de artmıştır (35,38).

Yapılan çalışmalar, yetiştiriciliği yapılan ya da laboratuvar çalışmalarında kullanılan hayvanlardaki patojenlerin insanlar için de potansiyel risk oluşturduğunu ortaya koymuştur (13). Vahşi hayattaki hayvanlarda da özellikle primatların ters zoonozlar açısından önemli bir kaynak olduğu bildirilmiş (12). Dolayısıyla kırsal kesimlerde doğa ve dolayısıyla hayvanlarla iç içe yaşayan insanlar, veteriner hekimler, laboratuvar çalışanları, çiftlik ve hayvanat bahçelerinde çalışanlar gibi hayvanlarla sık ve yakın temasta olan kişiler ters zoonotik enfeksiyonların bulaşmasın-

da kritik role sahiptirler.

İnfluenza virüsü, hepatit E virüsü, paramyxovirus, herpesvirus, rotavirus, adenovirus ve ebola virus enfeksiyonlarını kapsayan, insanlardan hayvanlara bulaşan bazı viral enfeksiyonlar hakkında yapılmış çalışmaların verilerinin değerlendirildiği bu derleme ile ters zoonoz viral enfeksiyonların hayvan ve insan sağlığı açısından önemine dikkat çekilmeye çalışılmıştır.

İnfluenza virus enfeksiyonları

İnfluenza virus; influenza A, influenza B ve influenza C cislerini içeren *Orthomyxoviridae* ailesi içinde yer alır ve RNA kapsayan virüslerdir (21). Virüsün hemaglütinin (H) ve nöraminidaz (N) glikoproteinleri konakçı spesifikliğini belirlemektedir. Kanatlı hayvanlar influenza virusun bütün hemaglütinin ve nöraminidaz glikoproteinlerini taşıdığından asıl rezervuar görevi görmektedir. Veteriner hekimliği açısından önemli olan influenza-A genusu 8 segmentlidir (21). Bu segmentli yapı nedeniyle insan influenza virusu ile domuz influenza virusu arasında "reassortment"

gerçekleşmektedir (21,28). İnsanlarda H3N2 pandemisinden sonra domuzlarda H3N2 teşhisi virüsün ters zoonotik özelliğini ortaya koymuştur (9). Yine insan H1N1 pandemisinde de domuzlardan H1N1 izole edildiği ve hastalığı hafif geçirdikleri bu yüzden de klinik belirti göstermedikleri bildirilmiştir (21). Ayrıca, Hong Kong'ta 10 tane domuzdan alınan örneklerde pandemik influenza H1N1 in 8 segmenti PCR ile teşhis edilmiş ve insanlardan domuzlara bulaşma olduğu ortaya konmuştur (29). Bir başka çalışmada ise 2012 yılında Brezilya'da 136 domuzda human H1N1 serolojik olarak belirlenmiş ancak bulaşmanın nasıl olduğuna ilişkin kesin bilgi verilmemiştir (33). Pandemi H1N1 2009 yılında domuzlardan başka kedi, köpek, hindi, gelincik ve çitada da saptanmıştır. Gelincik ve kediye bulaşmanın enfekte insandan yakın temas yoluyla olduğu düşünülse de bulaşma yolu hakkında kesin bir bilgi yoktur (5). Gelincikler H1N1 patolojik çalışmaları için deney hayvanı modeli olarak kullanılmaktadır. Ayrıca primatlarda deneysel olarak H1N1 enfeksiyonu oluşturulmuştur (21). Meksika'da yapılan bir çalışmada köpeklerde ve sahiplerinde eş zamanlı olarak H3N2, H1N1 ve H1N1pdm09 serolojik olarak teşhis edilmiştir (31). Kedilerde ise 2009'daki pandemi sırasında H1N1 tespit edilmiş ve beraberinde yaşadığı insanlardan bulaştığı düşünülmüştür (36). Amerika'da ise bir vahşi yaşam parkında sadece bakıcısının temas halinde olduğu bir çitada da pandemik H1N1 tespit edilmesi virüsün ters zoonotik özelliğini akla getirmiştir (8). Ayrıca kanatlı, domuz, insan ve atları enfekte edebilen H7N7 virüslerinin, insanlarda yüksek morbidite ile seyrettiği de bildirilmiş ve ters zoonotik enfeksiyon potansiyeli yüksek bir virüs olduğu bildirilmiştir (20).

Hepatit E virusu enfeksiyonları

Hepatit E fekal-oral yolla bulaşan, genellikle sporadik ama nadir olarak da endemik ölümcül hepatite sebep olan bir hastalıktır (21). Hepatit E virüs (HEV) enfeksiyonu, gelişmekte olan ülkelerde insanlarda su kaynaklı epidemilere yol açmakta (30) ve daha çok Uzak Doğu Asya ve Afrika'da görülmektedir (21). Virüsün dört ana genotipi vardır. Genotip 1 ve 2 sadece insanlarda, genotip 3 ve 4 domuzlar ile insanlarda görülmektedir (32). Son olarak da sadece kanatlıları enfekte eden genotip 5 teşhis edilmiştir. Domuz HEV' un zoonoz olduğu bildirilmiş olmakla birlikte, avian HEV için henüz zoonotik vaka tespit edilmemiştir (21). Hepatit E'nin zoonotik enfek-

siyon olduğu, ilk olarak 1997'de domuzlarda yeni bir Hepatit E suşu tespit edilmesiyle düşünülmeye başlanmıştır (25). Bu suş insan HEV' un kapsid proteinini kodlayan ORF2 ile yüzde 80 oranında benzerlik göstermektedir (25). Bu da insanla domuz suşları arasında çapraz benzerlik olduğunu ve potansiyel zoonoz olabileceğini düşündürmüştür (25). ABD'de insanlarda teşhis edilen HEV genotip 3'ün aynı bölgede yaşayan domuzlardan izole edilen domuz HEV'i ile genotip olarak çok yakın olduğu bildirilmiştir (26). Bu enfekte domuzlardan elde edilen domuz HEV, Resus maymunlarında ve şempanzelerde, insanlardan izole edilen HEV genotip 3 ise özel patojenlerden arı (spesific pathogen free-SPF) domuzlarda deneysel enfeksiyon oluşturabilmiştir (26). Yine HEV genotip 1 ve genotip 2 deneysel olarak SPF domuzlara inokule edilmiş ama enfeksiyon oluşturulamamıştır (27). İnsan HEV genotip 4 ise deneysel olarak domuzlarda enfeksiyon oluşturmuştur (11). Bununla birlikte insan HEV'de fekal oral yolla bulaşma olduğu için insan dışkılarında rodentlerde bulaşabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla rodentlerde yapılan bir çalışma, sadece genotip 3 ve genotip 4 ün zoonoz olduğu bildirilse de bir rodent türü olan mongolian gerbil deneysel olarak sadece insan HEV genotip 1 ile enfekte edilebilmiştir (15).

Paramyxovirus enfeksiyonları

Paramyxoviridae ailesindeki virüsler tek iplikçilli RNA içeren ve zarflı oldukları için çevre şartlarına oldukça duyarlıdır (21). Bu ailede birden fazla virüs zoonotik özellik taşımaktadır. Kızamık virüsü, dünyada en yaygın viral hastalıklardan bir tanesidir (6,21). Tek dozda %93 oranında enfeksiyondan koruyan etkili bir aşısı olmasına rağmen yıllık ortalama 20 milyon insan bu enfeksiyonu geçirmektedir ve yıllık 146 bin insan bu enfeksiyondan hayatını kaybetmektedir (6). Virus, hayvan morbillivirüsleriyle antijenik olarak yakın ilişkilidir. Hatta kızamığa karşı aşılanan primatlarda kısmi olarak köpek gençlik hastalığı virüsüne (CDV) karşı da korunma sağlanmıştır (10). Kızamık virüsü ilk olarak insanlarda teşhis edildikten sonra goril, Afrika yeşil maymunu, makak maymunu, babun, marmoset maymunu ve sincap maymunu gibi birçok insan dışı primat türünde de görülmüştür (21). Ancak insan dışı primatlarda bu enfeksiyon az semptomatik veya hafif sindirim sistemi semptomları ile seyrettiği için teşhis biraz zorlaşmaktadır (17). Nepal'de laboratuvar, hayvanat bahçesi gibi ka-

palı alanlar veya şehir merkezlerinde insanlarla sık temas eden makak maymunlarında kızamık virüsü enfeksiyonu prevalansının %100 olduğu bildirilmiştir (17). Buna karşın virüs insanlarla daha az temasta olan, vahşi olarak yaşayan insan dışı primatlarda da bildirilmiştir (16). Singapur'da insanlardan uzak vahşi hayattaki makak maymunlarında kızamık saptanmaması akla, etkenin insandan maymuna bulaşma olasılığını düşündürmüştür. Ancak enfeksiyonun bu kadar geniş insan dışı primat skalasında görülmesi etkenin asıl kaynağı hakkında hala tartışmaya sebep olmaktadır (18).

Metapneumovirus ise 2003-2006 yılları arasında Tanzanya'da bir ulusal parktaki vahşi şempanzelerde %34-98 arası değişen morbidite ve %3-7 arası değişen mortalite oranları ile tespit edilmiş ve bulaşmanın insan kökenli olabileceği düşünülmüştür (18).

Morbillivirus genusuna ait bir virüs olan köpek gençlik hastalığı virüsünün da insanlarda asemptomatik olarak seyrettiği görülmüş ve kızamık virusuna karşı aşılı bireylerin bu enfeksiyona yakalanmadığı tespit edilmiştir (21,37). Bu noktadan yola çıkarak hem bu iki virüsün antijenik olarak yakın ilişkide olduğu hem de insanlardaki köpek gençlik hastalığı virüsünün köpekler için bir rezervuar olabileceği düşünülmüştür (37).

Herpesvirus enfeksiyonları

Herpesviridae ailesi çift iplikçikli DNA içeren büyük bir genomu sahip, zarflı ve önemli zoonoz enfeksiyonları içinde barındıran bir virus ailesidir (21,38). Özellikle İnsanlarda sindirim sistemi semptomları ile enfeksiyon oluşturan human herpesvirus-1(HHV-1), marmoset maymunlarında gingivitis, stomatit, dilde ülserasyon ve eroziv bulgularla seyretmektedir (23). Enfeksiyonda mortalite %100'e varmaktadır. Bu hayvanlarda serolojik ve moleküler olarak virus saptanmıştır (23). Bulaşmanın insanlardan direk temas veya solunum yoluyla olduğu düşünülmektedir (23). Goril, şempanze ve babunlarda da HHV-1 saptandığı bildirilmiştir (14,24).

İnsanlarda lenfo-adenite sebep olan ve Epstein-Barr virus olarak bilinen human herpesvirus-4'ün (HHV-4) köpeklerde enfeksiyon oluşturduğu bildirilmiştir (41). HHV-4 hem rat hücre kültürleri olan "rat glioma-derived" 9L ve "rat mammary carcinoma-derived" c-SST-2 hem de "canine kidney-derived" MDCK da üretilip izole edilmiştir (41). Ayrıca bu virüsü taşıyan insanların köpeklerinde yapılan bir çalışmada 36 köpekte %89 oranında seropozitiflik elde edilerek PCR ve

western blot analizi ile sonuçlar doğrulanmış, sekans sonuçları ile virüsün HHV-4 ile %99.6-100 oranında benzer olduğunu ortaya koymuştur (7).

Adenovirus enfeksiyonları

Adenovirus enfeksiyonları, zoonotik yönü az bilinen ve hem insan dışı primatlarda hem de insanlarda yaygın olarak görülen enfeksiyonlardır (39). Adenoviruslar zarfsız, kübik simetrik ve çift iplikçikli DNA virüsleridir. *Adenoviridae* ailesinin altında beş genus vardır (42). Vertebralı canlılarda, oluşturdukları enfeksiyonlardan daha çok mastadenovirus genusu sorumludur (42). Almanya ve birden fazla Ekvatorial kuşak üzerindeki Afrika ülkesinde hem vahşi hem de yakalanmış durumdaki insan dışı primatlarda yapılan çalışmalarda insan adenoviruslarından human adenovirus A, human adenovirus B, human adenovirus C, human adenovirus D, human adenovirus E, human adenovirus F saptanmıştır (39). Özellikle Afrika'daki vahşi hayatta yaşayan şempanze, goril ve bonobo maymunlarında pozitif sonuçlar bulunmuştur (39).

Rotavirus enfeksiyonları

Rotaviruslar insan sağlığı açısından önemli bir virus grubudur. Bu viruslar bebekler ve çocuklardaki sindirim sistemi enfeksiyonlarından da sorumludurlar. Rotaviruslar, *Reoviridae* ailesine ait, 11 segmentli çift iplikçikli RNA virüsleridir (21). İnsan Grup A rotavirusu kedi, sığır ve domuz rotavirusu ile yakın ilişki içerisinde (22). İnsanlardan elde edilen Rotavirusların tüm segmentlerinin analizi yapıldığında bazı hayvan rotavirusları ile önemli benzerlikler bulunmuştur. Bu durum türler arası bulaşmanın olabileceğini düşündürmüştür (22). Fekal-oral yolla bulaşan enfeksiyonda kentsel bölgede yaşayan vahşi veya sokak hayvanları risk altındadırlar. Japonya'da 2003 ile 2008 yıllarındaki karnivorlardan alınan dışkı örneklerinde rotavirus PCR ile saptanmış ve bu virusun hem human Rotavirus ve hem de feline rotavirusa benzerlik gösterdiği bulunmuştur (1). Ayrıca insan atıklarının bol olduğu yerlerde deniz kabuklularında da rotavirus tespit edilmiştir (19).

Ebola virus enfeksiyonları

Ebola virüsü, *Filoviridae* ailesi içinde yer alan tek iplikçikli negatif polariteli RNA virüsüdür. Ebola virüsü halk sağlığı açısından önemli bir yere sahip olan ve ters zoonoz olabileceği düşünülen bir virüsdür (21). Vahşi hayatta yarasaların rezervuar olduğu, insanlara ise maymunlardan bulaştığı düşünülen bir enfeksiyondur (21). Son Ebola epidemisi 2013 yılında Batı Afrika'da

önemli ölümlere yol açmıştır. Ebola kaynaklı 2015'in kasım ayına kadar 28635 vakada 11314 ölüm bildirilmiştir (40). Ebola, enfekte hayvanın vücut sıvıları veya direk enfekte hayvana temas yolu ile insanlara bulaşmaktadır. Enfekte insanların sadece insanlara değil hayvanlara da virüsü bulaştırabileceği öngörülmektedir (4). İspanya'da Ebola ile enfekte bir sağlık çalışanının köpeğinde virüs tespit edilmiş olması etkenin ters zoonoz olabileceğini düşündürmüştür (2). Bir başka vaka da ise Teksas'ta bir hemşirenin köpeğinde Ebola virüsü saptanmıştır (2).

Diğer viral enfeksiyonlar

Deniz kabuklularında yapılan bir çalışmada, deniz kabuklularında insanlarda enterit oluşturan Hepatit A, Norwalk like virus, Astrovirus gibi virüsler tespit edilmiştir (19). *Caliciviridae* ailesinin Sapovirus genusunda yer alan enterit virüs türleri sığırları ve insanları enfekte edebildiği bildirilmiştir (21). Calicivirusların insan ve hayvanları enfekte edebilen Norovirus genusu ile Sapovirus genusu arasında rekombinasyon sonucu rekombinant virüsler ortaya çıkmakta ve bu durum türler arası bulaşmayı tetikleyebileceğinden, ters zoonoz potansiyeli oluşturduğu bildirilmiştir (21). Özellikle sığır, koyun gibi memelilerde norovirusların saptanmış olması ve zoonotik potansiyeli olabileceği yönündeki şüpheleri artırmıştır (43,44).

Sonuç

Tek sağlık, insan sağlığı, hayvan sağlığı ve çevre arasındaki ilişkiyi gösteren bir konsept çalışmadır. Tek Tıp Konsepti 1800'lü yılların başında Kanadalı beşeri hekim William Osler ve Alman beşeri hekim olan Rudolf Virchow tarafından ortaya atılmış ve daha sonra 1947 yılında James H Steele, Hastalıklardan Korunma ve Kontrol Merkezinde (CDC) "Veterinary Public Health Division" adı altında bir bölüm kurarak toplum sağlığı için hayvan sağlığının önemine dikkat çekmiştir (5). İnsanlar hayvanlarla yaşadıkları çevreyi ve yiyeceklerini paylaşmaktadırlar. Bu da hayvan, insan ve çevre üçgeninin önemini göstermektedir. Hayvan kaynaklı insan enfeksiyonlarının artması, hastalıkların elemine edilmesinde özel vakalardan çok bütüne odaklanmayı gerektirmektedir. Yani hayvan ve insan sağlığı tek başına düşünülmemelidir (34).

İnsan popülasyonlarının gün geçtikçe genişleyerek yeni coğrafi bölgelere yayılması, insanların çevre ve vahşi hayvanlarla daha çok temas halinde olmasına sebep olmaktadır. Ayrıca ormanların yok edilmesi ve iklim değişiklikleri hastalıkların hayvanlara bulaşması için yeni fırsatlar oluşturmaktadır. Gelişen ulaşım imkanları da hastalıkların çabuk yayılmasına katkı sağlayan bir diğer faktördür. Tek sağlık konseptinin gerektirdiği üzere korunma ve kontrol önlemleri insan ve hayvan sağlığını birlikte düşünerek çift taraflı uygulamalarla yapılmalıdır. Risk altındaki vahşi veya evcil hayvanlar kontrol edilip, enfekte olan hayvanlar karantinaya alınarak diğer hayvanlar ve insanlarla teması engellenmelidir. Aynı şekilde enfekte insanların da hayvanlarla temasından kaçınılmalıdır.

Yapılan çalışmalar insanların hayvanlar arasında vektör görevi görebileceğini ortaya koymaktadır. Örneğin; insan Parvovirusu sadece insanları enfekte edebilmektedir ve bir ters zoonotik enfeksiyon söz konusu değildir. Ancak insanların birden fazla köpekle temas ederek köpek Parvovirusunu köpekler arasında yayabileceği açıklanmıştır (3). Bu nedenle enfeksiyon riski taşıyan rezervuar insanlar için eğitim ve bilinçlendirme çok önemlidir.

Bu derlemenin hazırlanışı sırasında incelenen çalışmalar göstermiştir ki, ters zoonotik viral enfeksiyonlar en fazla karnivorları, ikinci sırada insanlara genetik olarak en yakın canlılar olarak kabul edilen ve bu nedenle sıklıkla deney hayvanı olarak da tercih edilen insan dışı primatları, üçüncü sırada çiftlik hayvanlarını (özellikle domuzlar) ve dördüncü ve beşinci sırada ise sırasıyla rodentler ve kanatlı hayvanları enfekte etmektedir. Bu sıralamada da görüldüğü gibi insanlara yakın yaşayan hayvan türleri bu enfeksiyonlar açısından önemlidirler. Bu nedenle başarılı bir toplum sağlığı uygulaması için hayvan sağlığı, insan sağlığı ve çevre sağlığı ile ilgilenen toplulukların birbiri ile uyumlu çalışmasının önemine dikkat çekilmelidir. Sonuç olarak sadece hayvanların insanlar için rezervuar olabilecekleri değil, insanların da bazı enfeksiyonlar yönünden hayvanlar için rezervuar olduğu unutulmamalıdır. Multi disiplinler çalışmalarla bu enfeksiyonlarla ilgili bulaşma ve korunma yolları saptanarak konu ile ilgili gerekli tedbirler alınmalıdır.

Kaynaklar

1. Abe M, Yamasaki A, Ito N, Mizoguchi T, Asano M, Okano T, Sugiyama M. Molecular characterization of rotaviruses in a Japanese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) and a masked palm civet (*Paguma larvata*) in Japan. *Vet Microbiol* 2010; 146(3-4): 253-9.

2. Anonim. Spain explains reasons for euthanasia of Ebola nurse's dog. *Vet Rec* 2014; 175(18): 441.
3. Anonim. http://www.petmd.com/dog/wellness/evr_dg_parvovirus_across_species; Erişim tarihi: 22.11.2015
4. Bausch DG, Towner JS, Dowell SF, Kaducu F, Lukwiya M, Sanchez A, Nichol ST, Ksiazek TG, Rollin PE. Assessment of the risk of Ebola virus transmission from bodily fluids and fomites. *J Infect Dis* 2007; 196(2): 142-7.
5. CDC. One Health. <http://www.cdc.gov/onehealth/about.html>; Erişim tarihi: 16.11.2015
6. CDC. Measles Vaccination. <http://www.cdc.gov/measles/vaccination.html#recs>; Erişim tarihi: 04.11.2015.
7. Chiou SH, Chow KC, Yang CH, Chiang SF, Lin CH. Discovery of Epstein-Barr virus (EBV)-encoded RNA signal and EBV nuclear antigen leader protein DNA sequence in pet dogs. *J Gen Virol* 2005; 86(4): 899-905.
8. Crossley B, Hietala S, Hunt T, Benjamin G, Martinez M, Darnell D, Rubrum A, Webby R. Pandemic (H1N1) 2009 in captive cheetah. *Emerg Infect Dis* 2012; 18(2): 315-7.
9. De Jong J, Smith D, Lapedes A, Donatelli I, Campitelli L, Barigazzi G, Van Reeth K, Jones T, Rimmelzwaan G, Osterhaus A, Fouchier R. Antigenic and genetic evolution of swine influenza A (H3N2) viruses in Europe. *J Virol* 2007; 81(8): 4315-22.
10. De Vries RD, Ludlow M, Verburgh RJ, Van Amerongen G, Yüksel S, Nguyen DT, McQuaid S, Osterhaus ADME, Duprex WP, De Swart RL. Measles vaccination of non-human primates provides partial protection against infection with canine distemper virus. *J Virol* 2014; 88(8):4423-33.
11. Feagins AR, Opriessnig T, Huang YW, Halbur PG, Meng XJ. Crossspecies infection of specific-pathogen-free pigs by a genotype 4 strain of human hepatitis E virus. *J Med Virol* 2008; 80(8): 1379-86.
12. Gillespie TR, Nunn CL, Leendertz FH. Integrative approaches to the study of primate infectious disease: implications for biodiversity conservation and global health. *Am J Phys Anthropol Suppl* 2008; 137(47): 53-69.
13. Hankenson FC, Johnston NA, Weigler BJ, Di Giacomo RF. Zoonoses of occupational health importance in contemporary laboratory animal research. *Comp Med* 2003; 53(6): 579-601.
14. Heldstab A, Ruedi D, Sonnabend W, Deinhardt F. Spontaneous generalized Herpesvirus hominis infection of a lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). *J Med Primatol* 1981; 10: 129-35.
15. Hong Y, He ZJ, Tao W, Fu T, Wang YK, Chen Y. Experimental infection of Z:ZCLA Mongolian gerbils with human hepatitis E virus. *World J Gastroenterol* 2015; 21(3): 862-7.
16. Jones-Engel L, Engel GA, Schillaci MA, Babo R, Froehlich JW. Detection of antibodies to selected human pathogens among wild and pet macaques in Sulawesi, Indonesia. *Am J Primatol* 2001; 54(3): 171-8.
17. Jones-Engel L, Engel GA, Schillaci MA, Lee B, Heidrich J, Chalise M, Kyes RC. Considering human-primate transmission of measles virus through the prism of risk analysis. *Am J Primatol* 2006; 68(9): 868-879.
18. Kaur T, Singh J, Tong S, Humphrey C, Clevenger D, Tan W, Szekely B, Wang Y, Li Y, Alex Muse E, Kiyono M, Hanamura S, Inoue E, Nakamura M, Huffman MA, Jiang B, Nishida T. Descriptive epidemiology of fatal respiratory outbreaks and detection of a human-related metapneumovirus in wild chimpanzees (*Pan troglodytes*) at Mahale Mountains National Park, Western Tanzania. *Am J Primatol* 2008; 70(8): 755-65.
19. Le Guyader F, Haugarreau L, Miossec L, Dubois E, Pommepuy M. Three year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(8): 3241-8.
20. Khurana S, Chung KY, Coyle EM, Meijer A, Golding H. Antigenic fingerprinting of antibody response following highly pathogenic H7N7 avian influenza virus exposure in humans: Evidence for anti-PA-X antibodies. *J Virol* 2016; 90(20): 9383-93.
21. Maclachlan NJ, Dubovi EJ. *Fenner's Veterinary Virology*. Fourth Edition. California: Elsevier. 2011; pp. 179-484.
22. Martella V, Bányai K, Matthijssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol* 2010; 140(3-4): 246-55.
23. Mätz-Rensing K, Jentsch KD, Rensing S, Langenhuyzen S, Verschoor E, Niphuis H,

- Kaup FJ. Fatal Herpes simplex infection in a group of common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Vet Pathol.* 2003; 40(4): 405-11.
24. McClure HM, Swenson RB, Kalter SS, Lester TL. Natural genital Herpesvirus hominis infection in chimpanzees (*Pan troglodytes* and *Pan paniscus*). *Lab Anim Sci* 1980; 30(5): 895-900.
 25. Meng, XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, Haynes JS, Thacker BJ, Emerson SU. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad* 1997; 94(18): 9860-5.
 26. Meng XJ, Halbur PG, Shapiro MS, Govindarajan S, Bruna JD, Mushahwar IK, Purcell RH, Emerson SU. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol* 1998; 72(12):9714-21.
 27. Meng XJ, Halbur PG, Haynes JS, Tsareva TS, Bruna JD, Royer RL, Purcell RH, Emerson SU. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch Virol* 1998; 143(7): 1405-15.
 28. Olsen CW. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Res* 2002; 85(2): 199-210.
 29. Poon LL, Mak PW, Li OT, Chan KH, Cheung CL, Ma ES, Yen HL, Vijaykrishna D, Guan Y, Peiris JSM. Rapid detection of reassortment of pandemic H1N1/2009 influenza virus. *Clin Chem* 2010; 56(8): 1340-4.
 30. Purcell RH, Emerson SU. Hidden danger: The raw facts about hepatitis E virus. *J Infect Disease* 2010; 202(6): 819-21.
 31. Ramirez-Martinez LA, Contreras-Luna M, De la Luz J, Manjarrez ME, Rosete DP, Rivera-Benitez JF, Saavedra-Montanez M, Ramirez-Mendoza H. Evidence of transmission and risk factors for influenza A virus in household dogs and their owners. *Influenza Other Resp* 2013; 7(6): 1292-6.
 32. Reuter G, Fodor D, Forgach P, Katai A, Szucs G. Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary. *J Clin Virol* 2009; 44(4); 277-81.
 33. Rajao DS, Alves F, Del Puerto HL, Braz GF, Oliveira FG, Giacci-Zanella JR, Schaefer R, Reis JKP, Guedes RMC, Lobato ZIP, Leite RC. Serological evidence of swine Influenza in Brazil. *Influenza Other Resp* 2012; 7(2): 109-12.
 34. Rubin C. Surveillance of Zoonotic Infectious Disease transmitted by small companion animals. CDC. http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/12/12-0664_article; Erişim tarihi, 24.10.2015.
 35. Scheuermann K. California Council for Wildlife Rehabilitators. [https://theiwrc.org/journal/journal30\(1\).pdf](https://theiwrc.org/journal/journal30(1).pdf), Erişim tarihi: 18.10.2016.
 36. Sponseller BA, Strait E, Jergens A, Trujillo J, Harmon K, Koster L, Jenkins-Moore M, Killian M, Swenson S, Bender H, Waller K, Miles K, Pearce T, Yoon KJ, Nara P. Influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus infection in domestic cat. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(3): 534-7.
 37. Stephenson JR, Ter Meulen V. Antigenic relationships between measles and canine distemper viruses: comparison of immune response in animals and humans to individual virus-specific polypeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76(12): 6601-5.
 38. Tischer BK, Osterrieder N. Herpesviruses-A zoonotic threat? *Vet microbiol* 2010; 140(3-4): 266-70.
 39. Wevers D, Metzger S, Babweteera F, Bieberbach M, Boesch C, Cameron K, Couacy-Hymann E, Cranfield M, Gray M, Harris LA, Head J, Jeffery K, Knauf S, Lankester F, Leendertz SA, Lonsdorf E, Mugisha L, Nitsche A, Reed P, Robbins M, Travis DA, Zommers Z, Leendertz FH, Ehlers B. Novel adenoviruses in wild primates: a high level of genetic diversity and evidence of zoonotic transmissions. *J Virol* 2011; 85(20): 10774-84.
 40. World Health Organization. Ebola Situation Report. <http://apps.who.int/ebola/current-situation/ebola-situation-report-11-november-2015>, Erişim tarihi: 21.11.2015.
 41. Yang L, Maruo S, Takada K. CD21-mediated entry and stable infection by Epstein-Barr virus in canine and rat cells. *J Virol* 2000; 74(2): 10745-51.
 42. Yeşilbağ K. Genel Viroloji. Bursa: Medipress, 2010; s. 66-7.
 43. Yılmaz H, Bostan K, Turan N, Muratoglu K, Yılmaz A, Ozkul AA, Kocazeybek B, Helps R. Real-time PCR detection of norovirus in mussels collected from the bosphorus in İstanbul, Turkey. *Food Environ Virol* 2010; 2(2): 64-8.

44. Yılmaz H, Turan N, Altan E, Bostan K, Yılmaz A, Helps CR, Cho KO. First report on the phylogeny of bovine norovirus in Turkey. Arch Virol 2011; 156(1): 143-7.

Sorumlu Yazar:

Cüneyt TAMER

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Veteriner Fakültesi

Viroloji Anabilim Dalı 55220

Atakum/SAMSUN

Tel: 0 (362) 312 19 19 – 3529

E-posta: cuneyt_tamer@hotmail.com



Reseptör Analizinde Radyoligand Bağlanma Deneyleri

Hidayet TUTUN¹, Emine BAYDAN²

¹Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji, Anabilim Dalı, Burdur-TÜRKİYE

²Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

Özet: Biyolojik sistemlerin işleyişinde ve patolojisinde reseptörler önemlidir. Belirtilen nedenle reseptör ve reseptör alt tiplerini tanımlama, anatomik dağılımları, hastalık durumundaki sıklığı, reseptörlere özgü ligand geliştirme, geliştirilen ligandların farmakokinetik ve farmakodinamik çalışmalarının yapılması gibi birçok alanda reseptör analiz yöntemlerine ihtiyaç bulunmaktadır. Reseptör analizinde yeni yöntemlerin geliştirilmesi ile ligandı belli olmayan “yetim” reseptörlerin keşfi ve hastalıklarla bağlantılarının incelenmesi kolaylaşacaktır. Reseptör analizlerinde en yaygın kullanılan yöntemlerden birisi radyoligand bağlanma deneyleridir. Bu derlemede, radyoligand bağlanma deneyinin prensibi, tekniği, kullanım alanları, reseptöre özgü ligand geliştirilmesindeki rolü, geliştirilen ligandların farmakokinetik çalışmalarında kullanımı, biyolojik ve patolojik mekanizmaların anlaşılmasındaki rolü ve diğer reseptör analiz yöntemlerine göre avantajları ve dezavantajları hakkında genel bilgi verilmiştir.

Anahtar kelimeler: Ligand, radyoligand, reseptör

Radioligand Binding Assays in Receptor Analysis

Summary: Receptors are important in function and pathology of biological systems. In this regard, a number of receptor assay methods are needed such as identification of receptor and receptor subtypes, anatomical distributions, the frequency disease state frequency, development of receptor specific ligands, pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of the ligands. Development of new methods in receptor analysis will facilitate the discovery of "orphan" receptors and examination of relation between these receptors and diseases. One of the methods widely used in receptor analysis is radioligand binding assays. In this review, general information about the principle of radioligand binding assay, uses, role of it in development of ligand specific to the receptor, the use of ligands developed in pharmacokinetic studies, role of it in understanding of biological and pathological mechanisms and the advantages and disadvantages of it to other receptor analysis methods will be given.

Key words: Ligand, radioligand, receptor

Giriş

Genel olarak ilaçların canlı yapılarıdaki etkilerini kendilerine özel bazı noktalara bağlanarak veya buraları etkileyerek oluşturdukları kabul edilmektedir. İlaçların vücutta etkileşme gösterdikleri bu hücrel makromoleküler yapılara genel anlamda reseptör adı verilir; bunlar hücrenin ve dolayısıyla canlının hayatını devam ettirebilmesi bakımından hayati önem taşır (3,13).

İlaç reseptörlerinin yapısal ve sayısal bakımdan en önemli sınıfını hücrel proteinler oluşturur. Bu hücrel proteinler hormonlar, büyüme faktörleri, çevirim faktörleri, sinirsel araçları, metabolizma ya da düzenleme yollarının enzimleri, taşıma süreçlerine katılan proteinler, salgı glikoproteinleri ve yapısal proteinler gibi içsel dü-

zenleyici ligandlar için reseptör görevi yapar. Bu tür fizyolojik reseptörlerin işlevi, uygun içsel ligandı bağladıktan sonra yanıt olarak düzenleyici sinyali hedef hücre içine yaymaktır. Proteinler dışında, cevap oluşturmada diğer hücrel bileşenlerin spesifik bağlama özelliklerinden de yararlanılabilmektedir. Bu bağlamda nükleik asitler özellikle kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar için önemli nükleer ilaç reseptörleridir(3).

Reseptör proteinleri, periferel membran proteinleri, transmembran proteinleri veya nükleer reseptörler şeklindedir. Periferel membran proteinleri sadece ilişkili olduğu biyolojik membrana geçici olarak yapışan (yüzeye gevşek bağlanan) zar proteinleridir. Bu proteinler kendilerine bağlanan ligandın hücre içine alınabilmesi için tanımlayıcı görev üstlenir. Transmembran reseptörler hücre zarının içinde gömülmüştür, böylece dışarıdan bir ligandın bağlanması, hücrenin içi-

ne doğru sinyal transdüksiyon yolunun etkinleşmesini sağlar (6,23). Nükleer reseptörler ise hücre çekirdeğinde bulunur. Nükleer reseptörler ailesinde yer alan steroid hormon reseptörleri sürekli hücre çekirdeğine gidip gelen proteinlerdir; ligandın varlığı ve tipine bağlı olarak, farklı subsellüler yerleşme gösterirler; ligandlı ve ligandsız östrojenler ve progesteron reseptörleri büyük çoğunlukla nükleer, mineralokortikoid reseptörler kısmen sitoplazmik ve nükleer, ligandsız glukokortikoidler ve androjen reseptörler çoğunlukla sitoplazmada yerleşmiştir. Glukokortikoid ve androjen reseptörler sadece hormona bağlandıktan sonra nükleusa tam olarak geçebilirler (8). Steroid hormonlar reseptörlerine bağlanınca, aktive edilmiş reseptör DNA'daki bazı özel dizilere bağlanır ve bu yolla transkripsiyonun hızını değiştirirler (3,6,32).

Reseptör varlığının ortaya konmasında *in vitro* ve *in vivo* uygulanan farklı metodlar söz konusudur (2, 28). Reseptör tanımlanmasında en yaygın kullanılan yöntemlerin başında Radyoligand bağlanma deneyleri gelmektedir. Teknolojik gelişmeler, medikal olarak önemli proteinlerin geniş çapta görünür hale gelmesini, hatta üç boyutlu görüntüsünün elde edilmesini sağlamıştır. Yapısal biyolojideki gelişmeler, özellikle nükleer manyetik rezonans spektrofotometresinde, robotik kristallenme, kriyojenik kristal yapılabilmesi, X ışıklı kristalografi ve yüksek hızlı programlama, protein yapısını belirlemeyi kolaylaştırmıştır. Reseptör analiz yöntemlerinin etkili kullanılması ile iyi bir şekilde valide edilmiş hedef yapılar yeni ilaç geliştirme, fizyolojik ve patolojik mekanizmaların anlaşılmasında yönlendirici olabilmektedir (7,29).

Reseptör-ligandile ilgili kavramlar

Hüresel makromoleküllerin çoğunun (örneğin, antikolar, enzimler, reseptör proteinler, nükleik asitler vb) meydana getirdikleri biyolojik işlevler ligand adı verilen özgül moleküllerle etkileşimlerinin bir sonucudur. Biyokimyada ligand, bir biyomoleküle bağlanarak kompleks oluşturan bir bileşik anlamında kullanılır. Ligandın bağlanma eğilimi veya gücüne de "afinite" denir (26). İnt-rinsik aktivite veya efikasite maksimum bir fonksiyonel yanıtı oluşturabilmede ilaç reseptör bileşiminin nispi yeteneğini ifade eder. Diğer bir ifade ile ne kadar "iyi" bir agonist ilaç olduğunu anlatır. Bu tanımın afiniteden ayrılması gerekir; afinite, ilacın moleküler hedefine bağlanmasındaki yeteneğidir (24). Reseptörlere bağlanabilen ve içsel uyarıcı bileşiklerin düzenleyici etkilerini

taklit eden ilaçlara agonist (kannabinoid reseptör 2 agonisti JWH-133 gibi) denir. Tek başlarına uyarıcı etkileri olmadığı halde bir agonistin etkisini engelleyerek istenen etkileri oluşturabilen bu tür bileşiklere de antagonist (kannabinoid reseptör 1 ve 2 antagonisti kannabidiol gibi) denir (15,28).

Radyoligand bağlanma deneylerinin tanımı ve uygulama alanları

Sitokimyasal metodların en önemlisi maddelerin radyoizotoplarla işaretlenmesidir. İşaretli madde (markır) hücre veya doku içine verilir ve sonra fotoğrafla yerleri tespit edilir. Radyoaktif maddelerin yayılımından oluşan ışınlar, nükleer emülsiyon veya röntgen filmi üzerinde görüntü oluştururlar. Alternatif olarak, sintilasyon gaz dedektörlerinin son zamanlarda geliştirilmesiyle otoradyografide dijital görüntü elde edilebilir hale gelmiştir (1).

Radyoligand, reseptör, taşıyıcı, enzim veya herhangi bir proteine bağlanabilen radyoizotopla işaretlenmiş bir bileşiktir. Bağlanmanın gücü ve oranı, bağlanma alanlarının sayısı, ilaçların afinitesi ve çeşitli ilaçların keşfi için bilgi sağlar. Radyoligand bağlanma deneyleri yapılması kolaydır ve birçok alanda yararlı bilgi sağlayabilir. Fakat birçok araştırmacı radyoligand bağlanma bilgilerini yorumlama aşamasında zorlanır (18). Radyoligand bağlama, reseptör tanımlama ve onların anatomik dağılımını belirlemek için geniş çapta kullanılır. Özellikle G-protein aracılı reseptörlerin (GPCRs) analizinde kullanılmaktadır (4,5). Birçok önemli fizyolojik süreçleri yönlendiren ve tüm ilaçların yaklaşık %50'sine hedef olan 200'den fazla reseptör bu familya içerisine girer. Yaklaşık 160 belki de daha fazla yetim GPCRs insan genomunda bulunduğu ve GPCR'nin karakteristik mRNA dizilerinin olduğu, fakat iç ligandlarının hala isimlendirilmediği bilinmektedir. Bu reseptörlerin çoğu hücre hatlarında yapay olarak eksprese edilmiştir. Bu hücre hatlarında bu reseptöre bağlanan ligandlar tespit edilerek 45'den fazla reseptörün yetim olmaktan kurtarılması sağlanmıştır. Bu içsel ligandların neredeyse yarısının peptid olduğu anlaşılmıştır. Geriye kalan isimlendirilmemiş yetim reseptörlerin yaklaşık 70 kadarı peptidik bir liganda sahip olabileceği düşünülmektedir (5,30).

Ligandın radyoışaretili analogunun sentezini takiben, radyoligand bağlanma deneyleri ile reseptörü tanımlayan farmakolojik kriterler (ismi, ekspresyon yeri, doyurulabilirlik, sipesifite ve afi-

nite vb.) saptanabilir. Bir doku veya hücrede yeni bir reseptörün keşfi, olası fonksiyonları anlamada bir ipucu ve fonksiyonel deneylerin tasarlanmasına kılavuzluk yapabilir. Yeni keşfedilen taşıyıcı sistemlerin bazılarının karakteristik özelliği olarak reseptör yoğunluğu nispeten düşük olabilir. Bu nedenle dokularda çalışılan anatomik bölgeler sınırlandırılmalıdır. Bu şekilde otoradyografi ile görüntülenmesi kolaylaşır. Tüm doku veya organların homojenliğini kullanmak ise incelemeyi zorlaştırır hatta imkânsızlaştırır (5).

İlaç ve metabolitlerinin *in vivo* doku ve hücresele dağılımı hakkındaki bilgiler, ilaçların etkileri ve toksisitelerinin anlaşılması bakımından önemlidir. İlaç hedefleri ve hedef biyoyararlılık çalışmaları yüksek çözünürlüklü ve hassas metodlar gerektirir. Bu metodlar arasında en çok kullanılanlardan birisi *in vivo* ve daha hassas inceleme yapabilen mikrootoradyografi tekniğidir. İlaçların ve toksisite etkilerinin tahmin ve etkinin mekanizması anlamak için bu gibi metodlara ihtiyaç vardır. Bu yöntemin temeli radyoligand bağlanma deneyleri ile aynıdır. Reseptör mikrootoradyografi doku bütünlüğünü korur ve mikroskopik bir görüntüleme nicel analizler ve hedef alanın karakterizasyonunu sağlar (25). Yaygın olarak kullanılan ADMET (Emilim, Dağılım, Metabolizma, Boşaltım ve Zehirlilik) prosedürleri, radyoassay-HPLC ve whole-body otoradyografi ile tanımlanamadan kalan birçok hedef dokudaki reseptör, mikrootoradyografi ile keşfedilmiş ve karakterize edilmiştir. Reseptör mikrootoradyografi hassas bir yöntemdir. Düşük dozlarda toksin bileşiklerinin vücuda verilerek savunma mekanizmasının uyarılması ve harekete geçirilmesini sağlayan "Hormesis" olarak bilinen çalışmalarda kullanılabilir. Ayrıca, otoradyograf ve immunosito kimya, radyo işaretli ilaç ve antikor kombinasyonu reseptörlerin ve diğer hücresele yapıların hedef karakterizasyonunda daha iyi sonuçlar verir. Mikrootoradyografi daha iyi detay ve kesinlik ile doğrulayabilir ve düşük hassaslıktaki yöntemlerin tamamlayıcısı olabilir, ADMET öngörülerinde hataları azaltabilir. Tanı aracı olarak görev alır ve ilaç araştırmalarında ve geliştirmelerinde biyokimyasal, fonksiyonel ve kliniksel olarak takibi yönetmede yardımcı olabilir (25).

Birçok yetim GPCR reseptörleri için ya doğal ya da yapay ligandların bulunması hatırı sayılır bir çaba gerektirir. Bu gibi çalışmalarla histamin reseptörleri için iyi tanımlanmış farmakolojik ligandların reseptör alt tipleri ortaya çıkarılmıştır. Başka çalışmalarda da buna benzer birçok ye-

tim reseptör tanımlanmıştır. Örneğin, GABA-B reseptör, peptid reseptörlerle ilgili kalsitonin geni, amilin reseptör ve nikotinik reseptör gibi. Ama asıl heyecan verici çalışmalar GPCR'nin bir sınıfı olan "Eser aminle ilişkili reseptörler (TAARs)" lerin keşfidir. Bu reseptör sınıfında bulunan prokinetik reseptörleri ve nöromedin reseptörlerinin iki alt tipinin isimlendirilmesi akademisyenlerin ve ilaç sanayinin büyük ilgisini çekmiştir. Keşfedilen bu reseptörler, hücre biyolojisini ve hastalıkların mekanizmalarını anlamada yardımcı olmuştur (30).

Bir dokuda reseptör sayısı, içsel ligandların miktarına bağlı olarak değişebileceğinden reseptörlerin yoğunluğu sabit olmayabilir. G protein aracılı reseptör sisteminde, içsel ligandlarda meydana gelen bir yükselmeye karşılık dengenin sağlanması için reseptör sayısında bir düşme (down regülasyona) görülebilir. Buda fonksiyonel cevapta bir gerilemeyle sonuçlanır. Alternatif olarak, iç ligandların düşük seviyede olması karşılık dengenin sağlanması için reseptör miktarı upregülasyona uğrayabilir. Ligand bağlanma ile bu gibi değişimlerin ölçümü, son zamanlarda keşfedilmiş bir reseptör sistemini hastalık süreçleriyle ilişkilendirmek için ipuçları sağlayabilir ve başka buluşlar için öncül olabilir. Örneğin, insan arteriosklerozunda [¹²⁵I]-ghrelin reseptörleri önemli ölçüde upregülasyona uğrar (12).

İnsan ve hayvan hastalıklarında, hastalık süreci ve ilaç uygulamaları sırasında oluşan bağlanma parametrelerindeki değişiklikler, hayvan modellerinde deneysel uygulamalar ile ölçülebilir. Bunun için spesifik reseptörleri aşırı eksprese eden (overexpressed) veya hiç eksprese etmeyen (knockout) transgenik hayvanlar kullanılır. Günümüzde, gelişimsel ve letal fenotiplerden kaçınmak için hücre-spesifik knock-out hayvanlar üretilmiştir (5).

Radyoaktif işaretli tamamlayıcı oligonükleotidler veya ribonükleik asit "(riboprobe)" kullanılması ile doku kesitlerinde RNA transkriptlerinin dağılımının görüntülenmesi *in situ* hibridizasyon yöntemi olarak bilinir. Sırasıyla ³H (timidin) ve ³H (üridin) ile işaretli DNA ve RNA'nın radyoaktif prekürsörleri, hücre döngüsünün çeşitli aşamalarının zamanlanmasını belirlemek için canlı hücrelere uygulanabilir (11). *In situ* hibridizasyon ve gerçek zamanlı PZR (PCR) gibi moleküler teknikler, hücre ve dokularda yeni reseptör veya reseptör alt tiplerini kodlayan mRNA'nın varlığı konusunda kesin kanıtlar sağlayabilir. Ancak, bu metodlar proteinin gerçekten eksprese edilip edilmediğiyle ilgili bir bilgi veremez.

Reseptörler, yönlendirilmiş antikorlar kullanılarak kendi aminoasit yapılarıyla tanımlanabilirler ve fonksiyonel çalışmalar affinitenin niceliksel ölçümünü sağlayabilir fakat ligand bağlanma çalışmalarında önemli bir parametre olan reseptör yoğunluğunu (B_{max}) ölçemez. Bir reseptörün seçiciliği, translasyon sonrası değişim, diğer reseptörün varlığı veya başka bir proteinin varlığı ile değişebilir. Bunlar hastalık durumunda değişebilir ve moleküler teknikler kullanarak bu değişimler belirlenemez (5).

Ligand *in vivo* olarak verildiğinde, hedef reseptörün bulunduğu dokuya bileşiğin girişinin oranı radyoşaretli ligandın ilk karşılaşacağı engeldir. İlacın hangi çeşit güçle bağlandığı önemlidir (iyonik, kovalent veya van der Waals). Fizyolojik koşullar altında bağlanır ve hızlıca kırılır. Özgünlük, ligand ve reseptörün tamamlayıcı yüzeylerinden kaynaklanır ve ligand bağlanma

$$\text{Kısmi İşgal} = \frac{[\text{Ligand} \cdot \text{Reseptör}]}{[\text{Reseptör}]}$$

$$[\text{Ligand}] \cdot [\text{Reseptör}] / [\text{Ligand} \cdot \text{Reseptör}] = k_{off} / k_{on} = K_d$$

deneyleri kullanılarak *in vitro* olarak bu etkileşim ölçülebilir. Ligandlar bazı konsantrasyon oranlarında bir hedef reseptöre seçici olabilirler fakat yüksek dozlarda diğer reseptörlere de bağlanabilirler. Ligand ve reseptör arasındaki etkileşim ligand bağlanma deneyleriyle ölçülebilir. Bu şekilde ligandın reseptöre bağlanma afinitesi- K_d ve reseptörlerin maksimum yoğunluğu- B_{max} gibi iki önemli parametre hesaplanabilir (4). Ligandın reseptöre bağlanma afinitesi (K_d), aynı zamanda ligandın denge ayrılma sabiti olarak da ifade edilir (21).

Radyoligand bağlanma deneyleri

Radyoligand bağlanma deney analizlerinin çoğu Kütle Hareket Kanunu olarak bilinen basit bir modele dayanır (18).

Ligand+Reseptör = Ligand.Reseptör

Modele göre:

- Ligand ve reseptör karşılaştığında yeterli enerji ve doğru yönelimle bağlanma meydana gelir. Bağlanma hızı (Ligand). (Reseptör). K_{on} 'a eşittir. Bu denklemde K_{on} , $M^{-1} \text{min}^{-1}$ biriminde bağlanma hızı sabitidir.
- Bağlanma meydana geldiğinde, reseptör ve ligand birbirine olan afinitesi oranında bir süre bağlı kalır. Ayrılma hızı (her birim

zamanda ayrışmanın sayısı) $[\text{Ligand} \cdot \text{Reseptör}] \cdot k_{off}$ 'a eşittir. Bu denklemde k_{off} ayrışma hızı sabitidir ve birimi min^{-1} dir.

- Ayrışmadan sonra reseptör ve ligand ilk halini alır.
- Ayrışma oranı ile bağlanma oranı eşit hale geldiğinde denge sağlanır.

$$[\text{Ligand}] \cdot [\text{Reseptör}] \cdot k_{on} = [\text{Ligand} \cdot \text{Reseptör}] \cdot k_{off}$$

Denge ayrışma sabitesi anlamına da gelen K_d reseptörlerin yarısını işgal eden ligand konsantrasyonunu gösterir. Birimi mol/L veya molar (M)'dir. Küçük K_d değeri ligandın reseptöre ilgisinin fazla olduğunu, büyük K_d değeri ise reseptöre ligandın afinitesinin düşük olduğunu gösterir. Denge ayrışma sabitesi olan K_d ile ayrışma hızı sabiti olan k_{off} birbirinden farklıdır ve aynı birimle ifade edilmezler.

$$\frac{[\text{Ligand} \cdot \text{Reseptör}]}{[\text{Reseptör}] + [\text{Ligand} \cdot \text{Reseptör}]}$$

Kütle hareket kanunu ligand konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak dengede kısmi reseptör işgalini tahmin eder. Kısmi işgal, liganda bağlanan reseptörlerin bölümünü ifade eder.

$[\text{Ligand}] = 0$ olduğunda, işgal sıfıra eşittir. $[\text{Ligand}]$ çok yüksek olduğunda (K_d 'nin birkaç katı) kısmi işgal 1.00'e yaklaşır. $[\text{Ligand}]$ miktarı yükseldikçe doygunluğa yaklaşım daha yavaşlar. Ligand miktarı K_d 'sinin dört katına eşit olduğunda denge halinde reseptörlerin sadece yüzde 80'i işgal edilecektir. Ligand konsantrasyonu K_d 'nin dokuz katına eşit olduğunda işgal yüzde 90'a yükselir. Denge halinde reseptörlerin yüzde 99'unu işgal etmek için K_d 'nin 99 katına eşit konsantrasyon alınmalıdır (18).

Kütle Hareket Kanununa Özgü Varsayımlar:

Kütle hareket kanunu bir kanun olarak isimlendirilmesine rağmen, aşağıdaki varsayımların üzerine kurulmuş basit bir modeldir:

- Tüm reseptörler eşit olarak ligandlara erişebilir.
- Tüm reseptörler ya boşta (bağlanmamış) ya da liganda bağlıdır.
- Model parsiyel bağlanmanın herhangi bir durumunu rededer.
- Ne ligand ne de reseptör bağlanma ile farklılaşır.

• Bağlanma dönüşümlüdür. Bu varsayımların oluşmaması durumunda, iki seçenek ile devam edilir. Birinci seçenek daha karmaşık bir model oluşturmaktır. Diğer seçenek ise olağan yoldan bilgileri analiz etmektir (14).

Radyoligand bağlanma deneylerini gerçekleştirebilmek için radyo işaretli ligandlar üretilmesi gerekmektedir. Reseptörleri karakterize etmede kullanılan radyo işaretli ligandlar *in vitro* ortamda kullanılacak şekilde 1960'lı yıllarda üretilmiştir. Bu ligandlar genellikle düşük yoğunlukta ancak yüksek aktiviteye sahip ligandlardır. Son zamanlarda, pozitron veya tek foton emisyon tomografi (SPECT) cihazları için geliştirilen radyoligandlar insan ve hayvan reseptörlerinin *in vivo* görüntülenmesini sağlamaktadır (4). Her zaman istenildiği kalitede radyoligand üretilmesi bu deneylerin doğru sonuç vermesi bakımından önemlidir.

İdeal olarak, radyoışaretleme için ligand adayları aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır:

- Yüksek afinite (K_D 1nM veya daha az) spesifik olmayan bağlanmadan çok spesifik bağlanma yapmalı,
- Düşük spesifik olmayan bağlantı yapmalı,
- Düşük reseptör yoğunluğunu belirlemek için yüksek spesifik aktivite sahip olmalı,
- Reseptör özgünlüğü olmalı,

Reseptörlerin *in vivo* olarak görüntülenmesi için kullanılan radyo ligandların aşağıdaki özelliklere sahip olması gerekir;

- Kan beyin bariyerinin radyoligandapermeabilitesi,
- Düşük metabolizma oranı,
- Düşük toksisite (4),

Yüksek özgül aktiviteye ve saflığa sahip radyo işaretli bileşikler reseptör otoradyografinin temelsurudur. Radyoligand bağlanma çalışmalarında bazı örnek radyoizotoplar:

- *Tritium-ışaretili bileşikler* tercih edilir ve özel bir şekilde işaretlenmelidir.
- ^{14}C -ışaretili bileşikler reseptör bağlanma çalışmaları için uygunluğu azdır. Çünkü tritium-ışaretili bileşiklerle kıyaslandığında oldukça düşük spesifik aktiviteye sahiptirler. Ayrıca, 3H - ve ^{125}I -ışaretili bileşiklerden daha düşük otoradyografik çözünürlük sağlar.
- ^{125}I -ışaretili bileşikler kısa yarı ömrü olduğu için uygundur. Çok yüksek spesifik aktivite kısa maruz kalma zamanı ile mümkün olur. Bunların dışında diğer radyoizotoplar (^{131}I -, ^{14}N -

ışaretili gibi) da kullanılmıştır; ancak, bunların spesifik aktivite ve çözünürlüklerinde bazı kısıtlamalar olduğu bildirilmiştir (25).

Rayoligand bağlanma deneylerinde genellikle doku homejenatından kısmi olarak arındırılmış plazma membran bölümleri, reseptör geni transfekte edilmiş hücreler, taze olarak izole edilmiş veya üretilmiş hücreler gibi doku preparatları kullanılır. Ayrıca, taze olarak dondurulmuş doku kesitleri kullanılabilir. Özellikle doku kesitleri radyografi için uygundur (5). *In vivo* çalışmalarda fare, sıçan yaygın olarak kullanılır. Radyoışaretili ilaç verildikten sonra doku örnekleri kesilerek alınır ve özel dondurma teknikleri ile muhafaza edilir (25).

Üç tip radyoligand bağlanma deneyi vardır.

1. Dozurma bağlanma deneyleri: Dozurma bağlanma deneyleri, reseptör sayısını ve afinitesini belirlemek için denge halinde radyoligandın değişen konsantrasyonlarında spesifik bağlanmayı ölçer. Analiz inkubasyonun dengeye ulaşması varsayımına dayanır. Bu birkaç dakikadan birkaç saate varan sürede gerçekleşir. Liganda, reseptöre, ısıya ve diğer deneysel koşullara bağlıdır. Küçük dozdaki radyoligandın dengeye ulaşması çok zaman alır (12,18).

Ligand fizyolojik olarak ilgi duyduğu reseptörlerin yanısıra reseptör olmayan bölgelerde bağlanabilir. Bir radyoligand deneyi gerçekleştirilirken hem toplam hemde nonspesifik bağlanmayı ölçmek gerekir. Spesifik bağlanma, toplam bağlanmadan nonspesifik bağlanmayı çıkararak hesaplanır (16,18).

Tüm reseptörlere bağlanan işaretlenmemiş bileşiklerin bir konsantrasyonunun varlığında radyoligand bağlanmayı ölçerek nonspesifik bağlanma elde edilir. Tüm reseptörler işaretlenmemiş ilaçlar tarafından işgal edildiği için radyoligand sadece nonspesifik olarak bağlanır (20).

İşaretlenmemiş ligand olarak, radyoligand olarak kullanılan bileşiğin aynısı ve işaretlenmemiş olarak kullanılır. Birçok durumda, diğer ilaçların reseptöre bağlanması bilinmediği için bu gereklidir. Fakat çalışılan reseptörlere bağlandığı bilinen standart bir ilaç da nonspesifik bağlanmayı belirlemede kullanılabilir (18).

İşaretlenmemiş ilacın konsantrasyonu, neredeyse tüm spesifik radyoligand bağlanmayı önleyecek kadar kullanılması istenir. Fakat bunun belirlenmesi zordur. İyi tanımlanmış bir reseptör ile çalışılıyorsa, reseptörün K_d 'sinin yüz katına eşit miktarda işaretlenmemiş bileşik kullanmak pratik bir yöntemdir (18).

2. Yarışmalı bağlanma deneyleri: Yarışmalı bağlanma deneyleri, farklı konsantrasyonlardaki işaretlenmemiş ligandın varlığında tek işaretlenmiş ligand konsantrasyonunun bağlanmasını ölçer (12). Yarışmalı bağlanma deneyleri:

- Bir deneyi doğrular. Fonksiyonel deneylerden bilinen ilaçların etki güçlerini yarıştıır. Bu ilaçların umulan etki gücü veya en azından umulan güç sıralaması ile bağlandığını gösterir, radyoligandın doğru reseptöre bağlanıp bağlanmadığının saptanmasında yardımcı olur (18).
- İlacın reseptöre bağlanıp bağlanmadığını belirler. Reseptöre bağlanan ilaçları bulmak için binlerce bileşik görüntülenebilir. Bu diğer görüntüleme metodlarına göre kolay ve hızlıdır (16).
- Reseptörlere düşük afinite gösteren ilaçların etkileşimi araştırılabilir. Radyoligand bağlanma sadece yüksek afiniteye sahip radyoligand olduğunda yararlıdır ($K_d < 100$ nM). Düşük affiniteli bir ligand genellikle yüksek ayrışma hız sabitine sahiptir ve bu yüzden filtreler yıkanırken reseptöre bağlı kalmayacaktır. Eğer düşük afiniteli ligandlarla çalışmak istenirse ligand işaretlenmemiş bir yarışmacı olarak kullanılır.
- İşaretlenmiş ve işaretlenmemiş ligand olarak aynı bileşik kullanılır ve reseptör sayısı ve afinitesi belirlenir (18).

3. Kinetik bağlanma deneyleri

3.1. Ayrışma deneyleri: Bir ayrışma deneyi, reseptörden ayrılan radyoligand için "ayrışma hızı" nı ölçer (16). Ayrışma deneyleri:

- Ligand ve reseptörün etkileşimini tam olarak karakterize etmede kullanılır.
- Kütle hareket kanunu uygulanırlığını doğrulamada kullanılır.
- Deneysel protokolu oluşturmada yardımcı olur. Ayrışmanın hızlı olması durumunda, örnek hızlı bir şekilde yıkanmalı ve filtrelenmelidir. Buna dikkat edilmemesi durumunda ise önemli ölçüde ayrışma meydana gelebilir. Filtreyi yıkamak için kullanılan tamponun ısı düşük olması tavsiye edilir. Ayrışmanın yavaş olduğu durumda ise örnekler yavaş bir şekilde filtrelenmelidir ve bu şekilde yıkama sırasında meydana gelen ayrışma minimum düzeye düşürülür (18).

Ayrışma hız deneyini gerçekleştirmek için ilk başta ligand ve reseptörün bağlanmasına izin verilir yani dengeye ulaşması sağlanır. Bu noktada radyoligand ve reseptörün diğer bağlanma-

ları engellenir. Ayrışma başladıktan sonra reseptörden ligandın ne kadar hızda ayrıldığını saptamak için belirli zamanlarda ölçüm yapılır (16,18).

3.2. Bağlanma deneyleri:

Bağlanma deneyleri:

- Bağlanma hız sabitesinin belirlenmesinde kullanılır.
- Reseptör ile ligand arasındaki etkileşimi karakterize etmede yararlıdır.
- Doyurma ve yarışma deneylerinde dengeye ulaşmanın ne kadar süre alacağını belirleme de önemlidir.

Çalışmada radyoligand eklenir ve çeşitli zamanlarda spesifik bağlanma ölçülür (14,18).

Radyoligand çalışmaları birçok reseptör karakterizasyonu ve ligand analizinde kullanılmıştır. Mussap ve ark. (19) köpeklerde idrar kesesi kasında takinin reseptörlerini radyoligand bağlanma deneyi ile karakterize etmişlerdir. Bir diğer çalışmada, Tsukahara ve ark. (27) yohimbin ile yaptıkları bağlanma çalışmasında köpeklerin serebral arterlerindeki α_2 adrenoreseptörlerini incelemişler ve serebral arterlerde iki farklı alttipi (α_{2H} , α_{2L}) olduğunu bulmuşlardır. Meini ve ark. (17) bu metod ilekinin B₂ reseptör farmakolojisinde hayvan türleri arasındaki farklılıkları araştırmışlardır. Buna benzer bir çalışma olarak Geizen ve ark.(10), köpeklerde ticagrelor, clopidogrel ve prasugrel (P2Y₁₂ plateletlerin yüzünde bulunan protein; reseptör antagonisti; plateletlerin toplanmasını sağlar) maddelerinin affinitelerini radyoligand bağlanma deneyi ile karşılaştırmışlardır.

Yoshino-Furukawa ve ark. (31) nörokinin-1 (NK(1)) reseptör antagonisti FK886'in farmakolojik özelliklerini insan NK(1) reseptörleri ekspres eden çin hamster ovarium hücrelerinde çalışmışlardır. Fishback ve ark. (9) σ_1 reseptör için *in vivo* ve *in vitro* olarak kullanılabilecek bir ligand geliştirmiş ve bu ligandın incelemesini radyoligand bağlanma denemeleri ile yapmışlardır. Başka bir çalışmada, köpek P2RX7 reseptörlerinin insan ve sıçan P2RX7 reseptörlerine benzerlikleri araştırılmıştır. Bu çalışmada, köpek P2RX7 reseptörlerine afinite duyan bir antagonist radyoligand kullanılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre, araştırmacılar insan yerine köpeğin bu antagonistin toksikolojik değerlendirme çalışmalarında kullanılabileceğini saptamışlardır (22).

Sonuç

Transmembran reseptörleri üzerine yapılan çalışmalarda radyoligand bağlanma deneyleri oldukça fazla kullanılmaktadır. Ancak, bir reseptörün analizinde kullanılacak yöntemler o reseptörün çeşidine göre değişiklik gösterebildiği gibi, görüntüleme kalitesi, hedef noktanın konumu, güvenilirliği, hassasiyeti, maliyet ve laboratuvar olanakları gibi faktörlerde yöntemin önceliğini değiştirebilir. Günümüzde radyoligand bağlanma deneyleri ile yeni reseptör ve reseptör alt tipleri keşfedilebilir, bunlar için ligand geliştirilebilir ve ligandın karakterizasyon çalışmaları yapılabilir. Hastalık ile reseptör etkileşimi araştırılabilir. Dolayısı ile uzun zamandır kullanılan ligand bağlanma deneyleri halen popülaritesini kaybetmemiştir. Son yıllarda bilgisayar destekli radyoligand görüntüleme sistemlerinin geliştirilmesiyle daha sağlıklı ve kaliteli reseptör görüntülemelerin elde edilebilirliği, pek çok biyolojik sistemin çözülmesinde bilim insanlarına büyük katkı sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Barthe N, Coulon P, Hennion C, Ducassou D, Basse-Cathalinat B, Charpak G. Optimization of a new scintillation gas detector used to localize electron emitted by ^{99m}Tc . J Nucl Med 1999; 40(5): 868-75.
2. Baydan E, Kartal M, Yurdakök B, Aslan Erdem S, İnce S, Ekici H, Alp H. Contractile effects of *Eryngium kotschy* Boiss. on rat isolated ileum and detrusor muscle. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2014; 20(5): 779-85.
3. Buxton LLO. Farmakokinetik ve farmakodinamik: İlaç emilimi, dağılımı, metabolizması ve eliminasyonun dinamiği. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. eds. In: Goodman ve Gillman Tedavinin Farmakolojik Temeli. Ankara: Nobel Tıp Kitapevi, 2006; s: 1-39
4. Davenport AP, Russell FD. Radioligand binding assays: Theory and practice. Mather SJ eds. In: Current Directions in Radiopharmaceutical Research and Development. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 1996; pp.169-79.
5. Davenport AP, Kuc RE. Radioligand-binding and molecular-imaging techniques for the quantitative analysis of established and emerging orphan receptor systems. Davenport Totowa AP. eds. In: Methods in Molecular Biology. Receptor Binding Techniques. NJ: Humana Press Inc, 2005; pp. 93-120
6. Demirpençe E. Steroidhormonlar. Erişim: <http://www.msxlab.org/forum/biyoloji/218070-steroid-hormonlar.html#ixzz2GdTKPUAJ>, Erişim tarihi: 31.12.2012.
7. Drews J. Drug discovery: A historical perspective. Science 2000; 287(5460): 1960-64.
8. Echeverria PC, Picard D. Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. BBA-Mol Cell Res 2010; 1803(6): 641-9.
9. Fishback JA, Mesangeau C, Poupert JH, Mccurdy CR, Masumoto RR. Synthesis and characterization of [3H]-SN56, a novel radioligand for the σ_1 receptor. Eur J Pharmacol 2011; 653(1-3): 1-7.
10. Giezen JJ, Berntsson P, Zachrisson H, Björkman J. Comparison of ticagrelor and thienopyridine $p2y_{12}$ binding characteristics and antithrombotic and bleeding effects in rat and dog models of thrombosis/hemostasis. Thromb Res 2009; 124(5): 565-71.
11. Jin L, Lloyd RV. In situ hybridization: Methods and applications. J Clin Lab Anal 1997; 11(1): 2-9.
12. Katugampola SD, Pallikaros Z, Davenport AP. [^{125}I -His 9]-ghrelin, a novel radioligand for localizing GHS orphan receptors in human and rat tissue; Up-regulation of receptors with atherosclerosis. Br J Pharmacol 2001; 134 (1):143-9.
13. Kaya S, Ünsal A. İlaçların etkileri. Kaya S. eds. In: Veteriner Farmakoloji. Birinci Cilt. Ankara: Medisan Yayınevi, 2002; s.89-121.
14. Leysen JE, Langlois X, Heylen L, Lammertsma AA. Receptors: Binding assays. Stolerman IP. eds. In: Encyclopedia of Psychopharmacology. New Delhi: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010; pp. 1438-47
15. Limbird, LE. Cell Surface Receptors: A Short Course on Theory and Methods, Second Edition. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, 2003; pp. 1-5
16. Malany S, Hernandez LM, Smith WF, Crowe PD, Hoare SRJ. Analytical method for simultaneously measuring *ex vivo* drug receptor occupancy and dissociation rate: Application to (r)-dimethindene occupancy of central histamine H_1 receptors. J Recept Signal Transduct Res 2009; 29(2): 84-93.
17. Meini S, Cucchi P, Catalani C, Bellucci F, Santicoli P, Giuliani S, Maggi CA. Radioligand binding characterization of the bradykinin B_2 receptor in the rabbit and pig ileals

- mooth muscle. *Eur J Pharmacol* 2010; 635 (1):34-9.
18. Motulsky H. The graph pad guide to analyzing radioligand binding data, http://fisbio.biof.ufrj.br/restrito/bioEstatistica/90_top_especiais/radiolig.pdf, Erişim tarihi: 23.08.2013.
 19. Mussap CJ, Geraghty DP, Burcher E. Tachykinin receptors: A radioligand binding perspective. *J Neurochem* 1993; 60(6): 1987-2000.
 20. Qume M. Overview of ligand-receptor binding techniques. KeenM. eds. In: *Receptor Binding Techniques*, Totowa NJ: HumanaPressInc, 2005; pp. 1-24.
 21. Pan AC, Borhani DW, Dror RO, Shaw DE. Molecular determinants of drug-receptor binding kinetics. *Drug Discov Today* 2013; 18(13): 667-73.
 22. Roman S, Cusdin FS, Donfria E, Goodwin JA, Reeves J, Lappin SC, Chambers L, Walter DS, Clay WC, Michel AD. Cloning and pharmacological characterization of the edog P2X7 receptor. *Br J Pharmacol* 2009; 158 (6): 1513-26.
 23. Singer SJ. Some early history of membrane molecular biology. *Annu. Rev Physiol* 2004; 66: 1-27.
 24. Stephenson RP. A modification of receptor-theory. *Br J Pharmacol Chemother* 1956; 11 (4): 379-93.
 25. Stumpf WE. Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2005; 51(1): 25-40.
 26. Temizkan G. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler: Genel bakış, Temizkan G. Arda N. eds. In: *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008; s. 340-50
 27. Tsukahara T, Taniguchi T, Usui H, Miwa S, Shimohama S, Fujiwara M, Handa H. Sympathetic denervation and alpha adrenoceptors in dog cerebral arteries. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1986; 334(4): 436-443.
 28. Tutun H. Sıçanlarda sipermetrin toksisitesine bağlı karaciğer hasarında CB2 agonisti JWH-133'ün sağaltıcı etkisinin araştırılması. Doktora tezi, Ankara Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2016; 1-105.
 29. Tutun H, Baydan E. İlaç geliştirmede reseptör analizinin önemi. *MAKÜ Sag Bil Enst-Derg* 2016; 4(1): 42-49.
 30. Wise A, Jupe SC, Rees S. The identification of ligands at orphan g-protein coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44(1): 43-66.
 31. Yoshino-Furukawa T, Maeda Y, Kikuchi A, Sakuma H, Imazumi K, Yamakuni H, Sogabe H, Matsuo M, Manda T, Uchida W. Pharmacological properties of FK886, a new, centrally active Neurokinin-1 receptor antagonist. *Biol Pharm Bull* 2013; 36(1): 76-81.
 32. Yurdakök B, Baydan E. Sirkadiyanritim ve sitokrom p450 enzimleri. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg* 2011; 6(2): 157-62.

Sorumlu Yazar:

Dr. Öğr. Üyesi Hidayet TUTUN
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı,
Burdur-TÜRKİYE
E-posta: hidayettutun@gmail.com



Sütte Antibiyotik Kalıntı Durumunun İncelenmesi

Ömer Tolga YILMAZ¹, Harun HIZLISOY², Nurhan Ertaş ONMAZ¹, Serhat AL¹, Yeliz YILDIRIM¹,
Zafer GÖNÜLLALAN¹

¹Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı,
Kayseri-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veteriner Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Özet: İnsan sağlığı açısından en büyük sorunlardan biri antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların sayılarının artmasıdır. Antibiyotiklerin kontrolsüz bir şekilde süt veren hayvanlara uygulanması direnç gelişiminin en önemli sebeplerindedir. Bunun sonucunda beşeri hastalıkların tedavisi gecikmekle birlikte insanlarda astım vb. alerjik reaksiyonların artışına, çevrede dirençli mikroorganizma sayısının artmasına ve süt gibi önemli hayvansal ürünlerin kalitesini bozarak ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu çalışmada, önemli hayvansal ürünlerden biri olan sütte antibiyotik kalıntı durumu hakkında literatür bilgisi sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik, kalıntı, süt, tespit metotları

The Investigation of Antibiotic Residues in Milk

Summary: The increase in antibiotic resistant microorganisms is one of the biggest problems in terms of human health. In this context, the uncontrolled use of antibiotics in milk feeding animals is one of the most important reasons for resistance development. As a result, it causes the delay in the treatment of human diseases, the increase in allergic reactions such as asthma in humans, the increase in the number of resistant microorganisms in the environment, the disruption in the quality of important animal products such as milk and economic losses. In this study, the literature on antibiotic residue status in milk which is one of the important animal products was reviewed.

Key words: Antibiotic, detection methods, milk, residues

Giriş

Beslenme açısından yeri doldurulamaz öneme sahip olan süt ve süt ürünleri, bazı durumlarda istenmeyen kalıntıları içerebilir. Bu kalıntılar; veteriner ilaçları, pestisitler, mikotoksinler, ağır metaller, dioksin ve kimyasal madde kalıntıları gibi tüketici sağlığını olumsuz etkileyen maddelerdir (18). Bu kimyasal maddeler sanayi ve/veya zirai atıkların sonucu olarak sütte bulunmaktadır (13). İnsan sağlığını kısa, orta ve uzun vadede olumsuz etkileyecek olan bu kimyasalların tamamına yakını dokularda birikerek insan sütüne dahi geçebilmektedir (29). İnsan gıdası olarak sunulan hayvansal ürünlerde kalıntı sorununun bilimsel çalışmalara konu olması, 20. yüzyılın başlarına kadar dayanmaktadır. Beyaz yılan kökü (*Ageratine altissima*) bitkisini tüketen sığırların sütleri ve etleri vasıtasıyla insanlarda zehirlenme belirtileri görülmüştür. Araştırmalar bu bitkide bulunan tremetol toksininin zehirlenmelere sebep olduğunu ortaya çıkarmıştır (11).

Süt veren hayvanlarda meme enfeksiyonlarının sağaltımında penisilinlerin kullanılmaya başlanması ile birlikte, duyarlı insanlarda akut sistemik anafilaksi şekillendiği bildirilmiştir. Süt veren hayvanlarda penisilin kullanımının, sütteki starter kültürlerin gelişmesini inhibe etmesi sonucu ekonomik yönden ciddi zararlara yol açtığı anlaşılmıştır (11). Gıdalarda kalıntı sorununa dikkat çeken organizasyonların başında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) gelmektedir. Gıda ile ilgili birçok kuruluş bu konuda gerekli önlemlerin alınması hususunda; Veteriner Hekimleri, ilaç üreticilerini, hayvan yetiştiricilerini ve kamuoyunu bilgilendirici yol izlemektedirler (43). Türkiye'de ise, Avrupa Birliği'nin (AB) kabul ettiği önlemler çerçevesinde, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından Ulusal Kalıntı İzleme Planı (UKİP) oluşturulmuştur. Hayvan türlerine göre belirlenen madde ve ürün grupları ile bu maddelerdeki kalıntı tespiti için alınacak önlemler bahsi geçen bakanlık tarafından uygulamaya konulmuştur. Uygulanan bu programlar için, Avrupa Birliği mevzuatı (96/23/EC ve 96/22/EC sayılı Konsey Direktifleri ile 98/179/EC sayılı Konsey Kararı)

ile uyumu sağlanmış Türk Mevzuatı bağlayıcı niteliktedir (14). Sütte antibiyotik kalıntılarının tolere edilebilir maksimum değerleri aşmaması, mümkünse tamamen ortadan kaldırılması, insan sağlığını olumsuz etkilememesi ve ekonomik kayıpların yaşanmaması öncelikli hedeflerdendir. Üretimden tüketime kadar gıda güvenliğinin sağlanması kapsamında yapılan çalışmalar ve etkin denetimler sayesinde, antibiyotik kalıntı riskinin ortadan kaldırılması mümkün olabilecektir (13).

Sütün tanımı ve kimyasal bileşimi

Süt, tüm memeli canlıların gebeliği takiben meme bezlerinde oluşturdukları biyolojik bir sıvıdır. Süt, hemen hemen tüm besin maddelerini bünyesinde barındırır. Süt salgısının asıl amacı yeni doğan yavrunun temel besin ihtiyaçlarını karşılamak ve immünojenik olarak yavruyu dış dünyaya adapte etmektir (35). Günümüzde insanların

beslenme kültüründeki farklılıklar ve coğrafi etkiler göz önünde bulundurulduğunda süt; inek, koyun, keçi, manda, deve ve tek tırnaklı hayvanlardan temin edilmektedir. Dünyada sütünden en fazla istifade edilen hayvan inektir. İnek sütünün en fazla üretilen süt olmasının nedenlerinden birkaçı; kaba bitkisel yemlerle beslenebilmesi, uysal olmaları, insanların besinlerine ortak olmamaları ve laktasyon süresinin uzun olmasıdır (35). Çeşitli tür sütlerin ana besin öğelerine ait ortalama veriler Tablo-1 de gösterilmiştir.

Sütte, yağda eriyen A, D, E ve K vitaminler ile suda eriyen C ve B vitaminler yer almaktadır. Bu vitaminlerden yağda eriyenleri (A, D, E ve K) sütteki yağ miktarı ile doğrudan ilgilidir (22). Tablo-2 de inek sütünün içerdiği vitaminler ve günlük ihtiyaç hakkında bilgi verilmiştir.

Tablo 1. Çeşitli tür hayvanlara ait sütlerin ana besin öğelerine ait ortalama veriler (4)

Süt Türü	Kuru madde (%)	Süt yağ (%)	Protein (%)	Laktoz (%)	Kül (%)
İnsan	12.4	3.8	1.0	7.0	0.2
İnek	12.6	3.7	3.4	4.7	0.7
Manda	17.2	7.4	3.5	5.4	0.8
Koyun	19.3	7.4	5.5	4.8	1.0
Keçi	13.2	4.5	3.2	4.1	0.8
Kısrak	11.2	1.9	2.5	6.2	0.5
Deve	13.6	4.5	3.6	5.0	0.7
Kedi	17.9	3.3	9.1	4.9	0.6
Domuz	20.5	8.8	7.3	3.3	1.1
Ren Geyiği	33.3	16.9	11.5	2.8	1.4
Balina	37.5	22.0	12.0	1.8	1.7

Tablo 2. Yağlı inek sütünün (%3) içerdiği vitaminler, miktarları ve günlük ihtiyaç (22)

Vitaminler	Miktar/L	Günlük İhtiyaç
A (IU)	1300	5000
B1 (mg)	0.4	1,3
B2 (mg)	1.4-1.8	1,7
B3 (mg)	0.87	15
B6 (mg)	0.6-1.5	2
B12 (mg)	2-5	2.4
Biotin (µg)	30 – 40	30
C (mg)	5 – 28	82,5
D (IU)	40	200-600
E (mg)	0.6	9
Folik asit (µg)	50	400
K (mg)	0.32	0,11
Pantotenik asit (mg)	2.8 – 3.6	5

İnsan gıdası olarak sütün önemi

Süt, yavrunun doğumundan itibaren adeta yeterli ve dengeli beslenebilmesi için hazırlanmış bir besin maddesidir. Dengeli beslenme, vücudun ihtiyacı olan enerji ve besin öğelerinin yeteri kadar alınmasıdır. Süt, insan tüketimi için tam manasıyla bütün bir besin kaynağıdır (38). Aynı zamanda süttten üretilen; yoğurt, peynir, tereyağı, kefir, süt tozu vb. ürünler de diyetle almamız gereken esansiyel bileşikler için kaynak teşkil etmektedir. Süt ve süt ürünlerinde bulunan ve organizma için elzem besin maddelerinden bazıları; proteinler, kalsiyum, fosfor, magnezyum, sodyum, yağda eriyen vitaminler (A, D, E, K) ve suda eriyen vitaminler (B kompleks ve C vitamini) olmak üzere sıralanabilir (20). Özellikle çocuklar için sütün besleyici değeri yüksektir. Süt içme alışkanlığını küçük yaşta kazananların immun sistemleri, diğer bireylere göre daha dirençli olduğu bilinmektedir. Küçük yaşlarda edinilen süt içme alışkanlığı sayesinde, ileri yaşlarda ortaya çıkabilecek osteoporoz (kemik erimesi) riskini de azaltabilmek mümkündür (12). Günümüzde süt tüketimi ile hastalıklar arasındaki ilişki, bazı araştırmacıların ilgisini ziyadesiyle çekmektedir. Süt tüketimi; obezite, hipertansiyon, kanser, iskelet ve kas sistemi bozuklukları gibi hastalıklarla ilişkilendirilip araştırmalara konu olmaktadır. Devamlı ve düzenli süt tüketimi sayesinde, tansiyon dengelenmekte, kilo kontrolü sağlanmakta, immun sistem aktif halde tutulmakta ve diş çürüklerinin önüne geçilebilmekte olduğu ortaya konulmuştur (12,40). Süt, bünyesinde bulundurduğu immunoglobulinler, enzimler, enzim inhibitörleri, büyüme hormonları ve faktörleri, antibakteriyel ajanlar, yağ asitleri, vitamin ve minerallerden oluşan tam anlamıyla organizma için mükemmel bir besindir (39).

Antibiyotikler ve etki şekilleri

Antibiyotikler çeşitli mikroorganizmalar tarafından sentez edilen ve diğer mikroorganizmaların gelişimini engelleyen veya onları öldüren çeşitli kimyasal maddelerdir (9). Günümüzde birçok antibiyotik sentetik ve yarı sentetik olarak üretilmektedir. Çeşitli hastalıkların antibiyotikler yolu ile tedavi edilmesine 17. yüzyılda başlamış olup, bilimsel temele oturtulması ise 19. yüzyılda Paul Ehrlich'in "seçici toksik etki" kavramını ortaya atması sonucu oluşmuştur. Antimikrobiyel sağaltım 1935 yılında Domagk'un sülfonamidleri kullanması ile gelişme sürecine girmiştir. Alexander Fleming'in 1929 yılında bulduğu ve 1940 yılında Chain ve Flarey'in çalışmaları sonucu, *Penicillium notatum*'dan elde ettiği bir maddenin biyosit etkili olduğunun anlaşılması üzerine penisilinler ile tedavi devri başlamıştır. Bu olay 1945 yılında Alexander Fleming, Chain ve Flarey'e Nobel Ödülünü kazandırmıştır (28). Antibiyotikler mikroorganizmayı öldüren (bakterisidal) ve mikroorganizmaların gelişimini durduran (bakteriyostatik) olarak etkinlik gösterirler. Bakterisidal antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) bakteri üremesini durdurduğu en düşük yoğunluk (EKEY) ve minimum bakterisit konsantrasyon (MBK) bakteriyi öldürdüğü en düşük yoğunluk (EKÖY) değerleri ile bakteriyostatik antibiyotiklerin öngörülen tedavi dozunda MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) değerleri vardır. Bir antibiyotiğin MBK değeri MİK değerinden daha yüksektir. Bu değerlerin birbirine yakınlığı antibiyotiğin etkinliğinin çok iyi olduğunu gösterir. Bakteriyostatik etki mikroorganizmaların çoğalmasını ve gelişimini yavaşlatır ve/veya durdurur. Bu mikroorganizmalar vücudun immun sistemi tarafından bertaraf edilir (37).

Tablo 3. Antibiyotiklerin etki derecelerine göre sınıflandırılması (1, 2)

Bakteriyostatikler	Bakterisidler
Tetrasiklinler	Beta-Laktamlar (Penisilinler, Sefalosporinler, Monobaktamlar, Karbapenemler)
Makrolidler	Beta-Laktamaz İnhibitörleri (Sulbaktam, Tazobaktam, Klavulanik Asid)
Sülfonamidler	Polipeptidler
Amfenikoller	Florokinolonlar
Linkozamidler	Vankomisin
Metronidazol	Rifamisin
Mikonazol	Teikoplanin
	Aminoglikozidler
	Nitromidazoller
	İmipenem

Antibiyotiklerin sınıflandırılması

Antibiyotikler vücut sıvılarında oluşturdukları konsantrasyonlarda, mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine göre iki gruba ayrılır. Tablo-3'te antibiyotiklerin etki derecelerine göre sınıflandırılması gösterilmiştir.

Veteriner sahada antibiyotiklerin kullanım amaçları

Antibiyotikler ilk olarak 1940'dan itibaren süt sığırlarında sağaltım amacı ile kullanılmaya başlanmıştır. İlerleyen yıllarda gelişimi hızlandırdığı ve yemden yararlanmayı artırdığı tespit edilmiş ve antibiyotikler bu alanda da kullanılmaya başlanmıştır. Antibiyotikler, profilaktik ve gelişmeyi artırıcı olarak, subterapötik seviyelerde hayvanların yemlerine ve sularına katılmak suretiyle oral olarak kullanılmıştır. Bu kullanım başta mikrobiyel direnç olmak üzere pek çok konuda sorunların ortaya çıkmasına sebebiyet vermiştir. Bu yüzden profilaktik ve subterapötik kullanım yasaklanmıştır (21). Veteriner sahada en çok kullanılan antibiyotikler olarak; betalaktam grubu, tetrasiklinler, makrolidler, sülfonamidler, spektinomisin, linkozamid, kloramfenikol ve florokinolonlar bildirilmiştir (5). Hayvansal gıdalarda ilaç kalıntı sorununun; antibiyotiklerin arınma sürelerine dikkat edilmemesi, kullanılacak olan hayvan türünde güvenilirliğinin test edilmemiş olması, araştırmaların henüz tamamlanmamış olması ve prospektüs dışı (belirtilen dozdan daha fazla veya daha uzun süre) kullanım ile meydana geldiği bildirilmiştir (2). Antibiyotikler, organizmada tam manasıyla metabolize edilemedikleri için doku ve organlarda birikim şekillenmektedir. Hayvanlarda antibiyotiklerin yanlış ve bilinçsiz kullanılması sonucu zararlı etkiler meydana gelebilmektedir. Bu zararlı etkiler; doku ve organ hasarı, immun sistemin basılması/uyarılması, antibiyotiğe dirençli suşların gelişimi ve gıdalarda kalıntı sorunu olarak karşımıza çıkabilmektedir (45).

Antibiyotiklerin sütte bulunma nedenleri

Antibiyotikler hayvanlara; kas içi, damar içi, meme içi, uterus içi, yem ile beraber, oral veya kombine bir şekilde olmak üzere uygulanabilmektedir. En yaygın ve etkili uygulama yolları damar içi, kas içi ve meme içi uygulamalardır. Özellikle meme enfeksiyonlarının tedavilerinde genellikle meme içi ve damar içi infüzyon tercih edilmektedir (15).

Sütte antibiyotik kalıntısının en önemli sebebinin meme enfeksiyonunun tedavisinde uygun olmayan şekilde kullanılan meme içi infüzyonlar ol-

duğu, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından belirtilmiştir. Meme içi antibiyotik uygulamasının ilaç prospektüsünün dışına çıkılarak yapılması ve arınma sürelerine dikkat edilmemesi sonucu, süte yoğun miktarlarda antibiyotik geçişi meydana gelmektedir (32). Genel başlıklar altında sütte antibiyotik kalıntısı bulunma sebepleri olarak aşağıdakileri sıralayabiliriz.

- Prospektüs bilgilerine uyulmaksızın antibiyotik uygulaması
- Tedavi edilen hayvanın kayıtlarının tutulmaması
- İlaç klirensinin uzaması
- Süt sağım ekipmanlarının antibiyotiklerle kontaminasyonu
- Kontamine sütün, sağlıklı sütlerin bulunduğu tanklara ilavesi
- Sadece antibiyotik uygulanan meme lobunda ilaç kalıntı sürelerine uyulması ve diğer loblardan sağılan sütlerin tüketime sunulması
- Kuru dönemde tedavi uygulanan hayvanın erken doğum yapması ve ilaç arınma süresi dolmadan laktasyonun başlaması
- İlaç verildiği bilinmeyen laktasyondaki hayvanların satın alınıp sağılması
- Birden fazla antibiyotiğin kombine kullanılması (10).

Antibiyotiklerin süte geçiş mekanizması ve bunlara etkileyen faktörler

Meme dokusunda bulunan kan-süt bariyeri hastalık durumunda permabilitesini değiştirerek antibiyotiklerin süte geçişine izin verir. Antibiyotiklerin süt salgısına; pasif difüzyon, ortak taşıyıcı, intersellüler difüzyon ve pH farklılık teorisi ile geçtiği bildirilmiştir (30). Bir araştırmada mastitisli ve sağlam memeye, meme içi antibiyotik uygulaması yapılmış, sağlam memeden sağılan sütle mastitisli memeden sağılan süt örnekleri karşılaştırılmış ve mastitisli memeden sağılan sütte daha fazla miktarda antibiyotik kalıntısı tespit edilmiştir (17). Sütlerde kalıntı sorununun %90'ı mastitis tedavisinde meme içi antibiyotiklerin kullanılması ve sütlerin antibiyotiklerden arınma sürelerine uyulmadan tüketime sunulmasından kaynaklanmaktadır (41). Antibiyotiklerin süte geçişini etkileyen birtakım faktörler vardır. Bunlar; hayvanın antibiyotiğe maruz kalma süresi, antibiyotiğin türü, dozu ve formülasyonu, antibiyotiğin verilme yolu, hayvanın ırkı, memenin sağlık durumu, sağım sayısı ve mevsimlere bağlı olarak değişebilmektedir (17).

Maksimum kalıntı limitleri (MKL)

Günümüzde bilinçsiz ve yersiz ilaç kullanımını takiben birçok sorun meydana gelmektedir. Bu sorunların en önemlisi ve en başta geleni, toplum sağlığının olumsuz etkilenmesidir. Bunların önlenmesi amacı ile çeşitli otoriteler tarafından kalıntı standartlarının belirlenmesi gündeme gelmiştir. Maksimum kalıntı limitleri hem insan tüketimine, hem de hayvan tüketimine sunulacak gıdalar için izin verilebilir veteriner ilacı veya metabolitlerin miktarlarını belirlemektedir (44). Bazı farmakolojik ajanların ise gıda değeri taşıyan ve sağılan hayvanlarda kullanımları tamamen yasaklanmıştır (33). Kalıntı sorununun yattığı ve yaratacağı etkilerin ortadan kaldırılması ya da en az seviyelere çekilebilmesi için, Dünya Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) bünyesindeki Codex Alimentarius komisyonu tarafından yapılan bilimsel çalışmalar sonucunda, veteriner ilaçları için çeşitli organ ve dokulardaki Maksimum Kalıntı Limitleri (MKL) belirlenmektedir (2). Codex Alimentarius Komisyonu 1985 yılından bu yana gıdalarda bulunabilecek çeşitli farmakolojik etkili ajanlar için kalıntı standartları belirlemekte ve bu standartları bilimsel veriler ışığında güncellemektedir (11). Bu limitlerin belirlenmesindeki en temel amaç, çeşitli kimyasallardan arınmış ya da kimyasallar yönünden belirli miktarları içeren sağlıklı gıdalara toplumların ulaşabilmesini sağlamaktır. Eğer bu limitler sürekli olarak aşılsa ve kalıntı izleme programlarına yeterince önem verilmez ise, gelecekte toplum sağlığı yönünden büyük tehlikeler bizleri beklemektedir (2). Tablo-4 da bazı antibiyotikler için MKL gösterilmiştir (34).

Antibiyotik kalıntısının tespitinde kullanılan yöntemler

Gıdalarda antibiyotik kalıntılarının saptanması amacı ile kalitatif ve kantitatif yöntemler mevcuttur. Bunlar dört ana kategoride; mikrobiyolojik

inhibisyon analizleri, immunolojik yöntemler, biyosensörler ve kromatografik yöntemler olarak sınıflandırılmaktadır (16). Yapılan bir araştırmaya göre gıdalarda antibiyotiklerin belirlenmesinde kullanılan analitik yöntemlerin tercih edilme oranları; %38 Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (LC/MS), %18 Liquid Chromatography/Ultraviolet (LC/UV), %18 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), %8 Biyosensörler, %6 Elektroferezis ve %12 si ise diğer analiz metotları vasıtası ile gerçekleştirilmektedir. Yine başka bir araştırmada ise gıdalarda bulunan antibiyotik çeşitleri Tablo-5 de görüldüğü üzere bir dağılım göstermektedir (5).

Tablo 5. Gıdalarda tespit edilen antibiyotik türleri (5)

No	Antibiyotikler	Dağılım (%)
1	Sülfonamidler	20
2	Kinolonlar	19
3	Aminoglikozitler	15
4	Fenikoller	15
5	B-Laktamlar	15
6	Diğerleri	16

1. Mikrobiyolojik inhibisyon analizleri: Mikrobiyolojik inhibisyon analizleri, genellikle numunedeki mikroorganizma ve antibiyotik etkileşimi sonucu şekillenen kalitatif ve yarı kantitatif metotlardır. Bu analizlerin avantajları; düşük maliyetli, güvenilir ve kolay uygulanabilir olmalarıdır. Mikrobiyolojik inhibisyon testleri çok geniş bir spekturumda antibiyotik testleri için kullanılan ve ortalama üç saat gibi bir sürede sonuç veren yöntemlerdir (16). Mikrobiyolojik inhibisyon analizinde, katı veya sıvı ortamda test mikroorganizmalarının standart kültürü kullanılır. Bu kültürlerle örnek olarak; *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Sarcina lutea*, *Escherichia coli*, *Bacillus*

Tablo 4. Bazı antibiyotikler için maksimum kalıntı limitleri (34)

Antibiyotik	Maksimum Kalıntı Limiti
Ampisilin	4 mg/kg
Benzilpenisilin	4 mg/kg
Eritromisin	40 mg/kg
Gentamisin	100 mg/kg
Kanamisin	150 mg/kg
Klavulanik asit	200 mg/kg
Seftiofur	100 mg/kg
Streptomisin	200 mg/kg
Tetrasiklin	100 mg/kg
Trimetoprim	50 mg/kg

cereus ve *Streptococcus thermophilus* bakterileri gösterilebilir (5). Analiz edilmek için alınan süt numunesi agar yüzeye uygulanır ve ortam içerisindeki numunenin yayılması için plaklar inkübasyona bırakılır. Eğer numune antibiyotik içeriyor ise test edilen mikroorganizmaların gelişimlerinin baskılandığı gözlemlenir (24).

2. Biyosensörler: Biyolojik sistemle kombine edilen sensör sistemleridir. Biyosensör, biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesi sonucu geliştirilen biyoanalitik cihazlardır. Bir biyosensör, temel olarak bir biyoalgılama materyali ve bir transdüser içerir. Biyosensörler, biyolojik ve kimyasal etken maddelerinin tespitinde kullanılmaktadırlar (6). Ayrıca, tarımsal üretim, gıda işleme, çevresel izleme faaliyetlerinde, hayvanlarda ve gıdalarda, pestisitler, antibiyotikler, patojenler, toksinler ve daha fazlasını hızlı, spesifik, hassas ve düşük maliyetli bir biçimde tespit edebilirler (43). Gıda alanında, biyosensörler, gıda bileşenlerinin kalite kontrolleri ve gıda güvenliği için mikrobiyal ve kimyasal içeriklerin tespiti gibi birçok uygulama alanı bulmuşlardır (19).

3. İmmunolojik yöntemler: İmmunolojik yöntemler; hassas, seçici ve basit olmaları yanında uygulama maliyetleri açısından hesaplı, kantitatif ve yarı-kantitatif yöntemlerdir. Bu analizler gıda kalıntıları hakkında geniş bilgi verirler. Bu özelliklerinden dolayı geniş kullanım alanı bulmaktadırlar (16). İmmunolojik yöntem, antikor ve antijen arasındaki spesifik reaksiyon sonucuna dayanmaktadır. Enzyme-Immuno Assay (EIA) veya ELISA gibi immunolojik yöntemler, fiziksel ve kimyasal yöntemlere göre hızlı, kolay ve çok örnekle çalışılan yöntemlerdir. Bu yöntemler, hedef moleküle özel olarak geliştirilmiş antikorların kullanılması nedeni ile yüksek hassasiyete sahiptir (24), yüksek güvenilirlikte sonuç verir ve numune hazırlanması bakımından kolay yöntemlerdir. Birden fazla antibiyotik kalıntısının aynı anda ve hızlı bir şekilde tespitine olanak sağlar (42).

4. Kromatografik yöntemler: Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit, diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. Yöntem; karışımın gözenekli bir ortamda ve hareketli bir çözücü etkisiyle, karışım bileşenlerinin farklı hareketleri sonucu birbirinden ayrılması olgusuna dayanır. Hareket eden faza hareketli faz, bahsedilen gözenekli

ortama ise adsorban veya sabit faz denir (36). Sütte kalıntı tespitinde kantitatif olarak; Liquid Chromatography (LC), Gas Chromatography (GC), Thin Layer Chromatography (TLC) ve High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) sık kullanılan kromatografik yöntemlerdendir (27).

Sütte antibiyotik kalıntılarının neden olabileceği sorunlar

Sütte antibiyotik kalıntısı belli başlı sorunları da beraberinde getirmektedir. Bu sorunlar; ilaç alerjileri, farmakolojik etki, karsinojenik etki, gıda endüstrisine etkisi, dirençli suşların ortaya çıkması, cinsiyet özelliklerinin değişmesi ve gastrointestinal sistem mikrobiyotasındaki değişiklikler olarak belirtilmiştir (46).

1. Sağlıkla ilgili sorunlar: İlaçların büyük bir kısmı, bağışıklık sistemini uyararak farklı tiplerde alerjik tepkimelere yol açmaktadır. Aynı şekilde bu ilaçları içeren sütleri tüketen bireylerde de bu tip alerjik reaksiyonlar meydana gelebilmektedir. Penisilinlerin çok küçük dozları anafilaksi sonucu ölümlere yol açabilmektedirler (25). Kloramfenikoller uzun süre ve düşük dozlarda alan bireylerde, ölümcül olabilecek derecede kemik iliğinin baskı altına alınması sonucu aplastik anemi şekillenebilmektedir (3).

Bakterilerde protein sentezini engelleyen oksitetrasiklin ve kloramfenikol gibi antibakteriyel ilaçlar, memeli lenfositlerinde de protein sentezini engelleyerek bağışıklık sisteminin baskılanmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda uzun süreli antibiyotik kalıntısı içeren gıdaları tüketen kişilerde enfeksiyon tehlikesi gözlenebilmektedir (31).

Fransa'da 1990 yılında klenbuterol tedavisi gören danaların karaciğerini tüketen 22 kişide, klenbuterol'ün farmakolojik etkisine rastlanmıştır (26). Deney hayvanlarında yapılan çalışmalar sonucu karsinojenik etkiye sahip ilaçların, gıda değeri taşıyan hayvanlara uygulanmasına izin verilmemektedir. Karsinojenik etkiye sahip ilaç kalıntısı içeren gıdaların tüketilmesi sonucu, tüketen bireylerde de aynı etki meydana gelebilmektedir. Karsinojenik etkiye sahip ilaçlar; kloramfenikol, nitrofuranlar, imidazoller, bazı sülfonamidler ve kolşisin olarak sıralanabilirler. Bağırsak mikrobiyotasında bulunan bakteriler sindirime yardımcı olmanın yanı sıra denge unsuru olarak patojen bakterilerin dominant hale geçmelerinin önünde çok güçlü bir engel teşkil etmektedirler. Bağırsak mikrobiyotasında 400'den fazla bakteri türü mevcuttur. Antibiyotik kalıntısı

içeren gıdaları tüketen bireylerde özellikle; *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Clostridium* spp., *Ruminococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp. ve *Peptococcus* spp. arasındaki ekolojik denge bozulmakta ve patojen mikroorganizmaların çoğalıp hastalık oluşturmasına zemin hazırlanmaktadır (46).

2. Dirençli suşların gelişimi: Mikrobiyel direnç, bakterinin antimikrobiyel ilaçlara karşı gösterdiği bakterisidal veya bakteriyostatik etkisini ortadan kaldırmasıdır. Antimikrobiyal direnç gelişimi ve yayılımı, amacına uygun olmayan biçimlerde kullanılan antibiyotikler neticesinde hız kazanmıştır (2).

Sütte antibiyotik kalıntısının en önemli sorunlarından birisi de dirençli suşların gelişmesi ve hastalık durumunda antimikrobiyal tedavinin sonuç vermemesidir. Antibiyotik kalıntısı içeren sütleri sürekli olarak tüketen bireylerde patojen mikroorganizmaların direnç kazanmaları kaçınılmazdır (7). Sürekli antibiyotik uygulanan ve bu hayvanlardan elde edilen gıdalar tüketime sunulduğunda, zehirlenmelere sık rastlanılmaktadır. Bunun sebebi dirençli mikroorganizmaların gıdadaki mevcudiyeti ve immun sistemin bu dirençli mikroorganizmaları bertaraf edememesidir (46). Mikroorganizmalarda direnç; doğal ve kazanılmış olarak meydana gelmektedir. Doğal direnç; kalıtsal özellikte olmayan, mikroorganizmanın yapısından kaynaklı direnç şeklidir. Antimikrobiyel maddenin bakteride bağlanacağı hedef molekül olmadığından bakteri doğal olarak dirençlidir. Örneğin birçok Gram negatif bakteri vankomisine ve metisiline, enterokoklar da sefalosporine duvar yapılarından dolayı doğal direnç gösterirler. Kazanılmış direnç ise sonradan kazanılan direnç tipidir. Kazanılmış dirençte bakteriler, antimikrobiyal madde ile ilk temasında etkilenmektedirler. Bu durum süreklilik arz ederse antimikrobiyel direnç şekillenir. Antimikrobiyelle direncin esas kaynağını kazanılmış direnç şekillendirmektedir. Genetik direnç, kromozom, plazmid ve transpozon kontrolünde olmakla beraber, mikroorganizmalar bunların birini ya da birkaçını kullanarak dirençli hale gelebilmektedir (23).

3. Ekonomik sorunlar: Artan dünya nüfusunun besin gereksinimlerini karşılamak için gıda üretimini artırmaya yönelik yöntemler geliştirilmektedir. Entansif hayvan yetiştiriciliği bu yöntemlerden birisidir. Mevcut kaynakların sınırlı, insan ihtiyaçlarının sınırsız olması ve bu kaynakların kötü üretim sonucu kullanılamaması ekonomik

kayıplara yol açmaktadır. Bu durum süt üretimi yapan çiftliklerde de benzerlik göstermektedir. Üretilen sütlerin antibiyotik kalıntısı içermesi ve endüstriyel olarak sütün, süt ürünlerine dönüştürülebilmesi büyük bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Antibiyotik kalıntısı içeren sütlerde bakteri kültürleri baskılanmakta ve sütlerden fermente süt ürünleri elde edilmesini zorlaştırmaktadır. Özellikle peynirde birçok kusurun meydana gelmesine sebep olmaktadır. Bunların kötü tat oluşumu, istenmeyen tekstür oluşumu, arzu edilmeyen şekilde gözenek oluşumu ve istenmeyen bütirik asit fermantasyonlarının meydana gelmesi şeklinde olduğu bildirilmektedir (46).

Sütte antibiyotik kalıntılarının aynı zamanda starter olmayan laktik asit bakterilerini de inhibe ettiği ve çiğ süttten üretilen peynirlerde daha az tat ve aroma oluşumuna sebep olduğu bildirilmektedir (11). Özellikle penisilin grubu antibiyotikler süt endüstrisinde starter kültürlerin aktiviteleri üzerine olumsuz etkilidirler. Sütte bulunan 0.01 IU/mL penisilin değerinin asit üretimini geciktirdiği ve starter kültürlerin üremesinin büyük ölçüde engellendiği saptanmıştır. Sütün penisilin kalıntıları yönünden güvenilir ve tüketilebilir olması için ise bu değer 0.005 IU'den fazla olmaması gerektiği bildirilmiştir (8).

Sonuç ve Öneriler

Gıdalarda antibiyotik kalıntı probleminin çözümü için birtakım önlemlerin alınması gerekmektedir. Bu önlemler ana başlıklar şeklinde;

- Üreticilerin bilgilendirilmesi ve kayıt tutmalarının sağlanması,
 - İlaç takip sisteminin oluşturulması, reçetesiz ilaç satışının önüne geçilmesi
 - Yetiştiricilerin antibiyotiklere kolay ulaşabilmesinin engellenmesi
 - Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından kalıntı izleme programının etkinliğinin artırılması
 - Hekimlerin duyarlı olması, gereksiz antibiyotik uygulamalarından kaçınması
 - Süt toplama merkezlerinin standardizasyonu
 - Hızlı sonuç veren test kitlerinin kullanımının yaygınlaştırılması,
- olarak sıralanabilir.

Kaynaklar

1. Akkan G. Antibiyotiklerin sınıflandırılması. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu. Mayıs, 2-3, 1997; İstanbul-Türkiye.
2. Bayar İ. Hayvansal gıda örneklerinde penisilin grubu bazı antibiyotik kalıntılarının belirlenmesine yönelik kitosan bazlı sorbentlerin hazırlanması, Yüksek Lisans tezi, Dokuz Eylül Üniv Fen Bilimleri Enstitüsü İzmir, 2014; pp.1-21.
3. Bilandžić N, Kolanović BS, Varenina I, Scortichini G, Annunziata L, Brstilo M, Rudan N. Veterinary drug residues determination in raw milk in Croatia. Food Control 2011; 22(12): 1941-8.
4. Büyükkılıç D, Arpacioğlu H. Süt ve Ürünleri Sanayinde Verimlilik ve Firmalar Arası Karşılaştırma. Ankara: Milli Prodüktivite Merkezi Yayınları, 1990; p. 9-10.
5. Cháfer-Pericás C, Maquieira A, Puchades R. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. Trends Analyt Chem 2010; 29(9): 1038-49.
6. Coulet PR. What is a biosensor? Blum LJC, Coulet PR. eds. In: Biosensor Principles and Applications. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker Inc 1991; pp. 1-6
7. Elizabeta DS, Zehra HM, Biljana SD, Pavle S, Risto U. Screening of veterinary drug residues in milk from individual farms in Macedonia. Mac Vet Rev 2011; 34(1): 5-13.
8. EMEA. Committee for Veterinary Medicinal Products. Penicillins. Summary. Report, 2000.
9. Evaggelopoulou NE, Samanidou VF. Development and validation of an HPLC method for the determination of six penicillin and three amphenicol antibiotics in gilthead seabream (*Sparus aurata*) tissue according to the European Union Decision 2002/657/EC. Food Chem 2013; 136: 3-4.
10. Filazi, A. Yurdakök, B. Antibiyotik tedavisi sonrası sütte kalıntı sorunu ve bu sorunun belirlenmesinde kullanılan testler. Türkiye Klinikleri J Vet Sci 2010; 1(1): 34-43.
11. Geçer B. Pastörize ve UHT sütlerde antibiyotik kalıntılarının HPLC yöntemi ile belirlenmesi, Yüksek Lisans tezi, Ankara Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2006; p.1.
12. Gennari C. Calcium and vitamin D nutrition and bone disease of the elderly. Public Health Nutr 2001; 4(2b): 547-59.
13. Girma K. Review on milk safety with emphasis on its public health. World J Dairy Food Sci 2014;9(2): 166-83.
14. Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü. Ulusal Kalıntı İzleme Planı. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ankara: 2015.
15. Honkanen-Buzalski T, Reybroeck W. Antimicrobials, monograph on residues and contaminants in milk and milk products. Brussels: IDF, 1997; pp.26-33.
16. Kantiani L, Farré M, Barcelo D. Analytical methodologies for the detection of B-lactam antibiotics in milk and feed samples. Trends Analyt Chem 2009; 28(6): 729-42.
17. Karaçal F. Ankara piyasasında satılan sütlerde bazı antibiyotik kalıntıları. Doktora tezi, Ankara Ü. Sağlık Bilimler Enstitüsü, Ankara 2004; pp.1-12.
18. Khaniki, GR. Chemical contaminants in milk and public health concerns: A review. Int J Dairy Sci 2007; 2(2): 104-15.
19. Li Y. Section 2.3 Biosensors Chapter 2 Hardware, Axel Munack eds. In: CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI Information Technology. Edited by CIGR-The International The International Commission of Agricultural Engineering St. Joseph, Michigan, USA: 2006; pp. 52-93.
20. Majjala K. Cow milk and human development and well-being. Livest Prod Sci 2000; 65: 1-18.
21. Mitchell JM, Griffiths MW, McEwen SA, McNab WB, Yee AJ. Antimicrobial drug residues in milk and meat: Causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. J Food Protect 1998; 61(6): 742-56.
22. Özkan B. Pastörize sütün A ve D vitamin kayıplarının incelenmesi ve A-D vitaminlerince zenginleştirilmesi. Yüksek Lisans tezi, İstanbul Teknik Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2002; pp. 27-9.
23. Öztürk R. Antimikrobik ilaçlara karşı

- direnç gelişme mekanizmaları ve günümüzde direnç durumu. Tabak F, Öztürk R, Aktuğlu Y. eds. In: Akılcı antibiyotik kullanımı ve erişkinde toplumdan edinilmiş enfeksiyonlar. İstanbul: İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, 2002; 31: pp. 83-100.
24. Padol AR, Malapure CD, DompleVD, Kamdi BP. Occurrence, public health implications and detection of antibacterial drug residues in cow milk. *Environment Int J Sci Tech* 2015; (10): 7-28.
 25. Pennacchio A, Varriale A, Esposito MG, Scala A, Marzullo VM, Staiano M, D'Auria S. A rapid and sensitive assay for the detection of benzylpenicillin (PenG) in milk. *PloS one* 2015; 10(7): e0132396.
 26. Pulce C, Lamaison D, Keck G, Bostvironnois C, Nicolas J, Descotes J. Collective human food poisonings by clenbuterol residues in veal liver. *Vet Hum Toxicol* 1991; 33(5): 480-1.
 27. Ramírez A, Gutiérrez R, Díaz G, González C, PérezN, Vega S, Noa M. High-performance thin-layer chromatography–bioautography for multiple antibiotic residues in cow's milk. *J Chromatograp* 2003; 784(2): 315-22.
 28. Saraç Y. İstanbul'da satışa sunulan içme sütlerinde antibiyotik kalıntı düzeylerinin araştırılması. Yüksek Lisans tezi, İstanbul Aydın Üniv Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2015; p. 1-16.
 29. Sonawane BR. Chemical contaminants in human milk: An overview. *Environ Health Perspect* 1995; 103(6): 197-205.
 30. Sökücü S. Laktasyonda ilaç kullanımı ve bebekteki etkileri. *Ankem Derg* 1987;1(3): 330-5
 31. Şanlı Y. Hayvan yetiştiriciliğinde antibakteriyel ilaç kullanımı ve çok yönlü sakıncaları. Türkiye'de Veteriner İlaçları Üretimi, Pazarlanması, Güvenli Kullanımı ve Kalıntı Sorunları Sempozyumu, Ekim, 13-14, 1994; Ankara-Türkiye.
 32. Şen F. İnek sütlerinde bazı penisilin kalıntılarının HPLC yöntemiyle belirlenmesi. Doktora tezi, Ankara Üniv Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2013; pp.1-15.
 33. T.C. Resmî Gazete. *Gıda Değeri Olan Hayvanlara Uygulanması Yasak Olan Maddeler Hakkında Tebliğ*.19.12.2002 (24968).
 34. T.C. Resmî Gazete.Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. 04.05.2012 tarih (28282).
 35. Tekinşen, OC, Tekinşen KK. Süt ve Süt Ürünleri Temel Bilgiler, Teknoloji, Kalite Kontrolü. Konya: Selçuk Üniversitesi Basımevi 2005; pp.1-3.
 36. Tiryaki O. Method validation for the analysis of pesticide residues in grain by thin-layer chromatography. *Accred Qual Assur* 2006; 11(10): 506-13.
 37. Traş B, Yazar E, Elmas M. Veteriner Hekimliğinde İlaç Kullanımında Pratik ve Akılcı Yaklaşım. Konya: Selçuk Üniversitesi Basımevi 2007; pp. 29-36.
 38. Tripaldi C, Martillotti F, Terramoccia S. Content of taurine and other free amino acids in milk of goats bred in Italy. *Small Ruminant Res* 1998; 30 (2): 127-36.
 39. Ünal RN, Besler HT. Beslenme Sütün Önemi. Ankara: Sağlık Bakanlığı Yayınları, 2008; pp. 7-18.
 40. Vaskonen T. Dietary minerals and modification of cardiovascular risk factors. *J Nutr Biochem* 2003;14(9): 492-506.
 41. Wang J, Leung D, Lenz SP. Determination of five macrolide antibiotic residues in raw milk using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agricult Food Chem*, 2006; 54(8): 2873-80.
 42. Wang J, MacNeil JD, Kay JF. Chemical analysis of antibiotic residues in food. New Jersey, USA: Wiley-Blackwell, 2011; p. 38.
 43. WHO and FAO. Dietary Exposure Assessment of Chemicals in Food. Consultation Annapolis, Maryland, USA: Report of a Joint World Health Organization (WHO)/Food and Agriculture Organization (FAO), 2005; p. 88.
 44. WHO. Guidelines On Situation Analysis For Public Health Pesticide Management. 2005; pp.22.

45. Yarsan E, Tayar M. Veteriner Halk Sağlığı. Bursa: Dora Basım Yayım Dağıtım, 2014; p. 131-2.
46. Yarsan E. Hayvansal Gıdalarda Kalıntı Sorunu. Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni 2012; 6: 1-8.

Sorumlu Yazar:

Dr. Öğr. Üyesi Harun HIZLISOY
Erciyes Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Veteriner Halk Sağlığı ABD.
Kayseri, Türkiye
Tel: 0505 918 49 44
E-posta: harunhizlsoy@hotmail.com



Genel Bakış: Eksozomlar ve Bazı Parazit Protozoon Enfeksiyonlardaki Rollerini

Abdullah İNCİ, Mübeccel OKUR, Önder DÜZLÜ, Alparslan YILDIRIM

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Özet: Ekstraselüler veziküller (EVs), eksozomlar da dahil olmak üzere hücreler arası doğrudan temas olmadan bilgi alışverişini mümkün kılan hücreler arası iletişim için temel araçlardır. Eksozomlar, multivezikül cisimlerin (MVBs) plazma membranı ile kaynaşmasından sonra salınan, 30-100 nm çapında endositik kökenli nano keseciklerdir. EV'ler, çok yakın zamana kadar sadece hücreler arası metabolizmanın bir yan ürünü olarak görülürlerdi. Ancak son zamanlarda yapılan yeni keşifler ve üretilen yeni bilgiler bu algının değişmesine yol açmıştır. Bu yeni keşiflerde EV'lerin hücre-hücre iletişimi, sinyal iletimi, genetik materyallerin taşınması ve immün yanıt modülasyonu gibi geniş bir biyolojik aktivite yelpazesinde yer aldıkları gösterilmiştir. Farklı kökenlere sahip olan bu veziküller, düzenleyebildikleri proteinler, DNA, mRNA'lar ve miRNA'lar gibi biyoaktif molekülleri kendi kargolarıyla hedef hücrelere taşırlar ve hastalık patogenezinde de önemli rol oynarlar. Yakın zamandaki çalışmalar, Malaria, Chagas hastalığı ve uyku hastalığı gibi insan hastalıklarından sorumlu olanlar da dahil olmak üzere hücre içi ve hücre dışı gelişim aşamalarında protozoon parazitlerin de benzer mekanizmaları kullandıkları gösterilmiştir. Protozoon parazitler, kendi popülasyonları içerisinde iletişim kurmak, büyümeyi teşvik etmek, bulaşmaya neden olmak, konağın bağışıklık sisteminden kaçmak ve mikro çevreyi manipüle etmek için hücre dışı vezikülleri salgılamaktadırlar. Mevcut veriler ışığında, hastalıkların teşhisinde bir marker, tedavide hedeflenen bir terapötik ajan olarak görülmenin yanında konak patojen ilişkisi, ilaç dirençliliği ve aşı geliştirilmesinde kullanılabileceklerine dair geniş ve önemli bir bakış açısı sağlamıştır. Bu derlemede eksozomların biyogenezini, kompozisyonunu ve bazı protozoon enfeksiyonlardaki farklı rollerini üzerine güncel bilgilerin sunulması amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Eksozomlar, ekstraselüler veziküller, parazit, protozoon

An Overview: Exosomes and Their Roles in Some Parasite Protozoan Infections

Summary: Extracellular vesicles (EVs) are known to be one of the basic tools of cellular communication, making it possible to exchange information without direct cell-to-cell contact, including exosomes which are endocytic nano vesicles, 30-100 nm in diameter, released after the fusion of multivesicular bodies (MVBs) with the plasma membrane. EVs, until very recently, were only seen as a by product of cellular metabolism. However, recent discoveries and new information have led to this change. In these new discoveries, EVs have been shown to be involved in a wide range of biological activities such as cell-cell communication, signal transmission, transport of genetic material and immune response modulation. These vesicles, which have different origins, carry bioactive molecules such as proteins, DNA, mRNAs and miRNAs, and they can regulate to their target cells with their own cargoes and play an important role in disease pathogenesis. Recent studies have shown that protozoan parasites use similar mechanisms in intracellular and extracellular developmental stages including those responsible for human diseases such as Malaria, Chagas disease and sleeping sickness. The protozoan parasites secrete extracellular vesicles to communicate within their populations, encourage growth, cause transmission, run away from the immune system of the environment, and manipulate the microenvironment. In the light of available data, a marker in the diagnosis of diseases has provided a broad and important view that they can be used as a therapeutic agent targeted in therapy as well as in host pathogen association, drug resistance and vaccine development. In this review, it is aimed to present current information on the biogenesis, composition and different roles of exosomes in some protozoan infections.

Key words: Exosomes, extracellular vesicles, parasite, protozoa

Giriş

Hücreler arası iletişimde görev yapan eksozomlar, ilk olarak Pan ve Johnstone tarafından 1983 yılında tanımlanmıştır. Bu araştırmacılar, yaptıkları çalışmalarında koyun retikülositlerinin eritrositlere dönüşmesi sırasında, transferrin reseptörü-

nün kaybını ve transferrin reseptörünün endozomal orijinli nanoveziküllere dönüştüğünü keşfetmişlerdir (57). Hücrelerin, işlevlerini sürdürmek amacıyla birbirleriyle iletişim kurdukları bilinmektedir. Hücre içi iletişim, hücre-hücre teması veya lipidler, proteinler, nükleotidler gibi salgılanan spesifik moleküllerin değişimi yoluyla gerçekleştirilir (63). Son yirmi yılda, hücreler arasında etkileşim için yeni bir mekanizma olarak plazma

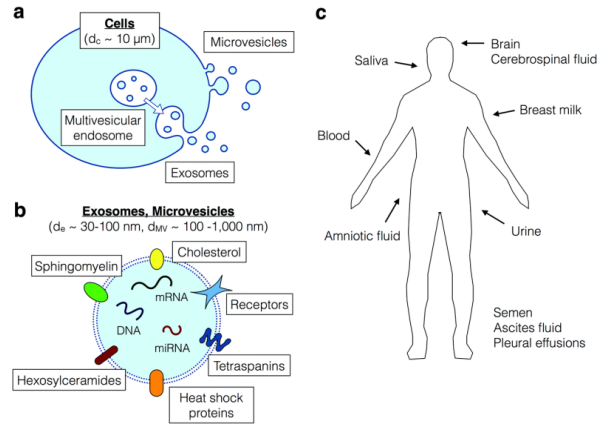
zarından köken alan ekstraselüler veziküllerin (EVs) keşfi, ökaryotik hücrelerdeki önemli biyolojik rollerinin anlaşılmasına yardımcı olmuştur. EV'ler, fosfolipid çift katmana bağlı oluşumlar olup, 0.1-1 µm arasında büyüklük gösteren nano veziküllerdir. Bu veziküller neredeyse tüm hücre tiplerinden izole edilmektedir (7). Bunlar ayrıca tükürük, kan, anne sütü, idrar, beyin omurilik sıvısı, bronko alveolar lavaj sıvısı ve sperma gibi vücut sıvılarında da bulunmaktadır (6,7). Proteinler, lipidler ve nükleik asitleri taşıyan EV'ler çeşitli fonksiyonlar, morfolojik özellikler ve biyogenez yolları açısından sınıflandırılmaktadır (79). Bu hücre dışı kesecikler, hücre kaynaklarına göre eksozomlar, multivezikül cisimler (MVBs), apoptotik cisimler, retrovirüs benzeri cisimler olarak adlandırılmaktadır (19). EV'ler, vektörlerle bulaşan parazitlerin yaşam döngülerinin eşeyli ve eşeysiz gelişme evrelerinde, parazitin değişik stratejiler geliştirerek değişik ortamlarda kalıcı olmalarına katkı sağlarlar. Bu tür karmaşık yaşam döngüsü stratejileri, değişen çevrelere hızlı adaptasyon gerektirir, parazitler bu değişikliklere cevap vermek ve konakta kalıcılık sağlamak için çeşitli stratejiler geliştirmiştir. EV'ler, konağın bağışıklık yanıtını düzenlemek ve parazit popülasyonunda algılama mekanizmaları sağlamak için parazit konak etkileşiminde belirgin bir rol oynamaktadır. Apicomplexan parazitlerden *Plasmodium*, *Babesia*, *Cryptosporidium*, *Isoospora*, *Sarcocystis* ve *Toxoplasma*, kinetoplastid parazitlerden *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma gambiense*, *Leishmania* spp.'lerde eksozom veya eksozom benzeri veziküllerin varlığı ve patojenitesi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (47,53).

Eksozomların biyogenezi

Eksozomlar, endolizozomal yolağın bir parçası olarak oluşurlar; bu yol endositik veziküller, erken endozomlar, geç endozomlar ve lizozomlardan oluşmaktadır (39). İlk basamak, hücre yüzeyindeki proteinlerin, kathrin bağımlı veya kathrin bağımsız bir şekilde ortaya çıkabilen içe tomurcuklanma süreçleri ile endositozu içermektedir (76). Oluşan endositik veziküller, hafif iç asidik pH'ya sahip olan ve hücrenin dışında bulunan erken endozomlara aktarılır. Erken endozomlar protein maddesini değiştirerek ve buna bağlı olarak iç asidik pH'yı azaltarak geç endozomlara dönüşürler (77). MVB'leri oluşturmak için, çekirdeğin yakınında bulunan geç endozomlar, intraluminal veziküllere (ILVs) yol açan endosomal lümenlere geçerler. Aynı hücre içeri-

sinde farklı kolesterol düzeylerine sahip MVB popülasyonlarının bir arada bulunması iki farklı sonuç doğurmaktadır. Kolesterol bakımından zengin MVB'ler, eksozomları serbest bırakmak için plazma membranı ile kaynaşırken, kolesterol açısından zayıf MVB'ler, lizozomal yolda proteinleri bozmak için lizozomlarla kaynaşma eğilimindedir (Şekil 1) (63).

MVB'lerden eksozom oluşumu, şu ana kadar tanımlanmış iki yolla gerçekleşmektedir: 1. ESCRT (taşınma için gerekli endozomal sıralama kompleksleri) ve 2. ESCRT'den bağımsız mekanizmadır. ESCRT'ye bağlı mekanizma, ESCRT-0, I, II ve III gibi alt yapıları tarafından gerçekleştirilmektedir. ESCRT-0 kompleksi, hem ubikitileşmiş proteinleri endosomal membranda tanımlar ve ayırır. ESCRT-I ve ESCRT-II kompleksleri membran tomurcuklanmasına yardımcı olurlar. ESCRT-III ise MVB'ler içinde ILVs'in bölünmesiyle tomurcuklanma sürecini tamamlar (63). Son yıllarda eksozomların biyogenezi ile ilgili birçok çalışma yapılmış olsa da bu mekanizmalar halen belirsizliğini korumaktadırlar.



Şekil 1. (a) Eksozom ve mikroveziküllerin hücrelerden biyogenezi, (b) kompozisyonu ve (c) buldukları vücut sıvılarının gösterimi (41)

Eksozomların kompozisyonu

Eksozomlar proteinler, karbonhidratlar, lipidler ve nükleik asitler gibi birçok biyomolekülleri içermektedir. Eksozom kompozisyonu dinamiktir ve hücrenin kökenine, fizyolojik ve patolojik durumuna ve hatta hücre salınma bölgesine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (68).

EV kompozisyonu, yoğunluk ve boyutlarına göre farklılık göstermesi nedeniyle, farklı tiplerinin ayırt edilmesi de çok zordur. Bu zorluklar, belirli belirteçlerin olmaması nedeniyle artmaktadır.

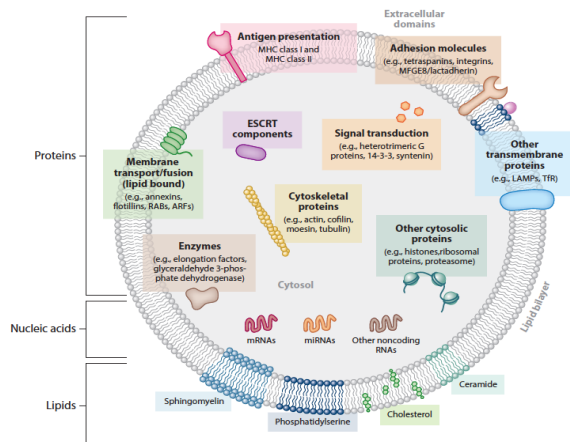
Bu nedenle, farklı EV alt popülasyonlarının bileşimine veya kökenlerine göre ayırt etme ve saf-laştırma yöntemleri geliştirilmesi büyük bir zor-luktur. Dahası hücreler, farklı kompozisyona sahip aynı tip EV'leri aynı anda salabilirler. Bu durum, farklı MVB alt popülasyonlarının varlığını veya MVB'ler içinde farklı ILV tiplerinin varlığını yansıtır. Bu çeşitliliğe bir örnek, apikal ve bazo-lateral yüzeylerden farklı protein kompozisyonu ile eksozomlar salgılayan epitel hücrelerinde gösterilmiştir. Aslında hücreler, tüm MVB içeriğini tek seferde serbest bırakmazlar ve potansiyel olarak hücre yüzeyinin tanımlanmış bölgelerinde lokal salınımına izin verirler. Son gelişmeler belirli EV çeşitlerinin üretiminin engellenebildiğini göstermiştir. Örneğin, protein Rab27a'nın inhibisyonu, CD63, ısı şok proteinleri 70 (HSP70), tumor susceptibility gene 101 (TSG101) ve Alix içeren eksozomların bir alt grubunun salgılanmasını azaltmaktadır. Buna karşılık Rab27a'nın inhibisyonu, CD9 ve milk fat globule-EGF factor 8 proteini (MFGE8) taşıyan veziküllerin salgılanmasını etkilememektedir. Farklı eksozom popülasyonlarında moleküler kompozisyon ve işaretlerin dağılımını karakteri-ze etmek için daha fazla analiz gerekmektedir. EV'ler, yaygın olarak bir dizi proteini CD9, CD63, CD81, Alix, Rab11, TSG101 (tumor sus-ceptibility gene 101), HSP70 ve 90, Annexin 1 ve 2 ile intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) bünyelerinde barındırırlar. Ayrıca eksosom-lar, aynı zamanda tetraspanin proteinler gibi farklı proteinleri de içerirler. Örneğin, T hücrelerinden alınan eksozomal T hücre reseptörü (TCR) ve yardımcı uyarıcı molekülleri içerirken, B hücrelerindeki eksozomlar B hücre reseptörü (BCR) içerir (Şekil 2) (9,25).

Eksozomların protein içeriği, çeşitli hücre tipleri ve vücut sıvılarından çeşitli tekniklerle (örneğin; Mass Spectrometry (MS), Western Blot, floresanla aktive hücre ayırma tekniği ve immünoelektron mikroskobu) kapsamlı bir şekilde analiz edilmiştir. Bu tekniklerle yapılan detaylı proteomik analiz sonucunda eksozomal proteinlerin (yaklaşık 19 protein) genel yapıları ortaya konmuştur (54). Bu analiz için dendritik hücreler (71), melanom hücreleri (55), idrar (23,60), mikrogliya (62), mast hücreleri (75), kolorektal kanser hücreleri (11,54), mezotelyoma hücreleri (27), beyin tümörü (24), oligodendrositler (43,44), trakeobronşiyal hücreler (40), hepatositler (15), nöroglia hücreleri (20), plazma (46), anne sütü (1), meme kanseri hücreleri (69), tü-kürük (22) ve embriyonik fibroblast hücreler ku-

lanılmıştır (38).

Öte yandan eksozomlarda yaygın olarak görülen bir sitozolik protein sınıfı da eksozom bağla-ma ve membran füzyonunu düzenleyen en kü-çük guanozin trifosfataz (GTPaz) ailesinden olan Rab proteinleridir (55). Aktif Rab'lar, vezikül naklinde rol oynayan proteinler ve vezikül füzyonunu akseptör membranlarla regüle eden protein kompleksleri ile etkileşirler (16). Erken endozomlarda lokalize olan Rab5, endositoz ve klatriin kaplı veziküllerin endozom füzyonuna aracılık eder. İlginç olarak, yeşil floresan protein (GFP) etiketli endozomal GTPazların kullanıldığı çalışmalarda, Rab GTPazların, farklı fonksi-yonlara sahip membran alanlarının ayrılmasında görev aldığı gösterilmiştir (70). Rab'lara ek olarak, eksozomlar membran geçirgenliği ve füzyon olaylarına yardımcı olan anneksinler bakımından (anneksinler I, II, IV, V, VI, VII ve X1) zengindir (21).

Eksozomların lipid kompozisyonları, hücre kö-keninin karakteristiğini yansıtır ve eksozom bi-yogenezinde hayati bir rol oynarlar (12). Lipid kompozisyonu ile ilgili analizler, dendritik hücrelerinde, mast hücrelerinde (45), retikülositlerde (78) ve B hücrelerinde (80) üretilen eksozomlar ile gerçekleştirilmiştir. Eksozomlar; fosfatidilserin, sfingomyelin, kolestrol ve seramid gibi spe-sifik lipidleri de taşımaktadırlar. İlginç olarak, MVB'lerin dahili membranlarında, lizofosfatidik asit (LBPA) gibi lipidlerle zenginleştirilmiş oldu-ğu gösterilmiştir (42). LBPA eksozom biyogene-zinde, özellikle de ILV oluşumunda ve endozo-mal kolestrolün kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır (12).



Şekil 2. EV'lerin genel kompozisyonu (13)

Parazit protozoon enfeksiyonlarında ekstraselüler veziküller

Dünyada paraziter hastalıklar insan ve hayvan sağlığı açısından çok önemli olup, büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadırlar (35). Dünya Sağlık Teşkilatı "Tek Sağlık" konsepti çerçevesinde özellikle son yıllarda bu konu üzerine odaklanmış projeler ve mücadele stratejileri geliştirmiştir. Dünyada milyarlarca insan halen sonu ölümlü biten birçok parazitik hastalığa maruz kalmaktadır. Bunlar arasında çok sayıda ortaya çıkan (emerging) ve/veya yeniden ortaya çıkan (remerging) karakterli patojen protozoon (çoğu vektör-borne ve/veya zoonotik karakterli) insanlarda ciddi enfeksiyonlara yol açmaktadır. Bunların önemli bir kısmı, önemli ve ağır klinik tablolar ile yüksek oranda ölümlerden sorumlu tutulmaktadır. Maalesef, bu enfeksiyonlar çoğunlukla yoksul bölgelere özgü olduğu için ihmal edilmektedirler (30,36,37). Bu derleme ile alakalı olarak, parazit hastalıklarında, hem parazit-parazit etkileşimlerinde hem de parazit konak etkileşimlerinde etkili olan EV'lerin salınımına dair elde bilimsel veriler sunulmaktadır. EV'ler, konak vücuduna giren patojenin vücut içerisinde yayılımında ve konak bağışıklık sistemlerinin düzenlenmesinde kilit oyuncularındadır. Paraziter hücrelerden EV salınımı, bir dizi paraziter enfeksiyon üzerinde çalışılmıştır (49).

"İlkel hayvanlar" anlamında olan protozoonlar, lokomasyonlarına göre 4 ana gruba ayrılmış, oldukça karmaşık bir organizma grubudur: ameba, flagellates, ciliates ve sporozoa'dır. Yaklaşık 11.000 farklı türle, 70'i insanı etkileyen parazit protozoonlar farklı konaklar arasında sıklıkla değişen karmaşık yaşam döngüsü gösteren tek hücreli ökaryotik organizmaların farklı bir grubunu oluşturmaktadır. Amoebiasis, Malaria, Afrika ve Amerikan trypanosomiasis, leishmaniasis, toxoplasmosis, coccidiosis, cryptosporidiosis, theileriosis gibi hastalıklar dünyada farklı ülkelerde her yıl yüz milyonlarca klinik vakadan sorumludur (31). Burada EV'lerle ilgili veriler, apikompleksan ve kinetoplastid protozoonlar üzerine yoğunlaştırılmıştır (49).

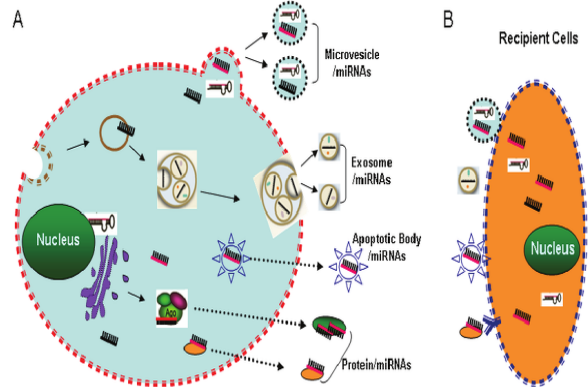
Hangi patojenler EV salınımı yapıyor?

EV salınımı, ökaryotik protozoon parazitlerin hem hücre dışı gelişme dönemlerinde hem de konak hücre içinde bulunduğu gelişme dönemlerinde yapılmaktadır (Şekil 3). Dolayısıyla EV'ler, hücre dışı patojenler tarafından salınanlar ve hücre içi patojenler tarafından üretilenler olarak iki gruba ayrılırlar. Bazı protozoon patojenler, hem hücre

içi hem de hücre dışı formlarda var olabilirler ki, böyle patojenler her iki durumda da veziküller üretebilir veya hücre içi bir durumda EV'lerin konakta üretiminde artışa neden olabilirler. *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp. ve ayrıca helmintler gibi ekstraselüler parazitler de EV salgırlarlar (50,66,73). Hücre içi patojenlerle enfekte edilmiş insan hücrelerinden *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* ve *Leishmania* spp. gibi parazitler hem konak hem de parazit proteinleri içeren EV'leri salgırlar (5,10,48,52,61,65).

Ekstraselüler parazit EV'lerde neler bulunur ve neler yaparlar?

Konağın gen ekspresyonunu veya bağışıklığını düzenleyen faktörler, parazit kaynaklı EV proteomlarında bulunur. Bu EV'ler, sinyal dizileri bulunmayan, virülans faktörlerinin dağıtımına katılan, virülansı düzenleyen patojene özgü sekretuar ve ekskretuar proteinlerini içerir. Helmintler (50) ve *Leishmania* spp.'de (66) veziküler salgı mekanizması bir parazitin sekretojesinin % 50'sini oluşturabilir. *T. vaginalis*, *Leishmania* spp. ve *T. cruzi* kaynaklı EV'ler konağın gen ekspresyonunun regülasyonu için konak hücrelere dağıtılan RNA'ları içerir (4,66,73). *T. vagi-*



Şekil 3. miRNAs hücre salınımı (A) ve alınımı (B) (82)

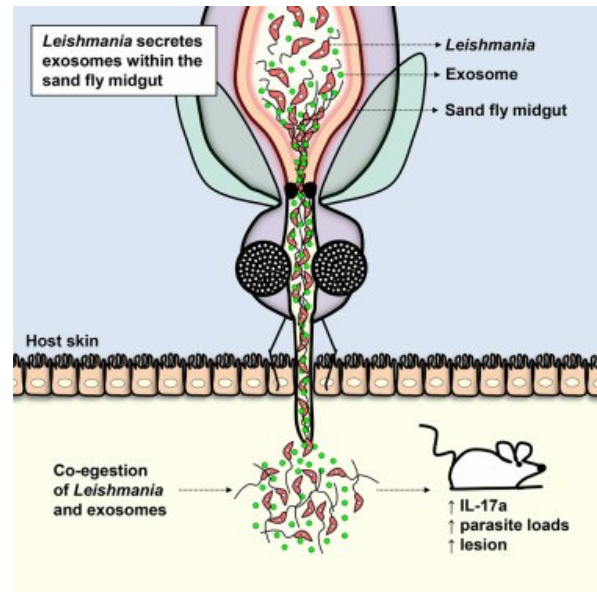
nalis ve *Leishmania* spp. EV'leri immün modülatördür ve parazit enfeksiyonuna yardımcı olması için konak hedef hücreler üzerinde başka etkilere sahiptir (66,73). *Leishmania* EV'lerin içeriği ve oluşturduğu enfeksiyon parazitin çevresine bağlı olarak değişiklik gösterir (66). Parazit EV'lerin etkileri *in vivo* ortamda da çalışılmıştır. *Leishmania* EV'leri ile alakalı olarak, parazitlerle mücadele öncesi farelerin tedavisi sırasında enfeksiyonu ve immünosüpresif IL-10 üretimini arttırdığı görülmüştür (67). Benzer şekilde, *T.*

cruzi kaynaklı EV'lerin parazitle enfekte edilmeden önce, farelerde doku parazitizmini ve inflamasyonu arttırdığı gösterilmiştir. EV'lerin parazit enfeksiyonu için konak hücrelerde primer haber-ciler olarak görev yaptığı birkaç hücre dışı parazit için hipotez oluşturulmuştur. Parazit-parazit ve parazit-mikrobiyot etkileşimlerine ek olarak konağın bağışıklık sisteminin modülasyonu için EV'lerin derinlemesine araştırılması gereklidir (72).

Hücre içi parazit kaynaklı EV'ler neler içerir ve ne yaparlar?

Hücre içi patojenlerle enfekte edilmiş konak hücre kaynaklı EV'ler, genellikle bir parazit ve konak bileşenleri karışımını içermektedir. Üstelik virüs bulaşmış hücelere benzer şekilde, parazit ile enfekte olmuş hücreler tarafından üretilen EV'ler, sağlıklı enfekte olmayan konak hücreler tarafından salgılanan EV'lere göre değişen konak proteini ve RNA içeriği barındırmaktadır (81). İnsanlar üzerinde yapılan birkaç çalışmada, *Plasmodium* türüyle enfeksiyon sırasında çeşitli konak hücre tipleri tarafından üretilen yüksek EV seviyelerinin olduğu belirtilmiştir (47). *Plasmodium falciparum* ile enfekte eritrositlerden elde edilen EV'lerin, parazitin hayatta kalma mücadelesi, transmisyonu ve gametositlerin farklılaşmasına yardımcı olduğu gösterilmiştir (47,48,65). Ayrıca EV'ler, ilaç direncini gösterebilirler. Çünkü transjenik *P. falciparum* parazitler tarafından üretilen EV'ler bir ilaç direnci belirteci kodlayan DNA'yı aktarabilir (65). Parazit iletişiminin kolaylaştırılmasının yanı sıra, parazitlenmiş hücreler tarafından indüklenen EV'ler konağın yanıtını etkileyebilir. Güçlü sitokin yanıtları, *P. falciparum* ile enfekte kan hücreleri tarafından üretilen EV'leri internalize eden konak makrofajları tarafından oluşturulur (48). Diğer yandan *T. gondii* ile enfekte fibroblastlardan salınan EV'ler, nörolojik aktiviteyi değiştirme potansiyeline sahip eşsiz bir dizi mRNA ve miRNA transkripsiyon paketi sunarlar (61). Ayrıca yakın zamanda EV'lerin, DNA, ribozomal RNA'lar, dairesel RNA'lar (circRNA'lar), uzun kodlamayan RNA (lncRNA) ve mikro RNA (miRNA)'lar gibi nükleik asitleri birlikte taşıyabileceği keşfedilmiştir. miRNA'lar transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunda önemli düzenleyicilerdir, ancak başka roller de oynayabilirler. Son kanıtlar, miRNA'ların belirli koşullar altında Toll benzeri reseptörleri (TLR) aktive edebileceği hipotezini desteklemektedir. TLR'ler bazı protozoon türlerinde de saptanmıştır. *Trypanosoma*

cruzi'de TLR2 ve TLR9, *Leishmania donovani*'de TLR2 ve TLR3, *Trichomonas vaginalis*'de TLR2, TLR4 ve TLR9, *Toxoplasma gondii*'de TLR2 ve TLR11, *Cryptosporidium parvum*'da TLR2 ve TLR4, *Plasmodium berghei*'de TLR2 ve TLR9, *Babesia bovis*' te TLR9 ve TLR11 varlığı gösterilmiştir (29,34,59). Saf *Leishmania* eksozomlarına maruz bırakılan makrofajlar tarafından salgılanan EV'ler, makrofajlarda bağışıklık-ilişkili genlerin ekspresyonunu modüle edebilir (26). Öte yandan, enfekte olmuş konak hücrelerde, protozoon parazit tarafından salınan ekstraselüler veziküller, enfeksiyona karşı kona-



Şekil 4. *Leishmania*'nın eksozom sekresyonu (3)

ğın bağışıklık yanıtını geliştirir (Şekil 4) (5). Apicomplexan'ların benzersiz salgı organellerine farklı protein popülasyonları sağlayan başka salgı yolları vardır. Proteinler, bu salgı organellerinden parazit içindeki farklı konumlara ve işgal edilen konak hücelere salgılanır (33). Burada *Theileria*, *Toxoplasma* ve *Plasmodium*'daki salgı organellerine ilişkin kanıtlar mevcuttur. Fakat *Cryptosporidium*, *Eimeria* ve *Babesia* gibi diğer Apikompleksan parazitlerinde konak hücrelerine salgılanan parazit proteinleri henüz bulunmadığından bu sistemler hakkında halen belirsizlik mevcuttur. *Theileria*'nın konak hücrelerine girme sürecindeki *Eimeria*, *Toxoplasma* veya *Plasmodium* gibi diğer Apicomplexan parazitlerinden oldukça farklıdır. *Theileria* sporozoitleri konak hücreye herhangi bir oryantasyonda ve parazitin aktin sitoskeletonuna bağ-

lı olmayan bir sürede girebilirler. Bu istila süreci boyunca, parazitin roptri ve microsphere organelleri görev alır. *Toxoplasma* ve *Plasmodium*'dan farklı olarak bu salgı organellerinin, parazit bağlama ve konak hücre içine girmesi, daha ziyade konağın plazma membranların (HPM)'dan parazit kaçışına ve ardından serbest mikrotübüllerin parazit çevresinde polimerleştilmesine karıştığı düşünülmektedir. Böylece, *Theileria*'yı çevreleyen konak zarı, istilanın hemen ardından kopar ve salınan parazit bir parazitofor vakuolden (PVM) ziyade konağın sitoplazmasında yaşayan çok çekirdekli şizontları meydana getirir. Parazit proteinlerin PVM'den geçmesi *Toxoplasma* ve *Plasmodium* proteinlerinin aksine farklı olarak konak hücre ile etkileşime girmesi ve modifikasyonu nispeten kolaylaşır. Konak hücrelerin ölümsüzleştirilmesinin konak sitoplazmasından salınan proteinlerin ya da konak sitoplazması ile doğrudan temas halinde olan parazit yüzeyi üzerinde bulunan proteinlerin sebep olduğu düşünülmektedir (64). Sonuç olarak, parazitte enfekte konak hücrelerden EV'ler tanı için biyolojik belirteç olarak veya aşı geliştirilmesi için yararlı olabilirler (74).

EV'ler ve perspektif

EV'ler, hücrelerarası iletişim, sinyal iletimi ve gen düzenlenmesinde etkili araçlardır. Bu nedenle, muhtemelen patojenlerin yol açtığı enfeksiyonların belirlenmesinde önemli rol oynarlar. EV'lerin, rekabetçi ortamlarda patojenlerin konak hücreye yerleşmesinde de yardımcı olabilecekleri de ileri sürülmüştür (73). Bir patojenin temel savunmayı modüle etmek için ön hazırlık yaptığı gibi, hücre dışı parazitler tarafından salgılanan veziküller ile parazit için kolaylıkla erişilemeyen konak hücrelerle etkileşime girebilir. Birkaç parazitten salgılanan EV'lerin insan konak hücreleri tarafından internalize edilebileceği gösterilmiştir (48,50,65,67,73). EV'ler ayrıca, kolonizasyonu destekleyerek ve konağın bağışıklık yanıtını modüle ederek parazit enfeksiyonunun korunması için bir kriter olabilir. İnsan konak kaynaklı EV'lerin enfeksiyon üzerindeki potansiyeli çok az ilgi görmüştür. Özellikle *T. cruzi* metasiklikleri, kompleman aracılı lizasyondan kaçınmak için insan kan hücresinden üretilen veziküller ile salgılanmayı ve bunlarla kaynaşmayı uyarabildiği gösterilmiştir (10). Konak EV'leri, parazitin gen ifadesini veya davranışını etkileyip etkilemediği henüz keşfedilmeyi bekleyen heyecan verici bir alandır. EV'lerin konak-parazit, parazit-parazit ve parazit-mikrobiyat

etkisinin araştırılması gelecekteki bu dinamik mikrobiyal topluluklardaki salgılanmış veziküller için ilave fonksiyonların ortaya çıkacağı tahmin edilmektedir.

EV'leri tanısal, teşhis ve klinik araçlar olarak kullanmak umut verici yeni araştırma uygulamaları sunmaktadır. Veziküller, kan, idrar, tükürük ve diğer vücut sıvılarından kolaylıkla izole edilmektedir (63). Bu nedenle patolojik veya fizyolojik durumda salgılanmış EV'ler, kaynak hücrenin proteini veya RNA belirteçlerini içermesinden dolayı bu veziküller analiz edilebilir. Bu durumda EV'lerin hayvan modelleri üzerinde uygulanan ilaçların etkinliği, invaziv olmadan patojen yanıtının izlenmesini mümkün kılabilir veya parazit enfeksiyonlardaki EV tiplerinin rolleri belirlenebilir. Örneğin, antibiyotik ile tedavi edilen hayvanlardaki bakteriyel EV'lerin boyut ve içeriğindeki değişiklikler, enfekte olmuş konaktaki sıvıları analiz ederek tespit edilebilir (44). Tam bu noktada EV'lerin antimikrobiyal direncin (AMR) göstergesi bir biyolojik belirteç olarak değerlendirilebilme potansiyelleri de keşfedilmesi gereken bir başka alandır. Öte yandan çeşitli çevre koşullarında EV içeriğini ve salımını daha fazla araştırmak bulaşıcı durumları karakterize etmek için EV'lerin potansiyel kullanımını yönlendirecektir. EV'lerin bir başka heyecan verici potansiyel kullanım alanı aşılardır. Parazitlerden gelen EV'ler veya patojenlerden üretilen proteinler ve RNA, konak hücrelerden salınan EV'lerin aşı iletim sistemleri olarak kullanılabilir. *P. yoelli* ve *T. gondii* enfekte konak hücrelerden gelen parazit orijinli EV'lerin hayvanları bu enfeksiyonlara karşı koruduğu gösterilmiştir (2,52). Böylece, EV'ler hem enfeksiyon hem de aşı adayları için biyolojik belirteç olarak kullanılabilir. Enfeksiyon biyolojisinde EV'lerin işlevlerini anlama ve kavranması ile ilgili çalışmalar yürütülmektedir (74).

Apicomplexa

Apikomplexa, endosimbiyotik orijinli bir organel, apikoplast ve hücrenin istilasında yer alan rhoptriler ve micronemler adı verilen salgı organellerinden oluşan apikal bir kompleksin varlığı ile karakterize, hayvanlarda tek hücreli parazitlerin geniş ve farklı bir infrafilumdur. Apicomplexa, yedi cinsi (*Plasmodium*, *Babesia*, *Cryptosporidium*, *Isoospora*, *Cyclospora*, *Sarcocystis* ve *Toxoplasma*) ve insanlara bulaşan 5.000'den fazla adlandırılmış türden oluşur (8,32,56).

Plasmodium spp.

Sıtmda, farklı hücrelerden EV'lerin salınması,

fare modellerinde ve insan enfeksiyonlarında tanımlanmıştır. İnsan üzerinde yapılan çalışmalarda, *P. vivax* ve *P. falciparum* tarafından enfeksiyon süresince dolaşımdaki EV'lerin yükseldiği gösterilmiştir (8,56,58). Bu çalışmalarda dolaşımdaki EV'lerin seviyeleri ateş ve serebral disfonksiyonlar gibi klinik bulgularla korelasyon göstermiş ve EV'lerin sıtma patogenezinde rol oynadığını düşündürmüştür (14,17).

Trypanosoma spp.

Trypanosoma türleri, muhtemelen konakdaki patojenin hayatta kalmasını ve replikasyonunu sağlayarak, parazit-konak etkileşiminde önemli rol oynayan hücre dışı ortamda farklı vezikül tipleri üretebilir ve salabilirler. Bu veziküller direkt olarak konak hedef hücrelerle etkileşim kurabilir, konağın bağışıklık sistemi üzerinde uzun süreli etkiler gösterebilir ve kendi yaşam döngüsü geçişlerini teşvik edebilirler (18,49).

Paraziter hastalıklara karşı terapötik maddeler olarak eksozomların kullanımı konusunda öncülük eden çalışmalar ilk defa *T. gondii*'de bildirilmiştir (2). Dendritik hücrelerin (DC), kültür yüzeylerinden elde edilen eksozomlar ve *T. gondii* antijenleri in vitro olarak çalışılmıştır. *T. gondii* işaretli eksozomlar, farelerin aşılmasında ve daha sonra öldürücü ve ölümcül dozlarla karşı kullanılmıştır. Aşılınmış fareler, *T. gondii*'ye karşı spesifik humoral ve hücresele bağışıklık yanıtları ortaya çıkarmıştır ve ayrıca ölümcül doza meydan okuyan farelerin %70'ine yakın bölümleri korunmuştur. İncelenen hayvanların beyinlerinde, ölümcül dozlarla karşı kullanılan farelerde kist sayısının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Pro-inflamatuvar yanıtların stimülasyonu daha sonra *in vitro* ve *in vivo* olarak *T. gondii*-enfekte makrofajlardan elde edilen eksozomlar bildirilmiş ve DC türevi etiketli eksozomların koruyucu etkinliğinin hamilelik döneminde daha yüksek olduğu fare modelinde gösterilmiştir (49).

Cryptosporidium spp.

Cryptosporidium parvum, zorunlu fırsatçı intraselüler patojendir. Önceki çalışmalar, *C. parvum* tarafından oluşturulan enfeksiyonun, parazitizmi kontrol etmek için miRNA'ların transkripsiyonunu düzenleyen bir TLR-4'e bağımlı yol oluşturduğunu göstermiştir. Dikkat çekici bir şekilde enfeksiyonun, anti-parazit peptidlerini yönlendiren konak bağırsak epiteli eksozomlarının salınımını uyardığını ortaya koymuştur. Ayrıca gastrointestinal parazitik enfeksiyonları kontrol etmek için önemli bir mekanizma olarak bağırsak lumi-

nal hücrelerinden eksozomların salınımını gösteren çalışmalar da mevcuttur (28,49,51).

Sonuç

Sonuç olarak bu derlemede, eksozomlar ve diğer ekstraselüler mikroveziküllerin, hücrelerarası iletişim, sinyal iletimi, immun yanıt gibi birçok hücresele fonksiyonlarda görev aldıkları; ayrıca kan ve idrar gibi kolay ulaşılabilen biyolojik sıvılardan izole edilebildiklerinden bahsedilmiştir. Bununla birlikte eksozomların konak ve patojen ilişkisinde, enfeksiyonun patogenezinde veya patofizyolojik süreçlerde görev aldıkları vurgulanmıştır. Ek olarak, eksozomlardaki moleküler içerik baz alınarak bunların yaraların iyileşmesinde promotör etki yaptıkları ve çeşitli hastalıkların tedaviye verdikleri yanıtlarda da ilişkili oldukları görülmüştür. Öte yandan eksozomlar ve diğer EV'lerin enfeksiyöz teşhis aracı olarak kullanılabilceğini, bu nedenle onları klinik tanı uygulamaları için "ideal" biyolojik belirteç haline getirmektedir. Bulaşıcı hastalıkların teşhisinde eksozom kullanımı nispeten yeni olmasına karşın, belirteçlerin hem konak hem de patojen açısından mevcut zorlukların üstesinden gelebilmek için uygulanabilir yeni bir yol açacağı tahmin edilmektedir. Bu alanda ilerleme kaydedilmesi eksozomların tanıda, terapötik uygulamalarda, ilaç direncinde özellikle kanser tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı oluşan dirençliliğin saptanmasında ve aşı yaklaşımlarının geliştirilmesinde ileriki çalışmalar için heyecan verici bir potansiyele sahip oldukları değerlendirilmiştir.

Kaynaklar

1. Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, Filen JJ, Lahesmaa R, Norman M, Neve EP, Scheynius A, Gabrielsson S. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol* 2007; 179(3): 1969-78.
2. Aline F, Bout D, Amigorena S, Roingeard P, Dimier-Poisson I. *Toxoplasma gondii* antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against *T. gondii* infection. *Infect Immun* 2004; 72(7): 4127-37.
3. Atayde VD, Aslan H, Townsend S, Hassani K, Kamhawi S, Olivier M. Exosome secretion by the parasitic protozoan *Leishmania* within the sand fly midgut. *Cell Rep* 2015; 13(5): 957-67.
4. Bayer-Santos E, Lima FM, Ruiz JC, Almeida IC, da Silveira JF. Characterization of the small RNA content of *Trypanosoma cruzi*

- extracellular vesicles. *Mol Biochem Parasitol* 2014;193(2): 71-4.
5. Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, Schorey JS. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood* 2007; 110(9): 3234-44.
 6. Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Théry C. Exosome secretion: Molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic* 2011; 12(12): 1659-68.
 7. Buzas EI, György B, György N, Falus A, Gay S. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2014; 10(6): 356-64.
 8. Campos FM, Franklin BS, Teixeira-Carvalho A, Filho AL, de Paula SC, Fontes CJ, Brito CF, Carvalho LH. Augmented plasma micro-particles during acute *Plasmodium vivax* infection. *Malar J* 2010; 9(1): 327.
 9. Campos JH, Soares RP, Ribeiro K, Andrade AC, Batista WL, Torrecilhas AC. Extracellular vesicles: Role in inflammatory responses and potential uses in vaccination in cancer and infectious diseases. *J Immunol Res* 2015; Article ID: 832057.
 10. Cestari I, Ansa-Addo E, Deolindo P, Inal JM, Ramirez MI. *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. *J Immunol* 2012; 188(4): 1942-52.
 11. Choi DS, Lee JM, Park GW, Lim HW, Bang JY, Kim YK, Kwon KH, Kwon HJ, Kim KP, Gho YS. Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer cells. *J Proteome Res* 2007; 6(12): 4646-55.
 12. Chu Z, Witte DP, Qi X. Saposin C-LBPA interaction in late-endosomes/lysosomes. *Exp Cell Res* 2005; 303(2): 300-7.
 13. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30: 255-89.
 14. Coltel N, Combes V, Wassmer SC, Chimini G, Grau GE. Cell vesiculation and immunopathology: Implications in cerebral malaria. *Microbes Infect.* 2006; 8(8): 2305-16.
 15. Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Embade N, Gil D, Matthiesen R, Valle M, Elortza F, Lu SC, Mato JM, Falcon-Perez JM. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J Proteome Res* 2008; 7(12): 5157-66.
 16. Corbeel L, Freson K. Rab proteins and Rab-associated proteins: Major actors in the mechanism of protein-trafficking disorders. *Eur J Pediatr* 2008; 167(7): 723-9.
 17. Couper KN, Barnes T, Hafalla JC, Combes V, Ryffel B, Secher T, Grau GE, Riley EM, de Souza JB. Parasite-derived plasma micro-particles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. *PLoS Pathog* 2010; 29; 6(1): e1000744.
 18. Deolindo P, Evans-Osses I, Ramirez MI. Microvesicles and exosomes as vehicles between protozoan and host cell communication. *Biochem Soc Trans* 2013; 41(1): 252-7.
 19. El Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12(5): 347-57.
 20. Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G. Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(26): 9683-8.
 21. Futter CE, White IJ. Annexins and endocytosis. *Traffic* 2007; 8(8): 951-8.
 22. Gonzales PA, Pisitkun T, Hoffert JD, Tchapyjnikov D, Star RA, Kleta R, Wang NS, Knepper MA. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(2): 363-79.
 23. Gonzalez-Begne M, Lu B, Han X, Hagen FK, Hand AR, Melvin JE, Yates JR. Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT). *J Proteome Res* 2008; 8(3): 1304-14.
 24. Graner MW, Alzate O, Dechkovskaia AM, Keene JD, Sampson JH, Mitchell DA, Bigner DD. Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *FASEB J* 2009; 23(5): 1541-57.
 25. Gutiérrez-Vázquez C, Villarroja-Beltri C, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Transfer of extracellular vesicles during immune cell-cell interactions. *Immunol Rev* 2013; 251(1): 125-42.
 26. Hassani K, Olivier M. Immunomodulatory impact of *Leishmania*-induced macrophage exosomes: a comparative proteomic and functional analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7(5): e2185.
 27. Hegmans JP, Bard MP, Hemmes A, Luider

- TM, Kleijmeer MJ, Prins JB, Zitvogel L, Burgers SA, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells. *Am J Pathol* 2004; 164(5): 1807-15.
28. Hu G, Gong AY, Roth AL, Huang BQ, Ward HD, Zhu G, Larusso NF, Hanson ND, Chen XM. Release of luminal exosomes contributes to TLR4-mediated epithelial antimicrobial defense. *PLoS Pathog* 2013; 9(4): e1003261.
29. İnci A, Bişkin Z. Toll-like reseptörler ve protozoon enfeksiyonlarındaki rolleri. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2007; 4(2): 121-8.
30. İnci A, Düzlü Ö. Vektörler ve vektörlerle bulaşan hastalıklar. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2009; 6(1): 53-63.
31. İnci A, İça A, Yıldırım A, Düzlü Ö. Memelilerin (yabani) önemli paraziter hastalıkları- I: Protozoon enfeksiyonları. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2008; 5(1): 51-60.
32. İnci A, Şahingöz Demirpolat G, Yıldırım A, Düzlü Ö. Apicomplexan protozoonlarda apicoplast. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2017; 14(1): 49-59.
33. İnci A, Uyanık F. Babesia Türlerinin Moleküler Biyolojisi. Özcel MA, Tanyüksel M, Eren H. eds. *Moleküler Parazitoloji*. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, 2009; ss. 549-82.
34. İnci A, Yavuz A, Yıldırım A, Düzlü Ö, Bişkin Z. Sığır theileriosis'inde metastaz. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2012; 9(2): 113-22.
35. İnci A, Yazar S, Tunçbilek AS, Canhilal R, Doğanay M, Aydın L, Aktaş M, Vatansver Z, Özdarındeli A, Özbel Y, Yıldırım A, Düzlü Ö. Vectors and vector-borne diseases in Turkey. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2013; 60: 281-96.
36. İnci A, Yıldırım A, Düzlü Ö, Doğanay M, Aksoy S. Tick-borne diseases in Turkey: A review based on one health perspective. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10(12): e0005021.
37. İnci A, Yıldırım A, Düzlü Ö. The current status of ticks in Turkey: A 100-year period review from 1916 to 2016. *Türkiye Parazitoloj Derg.* 2016; 40(3): 152-57.
38. Ji H, Erfani N, Tauro BJ, Kapp EA, Zhu HJ, Moritz RL, Lim JW, Simpson RJ. Difference gel electrophoresis analysis of ras-transformed fibroblast cell-derived exosomes. *Electrophoresis* 2008; 29(12): 2660-71.
39. Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett* 2006; 107(2): 102-8.
40. Kesimer M, Scull M, Brighton B, Demaria G, Burns K, O'Neal W, Pickles RJ, Sheehan JK. Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: A possible role in innate defense. *FASEB J* 2009; 23(6): 1858-68.
41. Ko J, Carpenter E, Issadore D. Detection and isolation of circulating exosomes and microvesicles for cancer monitoring and diagnostics using micro-/nano-based devices. *Analyst* 2016; 141(2): 450-60.
42. Kobayashi T, Gu F, Gruenberg J. Lipids, lipid domains and lipid-protein interactions in endocytic membrane traffic. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9(5): 517-26.
43. Krämer-Albers EM, Bretz N, Tenzer S, Winterstein C, Möbius W, Berger H, Nave KA, Schild H, Trotter J. Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: trophic support for axons? *Proteomics Clin Appl* 2007; 1(11): 1446-61.
44. Kuehn MJ, Kesty NC. Bacterial outer membrane vesicles and the hostpathogen interaction. *Genes Dev* 2005; 19(22): 2645-55.
45. Laulagnier K, Motta C, Hamdi S, Roy S, Fauvelle F, Pageaux JF, Kobayashi T, Salles JP, Perret B, Bonnerot C, Record M. Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem J* 2004; 380(1): 161-71.
46. Looze C, Yui D, Leung L, Ingham M, Kaler M, Yao X, Wu WW, Shen RF, Daniels MP, Levine SJ. Proteomic profiling of human plasma exosomes identifies PPARgamma as an exosome-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 378(3): 433-8.
47. Mantel PY, Marti M. The role of extracellular vesicles in *Plasmodium* and other protozoan parasites. *Cell Microbiol* 2014; 16(3): 344-54.
48. Mantel PY, Hoang AN, Goldowitz I, Potashnikova D, Hamza B, Vorobjev I, Ghiran I, Toner M, Irimia D, Ivanov AR, Barteneva N, Marti M. Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. *Cell Host Microbe* 2013; 13(5): 521-34.

49. Marcilla A, Martin-Jaular L, Trelis M, de Menezes-Neto A, Osuna A, Bernal D, Fernandez-Becerra C, Almeida IC, Del Portillo HA. Extracellular vesicles in parasitic diseases. *J Extracell Vesicles* 2014; 3(1): 25040.
50. Marcilla A, Trelis M, Cortés A, Sotillo J, Cantalapiedra F, Minguez MT, Valero ML, Sánchez del Pino MM, Muñoz-Antoli C, Toledo R, Bernal D. Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. *PLoS One* 2012; 7(9): e45974.
51. Marti M, Johnson PJ. Emerging roles for extracellular vesicles in parasitic infections. *Curr Opin Microbiol* 2016; 32: 66-70.
52. Martin-Jaular L, Nakayasu ES, Ferrer M, Almeida IC, Del Portillo HA. Exosomes from *Plasmodium yoelii*-infected reticulocytes protect mice from lethal infections. *PLoS One* 2011; 6(10): e26588.
53. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 2010; 73(10): 1907-20.
54. Mathivanan S, Lim JW, Tauro BJ, Ji H, Moritz RL, Simpson RJ. Proteomic analysis of A33-immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Mol Cell Proteomics* 2009; 9(2): 197-208.
55. Mears R, Craven RA, Hanrahan S, Totty N, Upton C, Young SL, Patel P, Selby PJ, Banks RE. Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2004; 4(12): 4019-31.
56. Nantakomol D, Dondorp AM, Krudsood S, Udomsangpetch R, Pattanapanyasat K, Combes V, Grau GE, White NJ, Viriyavejakul P, Day NP, Chotivanich K. Circulating red cell derived microparticles in human malaria. *J Infect Dis* 2011; 203(5): 700-6.
57. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell* 1983; 33(3): 967-78.
58. Pankoui Mfonkeu JB, Gouado I, Fotso Kuate H, Zambou O, Amvam Zollo PH, Grau GE, Combes V. Elevated cell-specific microparticles are a biological marker for cerebral dysfunctions in human severe malaria. *PLoS One* 2010; 5: e13415.
59. Paschon V, Takada SH, Ikebara JM, Sousa E, Raesossadati R, Ulrich H, Kihara AH. Interplay between exosomes, micrnas and toll-like receptors in brain disorders. *Mol Neurobiol* 2016; 53(3): 2016-28.
60. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(36): 13368-73.
61. Pope SM, Lasser C. *Toxoplasma gondii* infection of fibroblasts causes the production of exosome-like vesicles containing a unique array of mRNA and miRNA transcripts compared to serum starvation. *J Extracell Vesicles* 2013; 2: 22484.
62. Potolicchio I, Carven GJ, Xu X, Stipp C, Riese RJ, Stern LJ, Santambrogio L. Proteomic analysis of microglia-derived exosomes: metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism. *J Immunol* 2005; 175 (4): 2237-43.
63. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013; 200(4): 373-83.
64. Ravindran S, Boothroyd JC. Secretion of proteins into host cells by apicomplexan parasites. *Traffic* 2008; 9(5): 647-56.
65. Regev-Rudzki N, Wilson DW, Carvalho TG, Sisquella X, Coleman BM, Rug M, Bursac D, Angrisano F, Gee M, Hill AF, Baum J, Cowman AF. Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. *Cell* 2013; 153(5): 1120-33.
66. Silverman JM, Clos J, de'Oliveira CC, Shirvani O, Fang Y, Wang C, Foster LJ, Reiner NE. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J Cell Sci* 2010; 123(6): 842-52.
67. Silverman JM, Clos J, Horakova E, Wang AY, Wiesgigl M, Kelly I, Lynn MA, McMaster WR, Foster LJ, Levings MK, Reiner NE. *Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 2010; 185(9): 5011-22.
68. Sreekumar PG, Kannan R, Kitamura M, Spee C, Barron E, Ryan SJ, Hinton DR.

- α B crystallin is apically secreted within exosomes by polarized human retinal pigment epithelium and provides neuroprotection to adjacent cells. PLoS One 2010; 5(10): e12578.
69. Staubach S, Razawi H, Hanisch FG. Proteomics of MUC1-containing lipid rafts from plasma membranes and exosomes of human breast carcinoma cells MCF-7. Proteomics 2009; 9(10): 2820-35.
70. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. Nat Rev Mol Cell Biol 2009; 10: 513-25.
71. Thery C, Boussac M, Veron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, Amigorena S. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. J Immunol 2001; 166(12): 7309-18.
72. Trocoli Torrecilhas AC, Tonelli RR, Pavanelli WR, da Silva JS, Schumacher RI, de Souza W, E Silva NC, de Almeida Abrahamsohn I, Colli W, Manso Alves MJ. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. Microbes Infect 2009; 11 (1): 29-39.
73. Twu O, de Miguel N, Lustig G, Stevens GC, Vashisht AA, Wohlschlegel JA, Johnson PJ. *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host: Parasite interactions. PLoS Pathog 2013; 9(7): e1003482.
74. Twu O, Johnson PJ. Parasite extracellular vesicles: Mediators of intercellular communication. PLoS Pathog 2014; 10(8): e1004289.
75. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol 2007; 9(6): 654-9.
76. Van der Goot FG, Gruenberg J. Intra-endosomal membrane traffic. Trends Cell Biol 2006; 16: 514-21.
77. Van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G. Exosomes: A common pathway for a specialized function. J Biochem 2006; 140 (1): 13-21.
78. Vidal M, Sainte-Marie J, Philippot JR, Bienvenue A. A symmetric distribution of phospholipids in the membrane of vesicles released during in vitro maturation of guinea pig reticulocytes: Evidence precluding a role for "aminophospholipidtranslocase". J Cell Physiol 1989; 140(3): 455-62.
79. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. Biochim Biophys Acta 2012; 1820(7): 940-48.
80. Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, Schwarzmann G, Mobius W, Hoernschemeyer J, Slot JW, Geuze HJ, Stoorvogel W. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. J Biol Chem 2003; 278(13): 10963-72.
81. Wurdinger T, Gatsion NN, Balaj L, Kaur B, Breakefield XO, Pegtel DM. Extracellular vesicles and their convergence with viral pathways. Adv Virol 2012; Article ID: 767694.
82. Zhu H, Fan GC. Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease. Am J Cardiovasc Dis 2011; 1 (2): 138.

Sorumlu Yazar:

Prof. Dr. Abdullah İNCİ
Erciyes Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Parazitoloji Anabilim Dalı
Kayseri-TÜRKİYE
E-posta: ainci@erciyes.edu.tr



Bir Atta Derin Enfekte Yara Olgusu

Umut ALPMAN¹, Muhammed Kaan YÖNEZ¹, Gültekin ATALAN¹, Gencay EKİNCİ²

¹Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Özet: Atlarda travmalara bağlı olarak şekillenen yaralar sıklıkla şekillenir. Çalışmanın materyalini Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Uygulama ve Araştırma Hastanesi Cerrahi Ana Bilim Dalı Kliniklerine araç çarpması sonucu getirilen iki yaşındaki yerli bir at oluşturdu. Atın muayenesinde sağ mandibulanın dorsalinde Musculus (M) massater, M. zygomaticus kaslarını da içine alan derin, 20 cm uzunluğunda, enfekte açık yara mevcuttu. Pektoral bölgede sternuma kadar uzanan, M. brachiocephalicus, M. sternocephalicus, M. sternothyrohyoideus ve M. brachialis kaslarını içine alan, derinliği 15 cm, genişliği ise 40 cm olan enfekte ve nekrotik dokuların bulunduğu enfekte açık yara saptandı. Ekstremitelerde sağ ve sol karpal eklem düzeyinde 4 cm genişliğinde açık ve enfekte yara tespit edildi. Yaralar ilk olarak primer kapatma işlemi uygulanarak sağaltım amacı ile dikiş uygulaması yapıldı fakat dikiş hattının iki gün sonra açılması nedeni ile açık yara tedavisine geçildi. Göğüs bölgesindeki yarada 30 günde iyileşme tamamlandı. Primer kapatma yoluyla sağaltıma gidilen yüz ve karpal eklem düzeyindeki yaraların iyileşmesi ise iki hafta sürdü. Sunulan çalışmada bir atta şekillenen, travma üzerinden uzun zaman geçmiş derin, enfekte ve kronik açık yaraların sağaltımında yapılan uygulamaların sonuçları bildirilmiştir. Atlarda gözlenen kronik ve derin enfekte yaraların sağaltım prosedürleri ve sonuçlarının veteriner klinik pratiğe ve literatüre katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

Anahtar kelimeler: At, enfekte, tedavi, yara

Deep Infected Wound Case in a Horse

Summary: Various types of wound frequently occur in horses due to trauma. The material of the study consisted of a 2-year-old local breed of horse referred to the clinic of Erciyes University Veterinary Faculty Training and Research Hospital Surgery Department. At the examination of the horse, there was a deep, 20 cm long, open infected wound in the dorsal part of the right mandible, including Musculus (M) massater and M. zygomaticus muscles. An open infected wound and necrotic tissue of 15 cm in depth and 40 cm in width, covering the muscles of M. brachiocephalicus, M. sternocephalicus, M. sternothyrohyoideus and M. brachialis extending to the sternum in the pectoral region was detected. Open and infected wounds were available 4 cm wide at the level of the right and left carpal joints were detected on the limbs. The wound was initially treated with primer closure but the sutures of the chest region were opened after two days and open wound treatment was started. Recovery in the chest area was completed in 30 days. The wound in the facial and carpal joint regions, where the treatment was given through closure of the primer, lasted for two weeks to heal. In the present study, the results of the applications were reported in the treatment of deep, infected and chronic open wounds long after trauma which is formed in a horse. We believe that the treatment procedures and outcomes of chronic and deeply infected wounds observed in horses may contribute to veterinary clinical practice and the literature.

Key words: Horse, infection, treatment, wound

Giriş

Ezilme, sivri cisim yaralanmaları nedeni ile oluşan yırtılma, ısırık yaraları, ateşli silah yaralanmaları ve paraziter yaralanmalar ile sıklıkla karşılaşılmaktadır (10). Yaralar açık ve kapalı olmak üzere ikiye ayrılır. Açık yaralarda yırtılma ve doku kaybı gözlenirken kapalı yaralarda doku bütünlüğünün bozulmadığı ezilmeler görülür. Yaralar oluşumuna göre, abrazyon (sıyrık, aşınma), avülzyon (ayrılma), insizyon (kesi), lasezyon (yırtılma) ve penetrasyon (delinme) şek-

linde, kontaminasyon derecelerine göre temiz, kirli, bulaşmış veya enfekte yaralar olarak sınıflandırılır (10,12,14). Açık yaralar oluşumunun üzerinden altı saatten az süre geçen yaralar kontamine olmayan, altı ile oniki saat arası süre geçen yaralar kontamine ve üzerinden oniki saatten fazla süre geçen yaralar enfekte yara olarak adlandırılır (24).

Yara iyileşmesi primer ve sekonder yara iyileşmesi olarak ikiye ayrılır. Primer yara iyileşmesinde aseptik yara dudakları birbirine yapışarak hafif bir yangı oluşur ve çabuk skatrizasyonla iyileşme görülür. Sekonder yara iyileşmesinde

ise bölge anemik, saha tamamen ezilmiş olup yara irinleşerek granülasyon dokusunun şekillenmesiyle iyileşme yavaş yavaş gerçekleşir (10). Yara iyileşmesi inflamasyon, debridement, onarım ve olgunlaşma fazı olmak üzere dört aşamada sınıflandırılır. İlk 3-5 gün, yara iyileşmesinin gecikme aşamasıdır, inflamasyon ve debriment fazı hakimdir. İnflamatuar dönem; hasar ile başlayan koruyucu doku tepkisini kapsar. Bu faz artmış vasküler geçirgenlik, dolaşım hücrelerinin kemotaksisi, sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salınması ve hücre aktivasyonu (makrofajlar, nötrofiller, lenfositler ve fibroblastlar) ile karakterizedir. Debridement döneminde ise yara beyaz kan hücreleri, ölü dokular ve yara sıvısından oluşan bir eksüdat ile dolar (9). Nötrofiller ve monositler (sırasıyla yaralanmadan yaklaşık 6-12 saat sonra) ortaya çıkar ve debridement fazını başlatır. Onarım evresi genellikle yaralanmadan 3-5 gün sonra başlar. Bu dönemde makrofajlar, deoksiribonükleik asit (DNA) ve fibroblast proliferasyonunu uyarır. Olgunlaşma aşamasında; yara iyileşmesinin yara direnci maksimum seviyesine yükselir (9).

Atlarda yara iyileşme aşamaları; hemostaz, koagülasyon, inflamasyon, hücresel proliferasyon, fibroplazi, anjiyogenez, epitelizasyon, matriks sentezi ve yeniden şekillendirme evresi olmak üzere altı aşamada gerçekleşir (20).

Yaraların tedavilerinde yaranın şekline ve biçimine göre uygulanacak olan tedavi yöntemi değişiklik gösterir. Temiz yaraların tedavisinde yara iyileşmesinin erken evrelerinde ise (inflamatuar veya debridement aşamasında) primer olarak yara temizlendikten sonra kapatma işlemi uygulanır. İyileşmenin sonraki aşamalarında bulunan kirli veya enfekte yaralar, ikincil iyileşme ile sağaltıma gidilir (2). Enfekte yaraların daha yavaş iyileştiği ve genellikle nonenfekte yaralara kıyasla daha geniş skatriks dokusu ürettiği kabul edilmiştir (19). Aseptik yaralarda yaranın kapatılarak iyileşmesi, doku kayıplı aseptik yaralarda ise greft uygulanarak iyileşmesi tercih edilir (20).

Atlarda septik yara tedavilerinde birincil aşamada kontaminasyonu en aza indirmek için bölgedeki kıllar traş edilir. Kaza sonucu ortaya çıkmış yaralar genellikle nekroze olmuş doku, kabuk, eksüdat ve yabancı maddeler içerir. Yara bölgesindeki kirler, yabancı maddeler, ölü dokular %7.5'lik povidon iyot, klorheksidin, betadin ve %4'lük chlorhexidin glukonat gibi antiseptikli solusyonlarla yıkanarak temizlenir. İzotonik so-

lasyonu (%0.9) veya ringer solüsyonu ile irrigasyon taze yaraları temizlemek için yeterli olmasına rağmen, atlarda karşılaşılan yaralar genellikle taze değildir veya enfektedir (20). Bu nedenle, kronik kaza sonucu ortaya çıkan yaralarda bakteri kontaminasyonunu ortadan kaldırmak için antibiyotik veya antiseptik içeren bir solüsyon ile irrigasyon yapılmalıdır. Yara irrigasyonunun amacı, sürekli veya pulsatil bir akış oluşturarak gevşek bir şekilde yaraya yapışık olan kontaminantları, bakteri ve ölü dokuları yara yüzeyinden uzaklaştırmaktır. Yarada enfeksiyona sebep olan mikroorganizmaların ve yara yüzeyindeki nekrotik dokuların yıkama yöntemi ile uzaklaştırılmaması durumunda debriment tekniği kullanılır (20,21,22). Yara debrimenti, yara da kalan bakteri konsantrasyonunu belirler ve klinik olarak kontrol edilebilecek bir faktördür (21). Debriment yoluyla nekrotik dokuların çıkarılması yara yüzeyindeki bakteri yükünü azaltır, bu da iyileşmeyi hızlandırır. Kan dolaşımının engellemek için yaranın en uzak ve ventral bölümünden debriment işlemi yapılır. Yıkama işlemine debriment öncesi, sırasında ve sonrasında da devam edilmelidir. Açık enfekte yaralarda sistemik antibiyotik tedavisinin yanı sıra topikal olarak bölgeye antibiyotik uygulanmalıdır (20,21,22). Bununla birlikte, enfekte yaralara topikal olarak uygulanan antimikrobiyal ajanlar, sistemik olarak uygulanan aynı antimikrobiyal ajandan daha etkili olabilir; çünkü topikal uygulamada doğrudan istenen bölgeye daha yüksek konsantrasyonda ilaç verilmiş olur (20).

Bu çalışma ile atlarda vücudun çeşitli yerlerinde şekillenen derin enfekte ve primer olarak kapatılmayan yaralarda uygulanan tedavi protokolü ve elde edilen sonuçların bildirilmesi amaçlanmıştır.

Olgu

Çalışma materyalini Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama Hastanesi Cerrahi Anabilim Dalı kliniklerine getirilen ve vücudunun çeşitli yerlerinde doku bütünlüğü bozulmuş ve üzerinden iki hafta geçmiş enfekte yaraları bulunan iki yaşındaki yerli bir at oluşturdu. Alınan anamnez bilgide, doğada serbest haldeyken karayolundan geçen bir tırın çarpması sonucunda vücudunun değişik bölgelerinde kanamaların bulunduğu ve genel durumunun oldukça kötü olduğu bildirildi. İncelemede sağ mandibulanın dorsalinde M. masseter kasının üzerinden başlayan ve M. zygomatic-

cus kasını içine alan, derin, 20 cm uzunluğunda enfekte yara mevcuttu. Yara hattı açık olup yara bölgesinde nekrotik doku kalıntıları bulunmaktaydı. Ayrıca bölgede sarı-yeşil renkli irin akıntısı gözlemlendi. Pektoral bölgede ise sternuma kadar uzanan, musculus (M) brachiocephalicus, M. sternocephalicus, M. sternothyrohyoideus ve M. brachialis kaslarını da içine alan derinliği 15 cm, genişliği ise 40 cm kadar olan septik bir yara vardı. Bölgede lokal olarak nekrotik dokular gözlemlendi (Şekil 1). Ekstremitelerde ise sağ ve sol karpal eklem düzeyinde 4 cm genişliğinde açık ve enfekte yara tespit edildi. Yaranın rengi kahverengi ile yeşil arasında değişmekte olup, sternum derinlerinde sürekliliği olan pis kokulu bir akıntı varlığı gözlemlendi. Yapılan klinik muayenede vücut ısısı: 38.3, nabız: 84 ve solunum: 40 olarak tespit edildi. Kapiller dolun zamanı 2 saniye, şiddetli dehidrasyon, müköz membranların rengi pembe ve hafif anemik olduğu belirlendi. Yapılan hematolojik ve arteriyel kan gazına ait bulgular Tablo 1 ve Tablo 2'de verilmiştir.

Anestezi

Sedasyon amacıyla 20 µg/kg intravenöz (IV) dozunda detomidin (Domesedan, Pfizer, Finlandiya) uygulandı. Anestezi amacıyla 2.2 mg/kg IV dozunda ketamin (Ketasol%10, Richter Pharma, Avusturya) yapıldı. Operasyon boyunca anesteziye ketaminin 1/4 oranında idame dozunun uygulanmasıyla devam edildi.

Cerrahi İşlemler

Yüz ve göğüs bölgesinde ve karpal eklem düzeyinde bulunan yaraların debriment işlemi yapılarak antiseptik solusyonla (izotonik ile sulandırılmış %0.5'lik povidone iode solusyonu) yara irrigasyonu sağlandı. Daha sonra dren yerleştirilerek yırtılan göğüs bölgesi kasları M. brachiocephalicus ve M. sternocephalicus, M. Sternothyrohyoideus, M. brachiocephalicus ve yırtılan yüz bölgesi kasları M. massater, M. zygomaticus ve deri altı bağ doku ayrı ayrı 2 numara PGA (Katsan, İzmir, Türkiye) kullanılarak basit sürekli dikiş yöntemi ile dikildi. Deri ise 5 numara ipek iplik (Katsan, İzmir, Türkiye) kullanılarak

Tablo 1. Hematolojik kan parametreleri

Parametreler	Sonuçlar	Parametreler	Sonuçlar
WBC	$8.7 \times 10^9/L$	HCT	%26.9
LYMPH#	$4.0 \times 10^9/L$	MCV	43.6 fL
MON#	$0.3 \times 10^9/L$	MCH	14.4 pg
GRAN#	$4.4 \times 10^9/L$	MCHC	33.0 g/dL
LYMPH%	% 45.5	RDW	%18.2
MON%	% 4.2	PLT	$373 \times 10^9/L$
GRAN%	% 50.3	MPV	4.7 fL
RBC	$6.7 \times 10^{12}/L$	PDW	15.9
HGB	8.9 g/dL	PCT	%0.175

Tablo 2. Arteriyel kan gazı parametreleri

Parametreler	Sonuçlar
KCO3-	32.1 mmHg
PCO2	33.3 mmHg
BEb	8.4 mmHg
BEecf	9.1 mmHg
O2Sat	% 94.7
tHb	8.1 g/dL

Klinik muayene sonucunda yara bölgelerinin çok geniş olması sebebiyle yaraların debrimentini sağlandıktan sonra dikiş uygulanmasına karar verildi. Yüz, göğüs ve karpal eklem bölgesinin kolları traş edilerek operasyona hazır hale getirildi.

basit ayrı dikiş yöntemiyle kapatıldı (Şekil 2). Postoperatif olarak 10000 IU/kg intramusküler (İM) 10 gün penisilin (Pen-strep La, Provet, Türkiye), 40 mg/kg İM dozunda 5 gün metamizol (Dolarjin, Topkim, Türkiye) haftada bir olmak üzere 0.01 mg/kg subkutan (SC) tarantulacubensis (Theranekron D6, Richter Pharma, Avusturya) uygulandı. Yara pansumanı sabah akşam



Şekil 1. Yaralanmadan sonra göğüs bölgesindeki yara



Şekil 2. Göğüs bölgesindeki kasların dikilerek kapatılması

yapılmasına ve günlük antibiyotik uygulamasına rağmen postoperatif 1. gün göğüs bölgesindeki dikiş hattından irin akıntısı, postoperatif 2. gün ise aynı bölgenin dikişlerinin açıldığı gözlemlendi (Şekil 3). Bunun üzerine göğüs bölgesine açık yara sağaltımı uygulanmasına karar verildi. Bu amaçla bölge tamamen açık hale getirildi. Açık yara tedavisi kapsamında 20 gün boyunca sabah-akşam yaraya debriment işlemi uygulandı, %0.5' lik povidon iode solusyonu ile yara irrigasyonu sağlandı ve oksitetrasiklin (Terramycin, Pfizer, Finlandiya) yara merhemi lokal olarak bölgeye uygulandı. Postoperatif 30.gün sonunda göğüs bölgesindeki boşluğun granülasyon dokusu ile dolarak üzerinin deri ile kaplandığı gözlemlendi (Şekil 4). Yüz ve karpal eklem düzeyindeki yaraların ise postoperatif 15. günde kapandığı tespit edildi (Şekil 5).



Şekil 3. Yaraların dikiş atıldıktan sonraki görünümü



Şekil 4. Postoperatif 15.gün göğüs bölgesi yaralarının görünümü



Şekil 5. Bir ay sonunda yüz bölgesindeki yaranın görünümü

Tartışma ve Sonuç

Atlarda yumuşak doku yaralanmalarının büyük bir çoğunluğunu travma sonucu şekillenen yaralar oluşturmaktadır (20). Yaranın iyileşmesinde yaranın lokalizasyonu, yaranın genişliği, yara iyileşmesi ve süresini etkilemektedir. Hareketli bölgelerdeki yaraların iyileşmesi diğer bölgedeki yaralara oranla daha uzun sürmektedir (13,15). Enfekte, primer kapatmaya uygun olmayan veya primer kapatma sonucu sağaltımı gerçekleştirilemeyen yaralarda açık yara tedavisi tercih edilir (26).

Sunulan çalışmanın materyalini, travmaya bağlı enfekte açık yaraları bulunan iki yaşındaki yerli bir at oluşturdu. Yüz bölgesinde, karpal eklem

düzeyinde ve göğüs bölgesinde enfekte açık yaraları mevcuttu. Olgumuzda yaraların önce primer kapatılması ancak göğüs bölgesindeki yaranın primer iyileşmeye yanaşmaması sonucu sekonder yara iyileşmesi tercih edilmiştir. Lacopetti ve ark. (16) tarafından yapılan çalışmada dorsal dirsek bölgesinde yırtık tespit edilen Arap atının yara sağaltımında bölge önce primer olarak kapatılmış ve iki gün sonra dikişlerin açılması üzerine açık yara sağaltımına geçilmiştir. Bu durum olgumuzdaki Yılık Atındaki uygulanan sağaltım işlemiyle benzerlik göstermektedir. Lacopetti ve ark. (16) yara iyileşmesi kapsamında iki hafta boyunca sistemik antibiyotik uygulaması ve günlük yara pansumanının yapıldığını bildirmişlerdir. İki hafta sonunda yara kapanmaması ve iyileşmesindeki yavaş ilerleme sonucu bu işlem durdurularak, Otolog trombosit açısından zengin jel (PRG) üç haftada bir olarak yara bölgesine uygulanarak toplam beş ayda yara iyileşmesi sağlandığı bildirilmiştir. Olgumuzda ise göğüs bölgesindeki açık yara günlük pansuman, debriment, yara irrigasyonu ve pomad uygulamalarıyla toplamda bir ayda yara iyileşmesi sağlanmıştır.

Tulleners ve ark. (23) 'nın yapmış olduğu çalışmada yedi sığır ve üç atın enfekte karın bölgesi yaraları bulunduğu belirtilmiştir. Devitalize ve enfekte dokunun debridment işleminden sonra yara kenarları, vücut duvarının tüm katmanları boyunca basit ayrı dikiş yöntemiyle kapatıldığını bildirmişlerdir (23). Dikilen yaraları çevreleyen bir elastik ve steril rulo bandaj ile yaranın sıkılaştırıldığını rapor etmişlerdir. Hayvanların ortalama 60 gün süreyle dar alanda bırakılarak hareketleştirme işlemiyle sağaltımın tamamlandığı aktarmışlardır. Dikişler yara dudaklarına destek vermediğinde yerleştirildikten 14 ila 21 gün sonra çıkarıldığı ve yüzeysel yara enfeksiyonunun, lokal basınç nekrozunun dikişten kaynaklandığı bildirilmiş, ancak bu duruma karşın ek cerrahi işlem, medikal tedavi, debriment ve yara irrigasyonunun seyreltik povidon iode solüsyonu ile yapılarak sağaltıma devam edildiği açıklanmıştır (23). Olgumuzdaki tedavi protoklü Tulleners ve ark. (23) 'nın yapmış olduğu çalışmadaki tedavi protokolü ile oldukça benzerlik göstermektedir. Olgumuzda farklı olarak bandaj işleminin uygulanmayışı ve yaralara direkt olarak müdahale edilmesinin primer ve sekonder yara sağaltımında yara iyileşme süresini kısalttığı kanaatindeyiz. Aynı zamanda sekonder yara tedavisi uygulanan yaradaki dikişlerin, Tulleners

ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmaya göre daha erken alınmasının ve müdahalesinin yaranın sağaltımının süresini etkilediğini düşünmekteyiz.

Yara kapanması ve epitelizasyon, büyük yaralarla birlikte haftalar sürebilir ve belki de fonksiyonel bozulma ile büyük bir skar oluşumuna neden olabilir (20). Debriment işlemi, kirli materyal kontaminasyonları, ölü hücre kalıntıları ve bakteriler tarafından yoğun şekilde kirlenmiş dokuları ortadan kaldırır ve yaranın enfeksiyona direnme kabiliyetini bozan canlı dokuları ortaya çıkarır (1,7). Debriment işleminin yapılması inflamasyon süresini azaltır ve yara iyileşmesini artırır (4,6). Berry ve ark. (3) tarafından altı at üzerinde yapılan çalışmada, metacarpal eklem düzeyinde açık yaraları bulunan atlara ayrı ayrı sağaltım programı uyguladıklarını bildirmişlerdir. Yaraların sağaltımında yaralarına debriment işleminden sonra povidone iyot merhem ve gümüş sülfadiyazın merhemlerle bandaj işlemi uygulanarak sağaltım amaçlanmıştır. Berry ve ark. (3) tarafından yapılan araştırmanın sonucuna göre ortalama 92 günde iyileşme sağlandığı ve debriment işleminin aşırı skar dokusu oluşumunu önlediği belirtilmiştir. Kasılma, epitelizasyon ve iyileşme oranları dikkate alındığında bandaja alınmış debride edilmeyen yaraların, iyileşmesinin daha uzun bir süre gerekeceği sonucuna varıldığı ve yaraların tam epitelizasyonunu sağlamak için taşkın granülasyon dokusunun rezeksiyonunun gerekli olduğu belirtilmiştir. Olgumuzda bu sonuca benzer olarak yara bölgesine günlük sabah-akşam debriment işlemi uygulanmış ve yara bölgesinde bandaj işlemi uygulanmayarak açık bırakılmıştır. Olgumuzda sağaltımın Berry ve ark. (3) tarafından yapılan sağaltıma göre daha kısa sürmesinin nedeninin debriment işlemiyle yaranın sürekli canlı kalması ve aşırı skar oluşumunu engelleyerek epitelizasyonun hızlanması sonucu ile bir ay da yara iyileşmesinin sonuçlandığını düşünmekteyiz.

Günümüzde birçok topikal yara irrigasyon solüsyon preparatları yaralarda kullanılmaktadır. Bu ürünlerin çok azı atlarda test edilmiştir (8). Sanchez ve ark. (17) tarafından yapılan çalışmada altı yetişkin dişi köpekte Klorheksidin Diasetat ve Povidon İyot irrigasyon solüsyonlarının yara iyileşmesi üzerine etkileri araştırılmışlardır. Oluşturulan yaralar (2x2 cm) günde bir kez olmak üzere 14 gün boyunca, %0.005-0.05 klorheksidin diasetat ve %0.1-1.0 povidon iyot konsantrasyonları yara bölgesine uygulanarak yara

iyileşmesi değerlendirildiği belirtilmiştir. Olgumuzda ise yara irrigasyonu %0.5 'lik Povidone lode solusyonu ile sağlanmıştır. Sanchez ve ark. Klorheksidin Diasetat solusyonunun ve Povidon lode solusyonundan çok daha fazla bakterisidal etkinliğe sahip olduğunu ve klorheksidin diasetat konsantrasyonunun uygulamadan altı saat sonra bile bölgede etkinliğini sürdürdüğünü bildirmiştir. Sanchez ve ark. (17) yapmış olduğu çalışmada elde edilen bulgular dikkate alındığında; olgumuzda tercih edilen Povidon iyot solusyonunun uygulandığı göğüs bölgesindeki yarada enfeksiyonun devam etmesi ve enfeksiyonun durmaması üzerine sekonder yara sağaltımına geçilmesi, Povidone İyot solusyonu yerine Klorheksidin solüsyonu tercih edilmesi halinde göğüs bölgesindeki yaranın primer olarak sağaltım ihtimalini düşündürmektedir. Sardari ve ark. (18) tarafından 10 Holstein boğa da yapmış oldukları açık yara tedavisinde, Theranekron uygulamasının yaranın kasılması ve epitelizasyonu üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Araştırmacılar boğaları rasgele iki gruba ayırarak, 0. günde her boğanın sırt bölgesinde bir adet cilt yarası (20×20 mm) oluşturduklarını rapor etmişlerdir. Birinci gruba 6 ml Theranekron SC uygulanmış ve 2. grup penisilin banzatin 10,000 IU/kg IM olarak uyguladıklarını bildirmişlerdir (18). Bu dozların yara oluşumundan altı gün sonra tekrarlandığı belirtilmiştir. Sonuç olarak gruplar arasında epitelizasyonda istatistiksel olarak bir fark olduğu ve theranekron uygulaması yapılan boğaların iyileşmenin ilk 14 günü boyunca yaralarda epitelizasyonu önemli ölçüde uyarabildiği belirtilmiştir. Olgumuzda 3-4 gün arayla theranekron uygulamasının yapılması bu çalışmadaki sonuçlarla paralellik arz etmektedir. Sardari ve ark. (18) tarafından yapılan çalışmada epitelizasyonun hızlanmasında theranekron uygulamasının etkinliğinden bahsedilmiş, olgumuzda da göğüs bölgesindeki açık yaranın bir ay gibi kısa sürede iyileşmesinin ve yüz ve tarsal eklem bölgesindeki yaraların 15 gün de tamamen iyileşmesinin theranekron uygulamasının önemli etkisi olduğu kanaatindeyiz.

Bu çalışmada bir atta şekillenen derin, enfekte ve üzerinden uzun zaman geçmiş maddi kayıplı açık yaralarda bölgenin irrigasyonu ve debriment yapıldıktan sonra, primer kapatma yolu ile sağaltımın yapılabileceği tespit edildi. Göğüs bölgesindeki yaranın bu sağaltımla iyileşmemesi durumunda açık yara tedavisine geçildiği, bölgenin düzenli irrigasyonu, pansumanı ve

debrimenti yapılarak bölgenin açık bir şekilde bırakılarak sağaltıma gidilmesinin travma üzerinden oldukça uzun zaman geçmiş bu yarada hızlı bir iyileşme gösterdiği saptandı. Primer iyileşme sağlanamayan olgularda günlük olarak düzenli yapılan bu tedavi protokolünün tedaviyi olumlu etkilediği tespit edildi. Çalışmada sekonder olarak iyileşme sürecinin gözlenmesi, yapılan uygulamaların iyileşme sürecine olan katkıları, kararlı ve düzenli uygulanan medikal tedavi sonrası elde edilen sonuçların veteriner pratiğe ve literatüre katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

Kaynaklar

1. Atiyeh BS, Dibo SA, Hayek SN. Wound cleansing, topical antiseptics and wound healing. *Int Wound J* 2009; 6(6): 420-30.
2. Auer JA, Stick JA. *Equine surgery*. Fourth Edition. Philadelphia: WB Saunders, 1999; pp 44-60.
3. Berry II DB, Sullins KE. Effects of topical application of antimicrobials and bandaging on healing and granulation tissue formation in wounds of the distal aspect of the limbs in horses. *Am Vet Med Assoc* 2003; 64(1): 88-92.
4. Bigbie R, Schumacher J, Moll D, Engelbert T. Equine amnion as a biological dressing in the treatment of open wounds in horses. *Proc Annual Conv Am Assoc Equine Pract* 1990; 35: 117-25.
5. Biricik HS, Hayat A, Eraslan H, Tursun G. Bir köpekte tissupor yara pedi ile kronik yara tedavisi: vaka takdimi. *Van Vet J* 2004; 15 (1): 75-7.
6. Dart AJ, Cries L, Jeffcott LB, Hodgson DR, Rose RJ. Effects of 25% propylene glycol hydrogel (Solugel) on second intention wound healing in horses. *Vet Surg* 2002; 31 (4): 309-13.
7. Edlich RF, Rodeheaver GT, Thacker JG, Lin KY, Drake DB, Mason SS, Vissers RJ. Revolutionary advances in the management of traumatic wounds in the emergency department during the last 40 years: Part I. *J Emerg Med* 2010; 38(1): 40-50.
8. Farstvedt E, Stashak TS, Othic A. Update on topical wound medications. *Clin Tech Equine Pract* 2004; 3(2): 164-72.
9. Fossum TW. *Small Animal Surgery Textbook -E-Book*. Elsevier Health Sciences. Fourth Edition. Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2013; pp 190-7.
10. Görgül OS, Yanık K, Seyrek-İntaş D, Bilgili

- H, Demirkan İ, Kılıç N, Altuğ E, Kibar M, Pekcan Z, Yiğitarıslan K, Çaptuğ Özdemir Ö. Veteriner Genel Cerrahi. Malatya: Medipres, 2012; ss. 308-30.
- 11.Green SL, Little CB, Baird JD, Tremblay RR, Simith- Maxie RR. Tetanus in the horse: A review of 20 cases (1970 to 1990). *J Vet Intern Med* 1994; 8(2): 128-32.
 - 12.Gültekin Ç, Koç B. Geniş torakolumbal yaranın punch greft uygulaması ile sağaltımı. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2015; 12(2): 141-6.
 - 13.Jacobs KA, Leach DH, Fretz PB, Townsend HGG. Comparative aspects of the healing of excisional wounds on the leg and body of horses. *Vet Surg* 1984; 13(2): 83-90.
 - 14.Karamuk E, Billia M, Bischoff B, Ferrario R, Wagner B, Moser R, Wanner M, Mayer J. Development of a textile wound dressing based on embroidery technology. *Eur Cell Mater* 2001; 1(1): 3-4.
 - 15.Knottenbelt DC. Equine wound management: are there significant differences in healing at different sites on the body? *Vet Dermatol* 1997; 8(4): 273-90.
 - 16.Lacopetti I, Perazzi A, Ferrari V, Busetto R. Application of platelet-rich gel to enhance wound healing in the horse: A case report. *J Equine Vet Sci.* 2012; 32(3): 123-8.
 - 17.Sanchez IR, Swaim SF, Nusbaum KE, Hale AS, Henderson RA, McGuire J. Effects of chlorhexidine diacetate and povidone-iodine on wound healing in dogs. *Vet Surg* 1988; 17(6): 291-5.
 - 18.Sardari K, Kakhki EG, Mohri M. Evaluation of wound contraction and epithelialization after subcutaneous administration of Therane-kron® in cows. *Comp Clin Path* 2007; 16(3): 197-200.
 - 19.Silver IA. Basic physiology of wound healing in the horse. *Equine Vet J* 1982; 14(1): 7-15.
 - 20.Stashak TS, Theoret CL. *Equine Wound Management*. New York: John Wiley & Sons, 2009; pp 14-231.
 - 21.Steenvoorde P, Jacobi CE, Oskam J. Maggot debridement therapy: Free-range or contained. An in-vivo study. *Adv Skin Wound Care* 2005; 18(8): 430-5.
 - 22.Theoret C L., Schumacher J, eds. *Equine Wound Management*. Third Edition. Ames: John Wiley & Sons, 2016; p. 509-42.
 - 23.Tulleners EP, Donawick WJ. Secondary closure of infected abdominal incisions in cattle and horses. *J Am Vet Med Assoc* 1983; 182(12): 1377-9.
 - 24.Waldron DR, Zimmerman-Pope N. Superficial skin wounds. Slatter D. eds. In: *Textbook of Small Animal Surgery*. Third Edition. Philadelphia: WB Saunders, 2003; pp. 259- 74.
 - 25.Wanner M, Karamuk E, Billia M, Bischoff B, Ferrario R, Wagner B, Moser R, Mayer J. Preliminary results of a new type of wound treatment. Fortieth Annual Scientific Meeting. September, 12-15, 2001; Nottwill-Swiss.
 - 26.Wilmink JM, Herten JV, Van Weeren PR, Barneveld A. Retrospective study of primary intention healing and sequestrum formation in horses compared to ponies under clinical circumstances. *Equine Vet J* 2002; 34(3): 270-3.

Sorumlu Yazar

Arş. Gör. Umut ALPMAN
Erciyes Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Cerrahi Ana Bilim Dalı,
Kayseri-TÜRKİYE
E-posta: umut_alpman@hotmail.com



Hyperammonemia Case in an Iceland Pony

Ali Cesur ONMAZ¹, Alexandra N. PAVALOIU², Ayhan ATASEVER³, Memiş ÇİDEM¹,
Rene Van Den HOVEN⁴

¹Erciyes University, Veterinary Faculty, Department of Internal Medicine, Kayseri-TURKEY

²University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Cluj,
Napoca-ROMANIA

³ Erciyes University, Veterinary Faculty, Department of Pathology, Kayseri-TURKEY

⁴Vienne University of Veterinary Medicine Vienna, Clinical Department of Small Animals and Horses,
Vienna-AUSTRIA

Summary: A 22 years old castrated male Iceland pony was presented at the Clinic of Vienna Veterinary University due to vague colic symptoms. The blood examination indeed revealed hyperammonemia (Ammonia: 136 µmol/L, normal value for healthy horses: <20 µmol/L). The patient received intravenous fluids aimed at flushing out toxic metabolites. Furthermore, lactulose was given per nasogastric tube. After this therapy, there was short-term improvement for some hours, but the animals again developed serious odd behavior. He was very ataxic and injured itself. Based on the bad prognosis, the owner took the decision to have the mare euthanized. Necropsy revealed cachexia, severe ascites; the liver seemed smaller, felt dense and had an irregular surface. Histopathology showed fibrotic degeneration and necrosis of the hepacytes, a generalized accumulation of fat, medium degree of edema and in all liver lobes. The diagnosis confirmed hepatocytes encephalopathy caused by hepatic cirrhosis.

Key words: Colic, horse, hyperammonemia

Bir İzlanda Ponisinde Hiperamonyemi Olgusu

Özet: 22 yaşında kısırlaştırılmış erkek bir İzlanda midillisi belirsiz bir sancı şikayeti ile Viyana Veteriner Üniversitesi Kliniği'ne getirildi. Kan örneklerinin incelenmesinde atta hiperamonyemi (Amonyak: 136 µmol/L, sağlıklı atlarda: <20 µmol/L) tespit edildi. Hastaya toksik metabolitlerin dışarı atılmasını sağlamak amacıyla intravenöz sıvı ve devamında nazogastrik tüp ile laktuloz verildi. Bu tedaviden sonra, hayvanda kısa süreli düzelme oldu, fakat daha sonra tekrar ciddi davranış bozuklukları şekillendi. Hayvanda ataksi ve kendi kendini yaralama belirtileri gözlemlendi. Prognozun iyi olmamasından dolayı sahibi ikna edilerek at ötenazi edildi. Nekropside, kaşeksi, şiddetli asites ve karaciğerin küçük ve düzensiz bir yüzeye sahip olduğu görüldü. Histopatolojik muayenede, intersitisyumda nekrotik hücreli fibröz bir dejenerasyon, kolestazis, orta dereceli hücrel ödem ve tüm karaciğer loblarında genel bir yağ birikimi gözlemlendi. Teşhis hepatik siroz kaynaklı hepatik ensefalopati olarak doğrulandı.

Anahtar kelimeler: At, hiperamonyakemi, kolik

Introduction

Clinical hyperammonaemia (HA) may develop due to increased production of ammonium (NH₄⁺) in the intestinal tract, increased absorption of ammonia (NH₃) due to increased intestinal permeability (both described as intestinal HA) or decreased hepatic clearance of NH₄⁺. The latter has been documented in equine cases of hepatic failure and HA is frequently encountered in horses with hepatic encephalopathy (7,10,12). Clinically, neurological signs associated with markedly increased blood NH₄⁺

concentrations have also been observed in severe colitis cases and surgical colic patients (4).

Case

The presented patient was a castrated male Icelandic pony; 22 years old, 404 kg. General behavior: highly apathetic, responded only to strong stimuli (gastric probe), otherwise non-responsive. The whole thoracic area was covered in sweat. The history of the patient revealed a dry hay and grass diet with a small amount of pellets but no changes in the diet prior to presentation. Teeth were last checked a year before, no medicine was administered prior to the appearance of the symptoms and no other horses manifested any symptoms. The horse

came to the clinic due to colic pain in the past 48 hours. The animal had not defecated in the past day. Last defecation was similar to abnormal very small apples. The patient was anorexic both water and food were not eaten, urination was not observed. The pony was examined in the field, with the following results: no fever, rectal examination seemed normal, gastric lavage normal. He was treated and seemed to be better during the transportation. During examination, the animal showed odd behavior and in its stall it showed head pressing and episodes of hyperexcitation. The pony was highly ataxic. Hepatic encephalopathy was suspected based on the signs shown. While leading the horse in a circle, the animal tripped and lost balance. The clinical examination on admission revealed an increased respiratory rate of 20 breaths/minute (normal range=10-14 breaths/minute) and pulse rate (68 beats/min, normal range=28-40 beats/min), the internal body temperature was 35.7 °C, therefore decreased (normal values 37.5-38 °C) as well as a capillary refill time

of 4 seconds. Conjunctiva and sclera were moderately icteric. Striking was also the jaundice of the conjunctiva and phases of hyper excitation with dromomania even against walls. The Pony was highly ataxic. By placing a nasogastric tube for lavage, large amounts of food could be flushed, that had a pH of 6 and a light putrid smell, which spoke for a stomach overload. In the rectal examination, we found a completely empty ampulla, a large bladder, the size of a football and singular small bowel loops in the left inguinal region. The blood examination revealed hyperammonemia (136 µmol/L, normal value for healthy horses <20 µmol/L). A slight tendency to blood acidity was found. The ammonia value improved initially on the following day, but rose again to 88 µmol /L on the second day of hospitalization. Lactate and glucose in the blood were increased. The measured creatinine, a blood value that has significance for renal function, was still within reference intervals but ALP, ALT, lactate, glucose and ammonia levels were increased significantly (Table 1).

Table 1. Laboratory data from a 22-year-old pony with ataxia, depression, and fever.

Analyse	Result	Reference Range
Hematology		
PCV (%)	42	30-45
Blood gas(venous)		
pH	7.340	7.32-7.44
pCO ₂ (mmHg)	38	38-46
Clinical Chemistry		
BUN (mg/dl)	11	7-25
Creatinin (mg/dl)	1.90	<2.0
Glucose (mg/dl)	178	65-110
TP (g/dl)	7.5	5.7-8.0
Albumine (g/dl)	2.2	2.2-3.7
Globuline (g/dl)	5.3	2.7-5.0
Total Bilirubin (mg/dl)	6.3	0.5-2.3
Amylase (U/l)	<5	5-15
ALP (U/l)	736	50-170
ALT (U/l)	30	5-20
Lactate (mmol/l)	11.97	0.5-2.0
Ammonia (µmol/l)	136	<20
Ca ⁺⁺ (mg/dl)	14	11.5-14.2
Phosphorus (mg/dl)	2.7	1.9-4.3
Na ⁺ (mmol/l)	124	126-157
K ⁺ (mmol/l)	3.9	3.5-4.5
Cl ⁻ (mmol/l)	100	98-107
HCO ₃ (mmol/l)	20.3	20-28
Beb (mmol/l)	-5.5	-2.5 - +2.5
Beecf (mmol/l)	-5.5	-2.5 - +2.5

In the box, the horse showed symptoms of dromomania towards the right, dragged his toes, seemed to be hypermetric, also hitting his head on the watering and feeding system. While leading the horse in a circle, the tail was pulled towards the left he was easily misbalanced and crossed his legs- when the tail was pulled to the right, the horse showed slightly more resistance.

Neurological testing revealed a hyper salivating, thirsty yet unable to drink, apathetic animal, with low swallowing reflexes, hanging head and a tendency to support his head on the wall.

Ultrasound examined showed the stomach distended up to the 13th intercostal space, with large amounts of free anechogenic free fluid. The colon had hypomotility and a very thickened. In the inguinal area, we could identify small intestinal loops with hypomotility and thickened walls, the liver was hypoechogenic. The abdominal cavity revealed a large quantity of abdominal fluid, which was odorless, yellow, normoproteic (1.6 g/dL (normal values <2.5), specific gravity 1025 (normally <1020), diagnosed as an ascites transsudate.

Based on these findings, the diagnosis of hepatic encephalopathy could be made. The horse received infusions to support the fluid and electrolyte balance and to "dilute" and flush out toxic metabolites (Buscopan-compositum - Injektionsloesung fuer Tiere i.v Finadyne 50 mg/mL - Injektionsloesung fuer Rinder, Pferde und Schweine 9 mL i.v, paraffinum liquidum PHE 10 L Kanister 1.5 L, Cimetidin 500 g pulver 2 measuring cups, lactulose "MIP" 650 mg/mL - Loesung zum Einnehmen 700 mL).

During the hospital stay, the state of the pony deteriorated despite intensive therapy and a short-term improvement of consciousness after treatment with magnesium sulfate 2.4% 1000 mL, 100 mL i.v, DMSO, reinst M16743 1000 mL 400 mL i.v, vanavit B-Komplex - 30 mL i.v, NaCl 0.9 % 500 mL 1 bottle, LAEVOLAC - Lactulose - Concentrate 1340 g oral suspension 1 packet). He showed more organ dysfunction especially the cardiovascular system with a very high-frequency heart rate (constantly > 120 beats/min) and edemaformation. The patient had hypothermia, multiple edemas, sinus tachycardia and jaundice. His some values were as follows: 36.8 °C temperature, Pulse 88 beats per minute, CRT: 2 seconds. The laboratory results before euthanasia showed: Ammonia: 88.00 µmol/L, Glucose: 193.00 mg/dL,

Due to the rapid deterioration of clinical symptoms despite supportive therapy, the owner decided for euthanasia.

Necropsy revealed a low body conditioning score, severe ascites, and liver seemed smaller and rougher (Figure 1A). The histopathological examination showed pseudolobule formations in liver (Figure 1B), hydropic degeneration, necrosis, and sinusoidal dilatation were detected. Interlobular areas were widened due to development of fibrosis (Figure 1C). Formation of fibrosis starting from the portal regions through the parenchyma with presence of occasional necrotic hepatocytes and mononuclear cellular infiltration was evident (Figure 1D).

The stomach had low food content, small intestine was also only lightly filled, whereas cecum and colon were tympanized and filled with gastrointestinal content. There was with a submucosal edema in the ventral parts of the colon. In the thorax, there was an accumulation of fluid, as well as light hydropericardium, right and left heart hypertrophy. The rest of the organs showed no pathological changes. The diagnosis of the pathology department was hepatic cirrhosis.

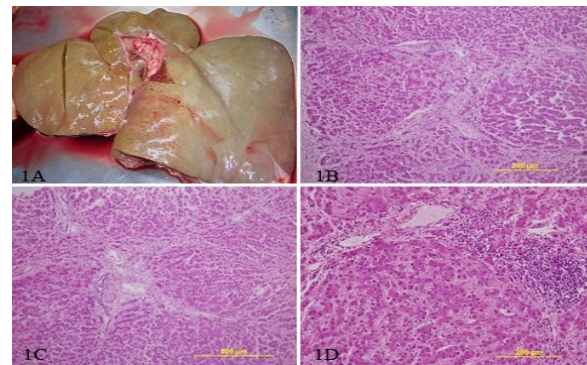


Figure 1. The macroscopic and microscopic examinations of the liver: 1A) Macroscopic view of the liver 1B) Pseudo lobe formation in liver 1C) Increased areas of connective tissue in the interlobular region of the liver 1D) Increased lymphoid cell infiltration in the portal area

Discussion and Conclusion

Although liver disease is the most commonly reported cause of hyperammonemia in horses, the laboratory data and history of colic in this case might be compatible with hyperammonemia associated with gastrointestinal disease (3,8). The case supported this hypothesis. Toxic ingestion of ammonium salts or urea supplements were unlikely in this case because other horses on the farm were not affected and hors-

es are relatively resistant to urea poisoning (11), which can be induced experimentally (6).

Main sources of ammonia are colon (through bacterial metabolism of proteins and urea) and small intestine (through bacterial degradation of glutamine). The ammonia then is delivered to the liver via the enterohepatic circulation, where it is catabolized to urea, which subsequently is excreted by the kidney (1). The main metabolic route is uptake of ammonia by periportal hepatocytes followed by urea synthesis via the urea cycle. Ammonia that escapes this pathway is converted to glutamine in perivenous hepatocytes. Hepatic transformation of ammonia into urea and subsequent excretion of urea via colon or kidneys prevent entrance of ammonia into the systemic circulation. If the hepatic metabolic capacity is exceeded, or if ammonia bypasses the liver by shunting of blood, circulating ammonia levels increase and elimination of ammonia is shifted to kidneys, brain, and skeletal muscle. Hyperammonia usually is associated with either hepatic failure (or subsequent loss of sufficient urea cycle activity to catabolize ammonia) or vascular shunting of blood around the liver (5). An inherited enzyme deficiency in the urea cycle has been reported in 2 Morgan foals and resulted in persistently increased ammonia concentrations in blood (9). Hyperammonemia also can be the result of increased absorption from the intestinal tract following ingestion of toxic levels of ammonia or urea as well as from increased bacterial breakdown of urea leading to increased production of ammonia (3,5,8,11).

Hyperammonemia contributes to hepatic encephalopathy in patients with liver failure; however, there are pathophysiologic differences between the neurologic syndrome associated with hyperammonemia caused by gastrointestinal disease, intoxication, or congenital metabolic defects, and that observed in patients with liver failure (1). Patients with liver failure have additional metabolic complications that are not described in patients with other causes of hyperammonemia (2). Increased ammonia can affect the brain via a number of different mechanisms, although there is controversy in the literature regarding the details and relative importance of various pathologic effects. Ammonia appears to impair postsynaptic inhibition, inhibit excitatory neurotransmission, and contribute to brain edema by causing cellular swelling of astrocytes (2). And this may cause brain disorders

such as ataxia, incoordination. Characteristic histopathologic findings in the brains of horses reported to have hyperammonemia associated with gastrointestinal disease include predominantly grey-matter proliferation of Alzheimer type II astrocytes (5,11).

The gross and histopathologic findings in this horse confirmed that liver pathology was sufficient to explain the severe hyperammonemia.

References

1. Bachmann C. Mechanisms of hyperammonemia. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40(7): 653-62.
2. Chan H, Butterworth RF. Cell-selective effects of ammonia on glutamate transporter and receptor function in the mammalian brain. *Neurochem Internat* 2003; 43(4-5): 525-32.
3. Desrochers AM, Dallap BL, Wilkins PA. *Clostridium sordelli* infection as a suspected cause of transient hyperammonemia in an adult horse. *J Vet Intern Med* 2003; 17(2): 238-41.
4. Dunkel B, Chaney KP, Dallap-Schaer BL, Pellegrini-Masini A, Mair TS, Boston R. Putative intestinal hyperammonemia in horses: 36 cases. *Equine Vet J* 2011; 43(2): 133-40.
5. Hasel KM, Summers BA, Delahunta A. Encephalopathy with idiopathic hyperammonemia and Alzheimer type II astrocytes in Equidae. *Eq Vet J* 1999; 31(6): 478-82.
6. Hintz HF, Lowe JE, Cliffor AJ, Visek WJ. Ammonia intoxication resulting from urea ingestion by ponies. *J Am Vet Med Assoc* 1970; 157(7): 963-6.
7. Hughes KJ, Mcgorum BC, Love S, Dixon PM. Bilateral laryngeal paralysis associated with hepatic dysfunction and hepatic encephalopathy in six ponies and four horses. *Vet Rec* 2009; 164(5): 142-7.
8. Mair TS, Jones RD. Acute encephalopathy and hyperammonemia in a horse without evidence of liver disease. *Vet Rec* 1995; 137: 642-3.
9. Mcconnico RS, Duckett WM, Wood PA. Persistent hyperammonemia in two related Morgan weanlings. *J Vet Intern Med* 1997; 11(4): 264-6.
10. Mcgorum BC, Murphy D, Love S, Milne EM. Clinicopathological features of equine primary hepatic disease: A review of 50 cases. *Vet Rec* 1999; 145(5): 134-9.
11. Peek SF, Divers TJ, Jackson CJ. Hyperam-

monemia associated with encephalopathy and abdominal pain without evidence of liver disease in four mature horses. *Eq Vet J* 1997; 29(1): 70-4.

12. West HJ. Clinical and pathological studies in horses with hepatic disease. *Equine Vet J* 1996; 28(2):146-56.

Corresponding Author:

Assoc. Prof. Ali Cesur ONMAZ
Erciyes University,
Veterinary Faculty,
Department of Internal Medicine,
Kayseri-TÜRKİYE
E-mail: aconmaz@erciyes.edu.tr

Yazım Kuralları

1. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'nde veteriner bilimlerini ilgilendiren alanlarda orijinal araştırmalar, olgu sunumları, araştırma notları, kısa bildiri, derleme ve editör mektup yayımlanır.
2. Bütün eserler yayın kurulunun ve danışma kurulunun onayından geçtikten sonra yayımlanır.
3. Dergide yayımlanacak yayımlar için resmi dil Türkçe'dir. İngilizce yazılmış eserler de yayımlanabilir. **İngilizce hazırlanmış makalelerin yayımlanmasına öncelik verilir.**
4. Yayımlar A4 tipi formatta, çift aralık, Arial ve 10 punto olarak yazılmalıdır. Her kenardan 2.5 cm boşluk bırakılarak, sayfaların sağ altına numara verilmelidir. Resimler, şekiller ve kaynaklar dâhil orijinal makaleler 14, derlemeler 14, olgu sunumları, araştırma notu ve kısa bildiriler 7 sayfayı geçmemelidir.
5. Daha önce kongrelerde tebliğ edilmiş ve özeti yayımlanmış çalışmalar, bu özelliği belirtilmek üzere kabul edilebilir. Araştırma herhangi bir kuruluş tarafından desteklenmiş ise makalenin başlığının son kelimesi üzerine yıldız (*) konularak kapak sayfasında dipnot olarak belirtilir.
6. Etik kurul onayı gerektiren çalışmalarda Etik Kurul onayı alınan kurumun adı ve onay numarası Gereç ve Yöntem kısmında belirtilmelidir.
7. Araştırma makalesi; Kapak Sayfası - Türkçe Özet - Anahtar kelimeler - İngilizce Özet (Summary) - İngilizce Anahtar Kelimeler (Key words) - Giriş - Gereç ve Yöntem - Bulgular - Tartışma ve Sonuç - Teşekkür - Kaynaklar - Tablo ve Şekiller - Sorumlu yazar (Correspondence) bölümlerini içerecek şekilde düzenlenmelidir. Metin içindeki tüm başlıklar koyu yazılmalıdır. Metin içinde paragraf girintisi yapılmamalı, devamlı satır numarası verilmelidir. Sayfa numaraları sağ alt köşeye yazılmalıdır.
8. Kapak sayfasında sadece Türkçe makale başlığı (koyu ve ilk harfleri büyük), İngilizce başlık (ilk harfler büyük), kısa başlık (40 karakteri geçmemeli ve ilk kelimenin ilk harfi büyük, diğerleri küçük olarak yazılmalıdır), yazar adları (unvansız), çalıştıkları kuruma ait bilgiler (soyadı üstüne numara konulup dipnot olarak, unvansız) verilmelidir.
9. Türkçe ve İngilizce özetler kapak sayfasından sonraki sayfaya yazılmalıdır. Özet kısımları makale başlığı, çalışmanın amacı, gereç ve yöntem, bulgular ve çalışmada varılan sonuçları içerecek şekilde hazırlanmalıdır. Özet metni, makale başlığı (kelime baş harfleri büyük, diğer harfler küçük olacak şekilde ve ortalı ve bold biçimde) yazıldıktan sonra başlığın altında en fazla 250 kelime olmalıdır. Paragraf yapılmamalıdır. Özet kısmında kısaltma kullanılacaksa, kısaltmalar ilk kez kullanıldığında açık olarak yazılmalı, daha sonra özet içinde hep aynı kısaltma kullanılmalıdır. İngilizce Özet (Summary): İngilizce makale başlığı (kelime baş harfleri büyük, diğer harfler küçük olacak şekilde ve ortalı ve bold biçimde) yazıldıktan sonra başlığın altında en fazla 250 kelime olmalıdır. Paragraf yapılmamalıdır. Özet kısmında kısaltma kullanılacaksa, kısaltmalar ilk kez kullanıldığında açık olarak yazılmalı, daha sonra özet içinde hep aynı kısaltma kullanılmalıdır. Anahtar Kelimeler: Türkçe ve İngilizce olarak özetlerin altına, alfabetik sıra ile ilk kelimenin baş harfi büyük, diğerleri küçük harfle (özel isimler baş harfi büyük) en fazla 5 kelime olarak yazılmalıdır. Anahtar kelimelerin Türkiye Bilim Terimleri'nden seçilmesine özen gösterilmelidir.
10. Giriş bölümünde çalışma ile doğrudan ilişkili kısa literatür bilgisi verilmeli, bu kısmın son paragrafına çalışmanın hipotezi ve amacı yazılmalıdır. Bu bölüm 2 sayfayı geçmemelidir.
11. Kullanılacak alt başlıklar paragraf girintisi yapılmadan *italik*, ikinci alt başlıklar normal yazı tipinde olacak şekilde hazırlanmalıdır.
12. Bulgular; kısa, öz ve anlaşılır bir şekilde yazılmalıdır. Tablolarda gösterilen verilerin tekrar yazılmasından kaçınılmalıdır. Kullanılacak alt başlıklar paragraf girintisi yapılmadan *italik*, ikinci alt başlıklar normal yazı tipinde olacak şekilde hazırlanmalıdır. Tablo ve şekillerin metinde geçeceği yer, altı ve üstü çizgili olarak belirtilmelidir.
13. Tartışma ve Sonuç bölümüne, çalışmadan çıkarılan sonuçlar ve yargıları içeren kısa bir sonuç paragrafı eklenmelidir.
14. Kısaltmalar ilk kez kullanıldığında açık olarak yazılmalı daha sonra makale içinde hep aynı kısaltma kullanılmalıdır. Ondalık ifadeler nokta kullanılmalıdır.
15. Yazı içinde geçen tür isimleri ve anatomik terimler gibi Latince ifadeler *italik* karakterle yazılmalıdır. Tüm ölçü birimleri SI (*Système Internationale*)'e göre verilmelidir.
16. Tablo ve şekil başlıklarının yalnızca ilk harfleri büyük olmalıdır. Tablolar kaynaklar kısmından sonra, her bir tablo ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir. Tablo başlıkları **Tablo 1.** şeklinde numaralandırılmalıdır. Tablolarda iç ve yan kılavuz çizgiler kullanılmamalıdır. Tablo yazısı tablonun üstüne yazılmalı, tabloda geçen kısaltmalar tablo altında belirtilmelidir.
17. Her resim, grafik ve çizim; şekil olarak kabul edilip **Şekil 1.** gibi yazılmalı, her biri ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir.
18. Resimler 300dpi çözünürlükte olmalıdır. Resimlerin fotokopisi kabul edilmemektedir. Kullanılan resimlerin dergide renkli basılmasının istenilmesi durumunda ücret talep edilecektir.
19. Derlemeler, orijinal olması, en son yenilikleri içermesi, yazarların konu ile doğrudan ilişkili **en az 3 adet** çalışmalarının olması ve bunların derleme içinde kullanılması durumunda yayınlanmak üzere kabul edilebilecektir. Derlemeler kapak sayfası, Türkçe Özet - Anahtar kelimeler - İngilizce Özet (Summary) - İngilizce Anahtar Kelimeler (Key words) - Giriş, konunun kendine ait alt başlıkları, Sonuç, Kaynaklar, Tablo ve Şekiller ve Sorumlu yazar (Correspondence) bölümlerini içerecek şekilde düzenlenmelidir. Derlemelerde kullanılacak alt başlıklar paragraf girintisi yapılmadan *italik*, ikinci alt başlıklar normal yazı tipinde olacak şekilde hazırlanmalıdır.
20. Olgular, Türkçe Özet - Anahtar kelimeler - İngilizce Özet (Summary) - İngilizce Anahtar Kelimeler (Key words) - Giriş - Olgular - Tartışma ve Sonuç - Kaynaklar - Tablo ve Şekiller ve Sorumlu yazar (Correspondence) bölümlerini içermelidir. Kullanılacak alt başlıklar paragraf girintisi yapılmadan *italik*, ikinci alt başlıklar normal yazı tipinde olacak şekilde hazırlanmalıdır.
21. Metin içinde belirtilen tüm kaynaklar "Kaynaklar" listesinde yer almalıdır. Kaynaklar yazılırken alfabetik sıraya konulmalı, noktalama işaretlerine örneklerde gösterildiği şekilde dikkat edilmeli ve yazı içinde her kaynağa ait numara ilgili olan cümlelerin sonunda parantez içinde mutlaka belirtilmelidir. Dergi kısaltmaları *Index Medicus* ile uyum içerisinde olmalıdır. Araştırma makalelerinde en fazla 30, derlemelerde 45 ve olgu sunumlarında ise 15 kaynak kullanılmalıdır.
22. Kaynaklar;
 - 22.1. Kaynak süreli yayın ise; yazar(lar)ın soyad(lar)ı ve isim(ler)inin baş harf(ler)i, makale ismi, dergi ismi, yıl, cilt (olması durumunda), sayı ve sayfa numaraları belirtilmelidir. Örnek: Kaldhone P, Nayak R, Lynne AM, Dvaid DE, McDermott PF. Characterisation of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from Turkey-associated sources. Appl Environ Microbiol 2008; 74(16): 5038-46.
 - 22.2. Kaynak editörlü kitap bir bölüm ise; yazar(lar)ın soyad(lar)ı ve isim(ler)inin baş harf(ler)i, bölüm ismi, editör soyad(lar)ı ve isim(ler)in baş harfi, kitap ismi, kaçınıcı baskı olduğu, baskı yeri, yayınevi adı, basım yılı ve sayfa numara(lar)ı belirtilmelidir. Örnek: Hornbeck P. Assay for antibody production. Colign JE, Kruisbeek AM, Margules DH. eds. In: Current Protocols in Immunology. New York: Greene Publishing Associates, 1991; pp. 105-32.
 - 22.3. Kaynak kitap ise; yazar(lar)ın soyad(lar)ı ve isim(ler)inin baş harf(ler)i, kitap ismi, kaçınıcı baskı olduğu, baskı yeri, yayınevi adı, basım yılı ve sayfa numara(lar)ı verilmelidir. Örnek: Fleiss JL. Statistical Methods for Rates and Proportions. Second Edition. New York: John Wiley and Sons, 1981; p.103.
 - 22.4. Kaynak editörlü kitap ise; yazar(lar)ın soyad(lar)ı ve isim(ler)inin baş harf(ler)i, eds kısaltması, kitap ismi, kaçınıcı baskı olduğu, baskı yeri, yayınevi adı, basım yılı ve sayfa numara(lar)ı verilmelidir. Örnek: Balows A, Mousier WJ, Herramaf KL, eds. Manual of Clinical Microbiology. Fifth Edition. Washington DC: IRL Press, 1990; p. 37.
 - 22.5. Kaynak kongre bildirisi ise; yazar(lar)ın soyad(lar)ı ve isim(ler)inin baş harf(ler)i, bildiri ismi, kongre adı, kongrenin yapıldığı ay ve tarih, yıl, şehir ve ülke bilgileri verilmelidir. Örnek: Entrala E, Mascarp C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, 1994; İzmir-Türkiye.
 - 22.6. Tezler;
 - 22.7. Kaynak tez ise; yazarın soyadı ve isminin baş harfi, tezin ismi, tezin türü, enstitü ismi, şehir, tezin kabul yılı ve sayfa numara(lar)ı belirtilmelidir. Örnek: Erdem V. Köpek göz hastalıklarında klinik oftalmoskopik ve ultrasonografik bulguların değerlendirilmesi, Doktora tezi, Ankara Üniv Sağlık Bil Ens, Ankara 2003; s. 1-2.
 - 22.8. Kaynak internete bulunan bir web sitesi ise, yazar(lar)ın soyad(lar)ı ve isim(ler)inin baş harf(ler)i, (yazar adı yoksa web sitesinin veya kaynağının adı) yazılır. Daha sonra

sırasıyla yılı, makalenin adı, varsa yayıncı, internet adresi ve erişim tarihi belirtilir. Kaynak olarak web siteleri kullanılacak ise sınırlı sayıda olmasına ve resmi web sitelerinin kullanılmasına özen gösterilmelidir.

Örnek: Mevzuatı Geliştirme ve Yayın Genel Müdürlüğü Mevzuat Bilgi Sistemi, 30.06.2013, Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, Türkiye Cumhuriyeti Başbakanlık, <http://www.mevzuat.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=7.5.18532&MevzuatIliski=0&sourceXmlSearch=katki>, Erişim tarihi: 23.02.2016.

23. Eserler dergide yayımlandıktan sonra, bütün sorumluluk sahiplerine aittir.

24. Yazılar gönderilirken son kontrol listesi izlenecek ve yayın hakkının devri sözleşmesi tüm yazarlarca isim sırasına göre imzalanacaktır. **Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmayan ve yayın hakkı devir sözleşmesi bulunmayan yayınlar işleme alınmayacaktır.**
25. Yazılar, ercvet@gmail.com adresine gönderilmelidir. Yazışmalar için, makale sonunda ayrı bir sayfada, yazar adı, unvanı yazılıp, haberleşme adresi, telefon, fax numarası ve e-mail adresi yazılmalıdır.

Instructions to Authors

1. The Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University publishes original papers, short communications, case reports, letter to editor and original review articles related to the field of Veterinary Medicine.
2. Editorial board and advisory committee must prove all manuscripts before considered publication.
3. Formal language of manuscripts is Turkish. However, manuscripts in English, German, and French are also accepted. And the beginning of the manuscript must contain the Turkish and English summaries.
4. Original manuscripts must be typed in Word program and e-mail to ercvet@gmail.com.
Manuscript must contain a separate page (as a last page of the manuscript) including the corresponding author's name, his/her title, communication address, phone number, fax number, and e-mail address.
5. Original papers and reviews should normally not exceed 12 and 15 pages respectively. Case reports, research notes and short communications also should not exceed 6 pages including tables and figures. Manuscripts must be printed A4 papers. Font size must be 10 pt (Arial) and legible. Manuscripts must be type written with double spacing and wide margins (3cm each side). All pages must be numbered consecutively.
6. Studies were partially presented in a national or international meeting or published as an abstract in any journal can be published with indication of this status at the bottom of the page (footnote). In the same page, information should be included on any institutions or individuals who financially contributed to the work. This information must be showed in the running title of the manuscript as an asterisk also seen at the bottom of the page (footnote).
7. Copyright Release form must be filled and signed by all authors. Final checklist should also be followed.
8. The manuscript must be submitted with Animal Care and Use Committee report if the work requires.
9. Manuscript must be organized as follows: Summary (Turkish and English), Key Words, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion and Conclusion, Acknowledgements, References, Tables, Figures, Charts, Graphs and Photographs and their explanations. All titles of sections must start with capital letter and be bold. Paragraphs in the text should not indented, but lines should be numbered.
10. The cover page should be supplied as a separate page and include: running title, max 40 characters in English with the first letters capital, the name(s) of the author(s) without titles, affiliations and complete postal address of all author(s). Superscript numbers should be given to the surnames of authors as affiliation information.
11. The title page must contain the Turkish and English summaries (up to 200 words) with no paragraph and not more than five Key Words in Turkish and English. Key Words must be placed below summary with an alphabetical order. Only the first Key Word must start with a capital letter.
12. Abbreviations should be defined when first used and be consistent throughout the text.
13. Names of tables and figures must be given in a separate page. Through the manuscript, tables and figures must be replaced a proper place and contain descriptive information related to the table or figure. Descriptive information must be placed above the tables but below the figures in the text with any explanations or footnotes below. Title of figure and photographs must be numbered in order as figure 1, figure 2 or so. Each page must contain no more than one figure or table. Figures must be suitable for high quality print. Line drawings should be printed by laser or inkjet printer. Lines in tables should be hidden.
14. All cited works in the text must be present in literature section. References must be assembled alphabetically. In the text, they should be referred with numbers. Places must be indicated within the text. Periodicals, books, multi author books, chapter of a book and other references must be given as follows: Journal titles should be abbreviated according to the Index Veterinarius.
15. Species names and anatomical terms in Latin should be italicized. All measurement specifications must follow the SI (Système Internationale) units.
16. Photographs must be of good quality, black and white and printed on glossy paper. Photocopies of photographs are not acceptable. Color photographs are accepted but the contributor must meet money charge. Also, if color photographs are desired or necessary all needed material must be provided. Photographs should be clearly marked on the reverse side with the number, author's name and orientation (top), use a soft pencil.
17. Review articles are considered for publications if they are original and contain recent developments. Reviews contain title as in research manuscripts, summary, introduction, subtitles appropriate for the review, result and literature cited. Key Words are also added.
18. Case reports must contain Summary, Key Words, Introduction, Case(s), Results and Discussion, and Literature cited.
19. Literature;
- 19.1. If the source is a periodical, citation must be done as shown below example: Kaldhane P, Nayak R, Lynne AM, Dvaid DE, McDermott PF, Logue CM, Foley SL. Characterisation of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from turkey-associated sources. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(16): 5038-46.
- 19.2. If the source is from chapter of a book with an editor, citation must be done as shown below example: Hornbeck P. Assay for antibody production. Colign JE, Kruisbeek AM, Marguiles DH. eds. In: *Current Protocols in Immunology*. New York: Greene Publishing Associates, 1991; pp. 105-32.
- 19.3. If the source is a book, citation must be done as shown below example: Fleiss JL. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. Second Edition. New York: John Wiley and Sons, 1981; p.103
- 19.4. If the source is whole book with an editor, citation must be as below example: Balows A, Mousier WJ, Herramaf KL, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth Edition. Washington DC: IRL Press, 1990; p. 37.
- 19.5. If the source is from meeting, citation must be done as shown below example: Entrala E, Mascarp C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, 1994; İzmir-Türkiye.
- 19.6. If the source is from a thesis, citation must be done as shown below example: Erakinci G. Investigation of Antibodies Against Parasites in Blood Donors. PhD Thesis. Ege Univ. Institute of Health Sciences. Parasitology Program, İzmir-Turkey, 1993.
- 19.7. The source is a website on the internet, the initials of the authors' surnames and names (if there is no name of author the name of the website or of the source) are written. Then the years and title of the article, Publisher (if any), internet address and arrival date are specified in this order.
If websites are to be used as source, care must be taken to keep it limited and the website to be official.
Example: TUIK. Hayvancılık İstatistikleri. http://www.tuik.gov.tr/hayvancilik_app/hayvancilik_zul; Accessed Date: 14.03.2010.
20. Once the studies one published in the journal, all the responsibility belongs to the authors.

TELİF HAKKI DEVRİ / COPYRIGHT RELEASE
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ / JOURNAL OF FACULTY OF
VETERINARY MEDICINE, ERCIYES UNIVERSITY

Makale Türü/ Article Type:

.../.../20..

(...) Araştırma / Research (...) Derleme / Review (...) Kısa Bilimsel Çalışma / Short Communication

(...) Olgu Sunumu / Case Report (...) Editöre Mektup / Letter to Editor

Makale Başlığı/Article

Entitled:.....
.....
.....

Sayın Editör,

- Yayınlanması dileğiyle Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne gönderdiğimiz makalenin yazarları olarak;
- 1- Derginizde yayımlanmak üzere yollamış olduğumuz makalenin orijinal olduğunu; bilimsel ve etik sorumluluğunun bize ait olduğunu,
 - 2- Makalenin; daha önce yayımlanmadığını, derginizdeki değerlendirme sürecinde başka bir yayın organına yayımlanmak üzere gönderilmediğini ve gönderilmeyeceğini,
 - 3- Makalenin; kişilik ve telif haklarına aykırı kanun dışı maddeler içermediğini,
 - 4- Gerekli görülen düzeltmelerle birlikte her türlü yayın hakkını, yazının yayımlandığı günden itibaren Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne ait olduğunu kabul ve beyan ederiz.

Dear Editor,

Here we affirm and warranty as the Author(s) of this manuscript submitted to Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University that;

- 1- The manuscript /We submitted to the Bulletin is original and responsibilities belong to us ethically and scientifically,
- 2- The manuscript has not been previously published, being considered for publication by any other journal and will not be submitted to any other journal for such review while under evaluation by this bulletin,
- 3- The manuscript contains no unlawful statements and does not contain any materials that violate any personal or proprietary rights.
- 4- The Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University reserves all rights with due corrections from the date it has been published onwards.

Yazar/ Yazarların Adı

Author's/Authors' Printed Name

1).....İmza/Signature:.....

2).....İmza/Signature:.....

3).....İmza/Signature:.....

4).....İmza/Signature:.....

5).....İmza/Signature:.....

Not/Note: Formu aşağıdaki adrese,e-mail ya da posta yolu ile gönderiniz veya elden teslim ediniz./ Please send this form to the address below by e-mail, post or deliver personally.

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi / Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi Editörlüğü, 38039, Melikgazi-KAYSERİ / TÜRKİYE
Tel/Phone: 0352 339 94 84 Faks/Fax: 0352 337 27 40 e-posta/e-mail: ercvet@gmail.com

SON KONTROL LİSTESİ

Makalenizi göndermeden önce lütfen bu bölümdeki maddelerle karşılaştırma yapınız ve eksiklikleri gideriniz.

- Eksiksiz doldurulmuş ve bütün yazarlarca imzalanmış **“Telif Hakkı Devri Formu”** (<http://ercvet.gmail.com> adresinden ulaşabilirsiniz) makale ile birlikte gönderildi.
- Metnin tamamı çift aralıklı (5 mm) yazıldı (özetler, tablolar, şekil alt yazıları, kaynaklar v.d. dahil).
- Her bir kenarda 2,5 cm boşluk bırakıldı.
- Yazılar 10 punto (Arial) ile yazıldı.
- Satır numaraları verildi.
- Kapak sayfasında, makalenin başlığı (sadece yazım dilindeki) koyu (bold) yazıldı, kısa başlık eklendi.
- Kapak sayfasında, yazar isimleri açık olarak yazıldı (kısaltma yok).
- Kapak sayfasına dipnot (varsa) eklendi.
- Türkçe başlık yazıldı.
- Türkçe özet yazıldı.
- Türkçe anahtar kelimeler (alfabetik sıralı ve ilk kelimenin ilk harfi büyük diğerleri küçük harfle yazıldı) verildi.
- İngilizce başlık yazıldı.
- İngilizce özet yazıldı.
- İngilizce anahtar kelimeler verildi.
- Şekillerin orijinal halleri eklendi.
- Metin içinde şekiller ardışık numaralandı.
- Şekil boyutları min.=8x20; max.=16x20 cm.
- Metin içinde tablolar ardışık numaralandı.
- Tablo boyutları min.=8x20 cm; max.=16x20 cm.
- Şekil ve tabloların metin içinde gelmesi istenilen yer belirtildi.
- Şekiller listesi ayrı bir sayfa olarak hazırlandı.
- Her şekil ayrı sayfaya yerleştirildi.
- Tablolar listesi ayrı bir sayfa olarak hazırlandı.
- Her tablo ayrı sayfaya yerleştirildi.
- Kaynaklar yazım kurallarına uygun yazıldı.
- Yazışma adresi verildi.

FINAL CHECKLIST

Before you submit your work, please take the time to be certain that your paper (and other writings as applicable) is in the correct format and that you have included everything necessary by checking it against this checklist.

- Copyright Release Form has been enclosed, completed and signed by all authors (<http://ercvet.gmail.com>).
- Entire paper has been 5 mm double-spaced (abstract, tables, captions/legends, references).
- Margins have been 2,5 cm each side.
- Font size has been 10 pt (Arial).
- Lines have been numbered.
- Title of the manuscript has been written bold and short title added on the cover page.
- Author(s) names have been fully written (not abbreviated) on the cover page.
- Footnote has been given on the cover page (if necessary)
- English title has been given.
- English summary has been given.
- English keywords have been given alphabetically.
- Turkish title has been given.
- Turkish summary has been given.
- Turkish keywords have been given alphabetically.
- Original figures have been enclosed.
- Original figures have been prepared correctly according to instructions.
- Figures have been referred to consecutively in the paper.
- Dimensions of figures have been min =8x20 cm; max.=16x20 cm.
- Tables have been referred to consecutively in the paper.
- Dimensions of tables have been min =8x20 cm; max.=16x20 cm.
- Figures and tables have been stated requiring put on the manuscript.
- Names of figures have been given on a separate page as figure list.
- Each figure has been given on a separate page.
- Names of tables have been given in a separate page as table list.
- Each table has been given on a separate page.
- References has been typed according to instructions.
- Corresponding address has been given.