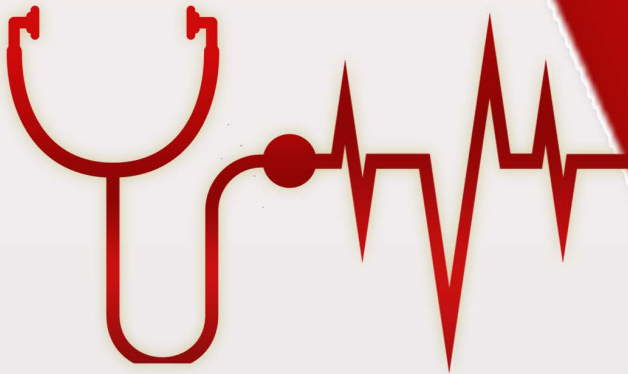


e- ISSN : 2757-5179



Bozok Veterinary Sciences



Volume 3

Issue 1

June

2022

**ON BEHALF ON YOZGAT BOZOK UNIVERSITY FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
OWNER**

Prof. Dr. Ahmet KARADAĞ, Rektor

EDITOR-IN-CHIEF (BAŞ EDİTÖR)

Dr. Akın KIRBAŞ, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

ASSISTANT EDITORS (EDİTÖR YARDIMCILARI)

Dr. Elmas ULUTAŞ, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Dr. Güvenç GÖKALP, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Dr. Seçil SEVİNÇ TEMİZKAN, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-
YOZGAT

Dr. Sema ÇAKIR BAYRAK, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

BASIC SCIENCE EDITORS (TEMEL BİLİM EDİTÖRLERİ)

Dr. Elmas ULUTAŞ, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Dr. Gökhan AKÇAKAVAK, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

**PRECLINICAL SCIENCES- FOOD HYGIENE AND TECHNOLOGY EDITORS (KLİNİK ÖNCESİ
BİLİMLERİ- GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ EDİTÖRLERİ)**

Dr. Seçil SEVİNÇ TEMİZKAN, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Dr. İmran GARİP, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

CLINICAL SCIENCES EDITORS (KLİNİK BİLİMLERİ EDİTÖRLERİ)

Dr. Sema ÇAKIR BAYRAK, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Dr. Güvenç GÖKALP, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

**ZOOTECNICS- ANIMAL NUTRITION AND NUTRITION DISEASES EDITORS (ZOOTEKNİ-
HAYVAN BESLEME VE BESLEME HASTALIKLARI EDİTÖRLERİ)**

Dr.Tünay KARAN, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

ENGLISH ADVISER (İNGİLİZCE DANIŞMANI)

Dr. Mehmet Ertuğ YAVUZ, Yozgat Bozok Üniversitesi Yabancı Diller Yüksekokulu-YOZGAT

STATISTICS ADVISER (İSTATİSTİK DANIŞMANI)

Araş. Gör. Güven GÜNGÖR, Bingöl Üniversitesi Veteriner Fakültesi-BİNGÖL

TYPESETTER AND DESIGN (DİZGİ VE TASARIM)

Araş. Gör. Serkan KÖKKAYA, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Araş. Gör. Nevzat Emre ASLAN, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

WEB DESIGN (WEB TASARIMI)

Dr. Güvenç GÖKALP, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Araş. Gör. Emre SAYAR, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

BROADCAST BOARD (YAYIN KURULU)

Dr. İsmail Hakkı NUR, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ

Dr. Çağrı Çağlar SİNMEZ, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ

Dr. Gültekin ATALAN, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ

Dr. Osman KÜÇÜK, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi -KAYSERİ

Dr. Vehbi GÜNEŞ, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ

Dr. Zafer GÖNÜLALAN, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ



NATIONAL ADVISORY BOARD (ULUSAL DANIŐMA KURULU)

- Dr. Ali Cesur ONMAZ**, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-KAYSERİ
Dr. Alper SEVİMLİ, Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-AFYONKARAHİSAR
Dr. Emin ŐENGÜL, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-ERZURUM
Dr. Enver YAZAR, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-KONYA
Dr. Didem PEKMEZCİ, Ondokuzmayıs Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-SAMSUN
Dr. Güner KÜÇÜKBAYRAM, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-KAYSERİ
Dr. KürŐat ALTAY, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-SİVAS
Dr. Mehmet ELMALI, Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakóltesi- HATAY
Dr. Muammer ELMAS, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakóltesi- KONYA
Dr. Mustafa Sinan AKTAŐ, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-ERZURUM
Dr. Mustafa ARICAN, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-KONYA
Dr. Mustafa İŐŐİ, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-ELAZIĞ
Dr. Ramazan ERENLER, Tokat GaziosmanpaŐa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakóltesi-TOKAT
Dr. Selim KUL, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-ELAZIĞ
Dr. Serkan YILDIRIM, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-ERZURUM
Dr. Sevgi DURNA DAŐTAN, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakóltesi-SİVAS
Dr. Sinan VICİL, Namık Kemal Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-TEKİRDAĞ
Dr. Siyami KARAHAN, Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-KIRIKKALE
Dr. Suat ERDOĞAN, Trakya Üniversitesi Tıp Fakóltesi-EDİRNE

INTERNATIONAL ADVISORY BOARD (ULUSLARARASI DANIŐMA KURULU)

- Dr. Askarbek TULEBAYEV**, Manas University, Faculty of Veterinary Medicine-KYRGYZSTAN
Dr. Atiqur RAHMAN, Jamia Millia Islamia University, Faculty of Natural Sciences-INDIA
Dr. Csilla TOTHOVA, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Kosice-SLOVAKIA
Dr. Levan MAKARADZE, Georgian State Agrarian University-GEORGIA
Dr. Maged El-ASHKER, Mansoura University, Faculty of Veterinary Medicine-EGYPT
Dr. Oskar NAGY, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Kosice-SLOVAKIA
Dr. Rais AHMAD, Cholistan University of Veterinary and Animal Sciences-PAKISTAN
Dr. René van den HOVEN, Vienna Veterinary University-AUSTRIA
Dr. Ryane E. ENGLAR, College of Veterinary Medicine, University of Arizona-USA
Dr. Salah AKKAL, University of Mentouri Constantine, Phytochemistry and Physico-chemical and Biological Analysis Laboratory- ALGERIA
Dr. Zehra HAJRULAI-MUSLIU, Skopje Faculty of Veterinary Medicine-MACEDONIA



Bozok Veterinary Sciences

2022; 3 (1)

BU SAYININ HAKEM KURULU / THE REVIEWER COMMITTEE OF THIS ISSUE

Prof. Dr. Cumali ÖZKAN-Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi (Yüzüncü Yıl University Faculty of Veterinary Medicine)-VAN

Prof. Dr. Gürkan UÇAR-Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi (Selçuk University Faculty of Veterinary Medicine)--KONYA

Prof. Dr. Mustafa ATASEVER-Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi (Atatürk University Faculty of Veterinary Medicine)--ERZURUM

Prof. Dr. Zafer GÖNÜLALAN-Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi (Erciyes University Faculty of Veterinary Medicine)--KAYSERİ

Doç. Dr. Başak HANEDAN-Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi (Atatürk University Faculty of Veterinary Medicine)--ERZURUM

Doç. Dr. Erdiñç TÜRK-Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi (Mustafa Kemal University Faculty of Veterinary Medicine)--HATAY

Doç. Dr. Kadir BOZUKLUHAN-Kafkas Üniversitesi Kars MYO (Kafkas University Vocational School)--KARS

Doç. Dr. Mehmet Cemal ADIGÜZEL-Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi (Atatürk University Faculty of Veterinary Medicine)-ERZURUM

Doç. Dr. Yıldıray BAŞBUĞAN-Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi (Yüzüncü Yıl University Faculty of Veterinary Medicine)-VAN

Dr. Öğr. Üyesi Güvenç GÖKALP-Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi (Yozgat Bozok University Faculty of Veterinary Medicine)-YOZGAT

<i>Araştırma Makaleleri/ Research Articles</i>	Sayfa / Page
❖ Büyükyörük S, Çalışkan M, Şahiner C. <i>Mavi Yengeçlerden Vibrio parahaemolyticus'un İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Bazı Antibiyotiklere Karşı Direnç Profillerinin Belirlenmesi</i>	1-4
Derlemeler / Review Articles	
❖ Tandogan Ü, Tarhan D, Dokuzeylül B, Ercan A.M, OR M.E. <i>Elektrokemoterapi ve Veteriner Hekimlikte Kullanım Alanları</i>	5-11
❖ Süleymanoglu A.A, Aksu H, Aydın A. <i>Enterobacteriaceae Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz ile Karbapenem ve Kolistin Direnci</i>	12-19
❖ Tüfekçi E, Ekinci G, Keleş İ. <i>Köpeklerde Lösemi</i>	20-27
Düzeltilme Makalesi / Re-Entired Articles	
❖ Kandır S: <i>Nörogenetik Hastalıklarda Alternatif Model Organizma: Köpekler</i>	28-32



Mavi Yengeçlerden *Vibrio parahaemolyticus*'un İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Bazı Antibiyotiklere Karşı Direnç Profillerinin Belirlenmesi*

Sadık BÜYÜKYÖRÜK¹, Meltem ÇALIŞKAN², Cemil ŞAHİNER¹

¹Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Aydın/TÜRKİYE

²Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Aydın/TÜRKİYE

◆ Geliş Tarihi/Received: 08.03.2022

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 15.03.2022

◆ Yayın Tarihi/Published: 30.06.2022

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Büyükyörük S, Çalışkan M, Şahiner C. Mavi Yengeçlerden *Vibrio parahaemolyticus*'un İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Bazı Antibiyotiklere Karşı Direnç Profillerinin Belirlenmesi. Bozok Vet Sci (2022) 3, (1):1-4.

Özet: Bu çalışmanın amacı Aydın İli ve çevresinden temin edilen mavi yengeçlerden *Vibrio parahaemolyticus*'un izolasyonu, identifikasyonu ile bu suşların antibakteriyel direnç profillerinin belirlenmesidir. İzole edilen altmış adet şüpheli izolattan 4'ü, real-time PCR ile *Vibrio parahaemolyticus* olarak tanımlanmıştır. Bu suşların, penicillin G, clindamycin, piperacilin, amoxicillin-clavulanic acid, ciprofloxacin ve gentamicin gibi antibiyotiklere karşı dirençlilikleri disk difüzyon metodu ile belirlenmiştir. Tüm izolatların penicillin G ve clindamycin'e karşı dirençli olduğu, diğer antibiyotiklere karşı ise değişen düzeylerde duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mavi yengeç, *Vibrio parahaemolyticus*, Antibiyotik dirençlilik, Halk sağlığı

Isolation, Identification and Determination of Some Antibiotics Resistance Profiles of *Vibrio parahaemolyticus* from Blue Crabs*

Abstract: The purpose of this study was the isolation, identification and determination of antibacterial resistance profiles of *Vibrio parahaemolyticus* from blue crabs obtained from Aydın province. Out of four isolates from sixty suspected isolates were identified as *Vibrio parahaemolyticus* by real-time PCR. The susceptibility level of these strains to antibiotics, such as penicillin G, clindamycin, piperacilin, amoxicillin-clavulanic acid, ciprofloxacin and gentamicin was identified with disc diffusion method. It was determined all isolates were resistant to penicillin G and clindamycin and sensitive to other antibiotics at varying levels.

Keywords: Blue crabs, *Vibrio parahaemolyticus*, Antibiotic resistance, Public health

1.Giriş

Kabuklu ve yumuşakçalar, balık dışında tüketilmesi tercih edilen başlıca su ürünleridir. Kabuklular sınıfında istakoz, karides, yengeç ve kerevit yer alırken yumuşakçalar içerisinde midye, istiridye, mürekkep balığı ve tarak bulunmaktadır (1). Yengeçler, et kalitesinin ve ekonomik değeri bakımından birçok ülkede yüksek oranda talep görmektedir. Mavi yengeç (*Callinectes sapidus*), dünyada ve Türkiye'de avcılığı ve yetiştiriciliği yapılan en önemli yengeç türlerinden biridir. Ülkemizde özellikle Ege ve Akdeniz bölgelerinde tüketimi ve ticari olarak önemi her geçen gün artmaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu'na göre 2016 yılında avlanan kabuklu ve yumuşakça toplam miktarı 37739,1 ton olup, bu verinin 2,0 tonu mavi yengece aittir ve bu miktardaki mavi yengeç, tamamen insan tüketiminde kullanılmıştır (2). *Vibrio* (*V.*) cinsi; virgül şeklinde, Gram Negatif, hareketli, sporsuz ve kapsülsüz, aerob veya fakültatif anaerob organizmalardır (1). Optimal gelişme sıcaklıkları 22-40°C arasındadır (2). Sporsuz ve kapsülsüz olmasından dolayı farklı çevre koşullarında canlılığını

devam ettiremediğinden dolayı asıl habitatını tatlı ya da tuzlu su ile bu ortamda yaşayan organizmalar oluşturmaktadır (3). Son yıllarda antibiyotik dirençlilik, antimikrobiyallerin aşırı ve/veya kontrolsüz kullanılmasından dolayı kendini belli etmiştir (4). Antibiyotik dirençliliğin insanlarda ve hayvanlarda patojen organizmalarda gelişmesi durumunda önemli bir halk sağlığı problemi yaratabilmektedirler (5). *V. cholerae*, içme suyu ve gıdalarla bulaşabilen ve pirinç suyu görünümünde şiddetli bir diyarenin etkeni olup *Vibrio* cinsindeki önemli etkenlerden birisidir. Bunun dışında *V. parahaemolyticus*, akut gastroenterite ve kanlı diyareye sebep olabilmektedir. Ayrıca bu soyda, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, ve *V. damsela*; yara enfeksiyonları, septisemi, menenjit gibi gastrointestinal sistem dışı semptomlara da sebep olmaktadır (6). Gıda toksikasyonlarına sebep olabilmesi adına riskli gıdalar arasında su ve su ürünleri başlıcalarıdır (7-9). Mavi yengeçler, aynı diğer kabuklularda ya da su ürünlerinde olduğu gibi hızlıca bozulabilen bir yapıya sahip olmasından dolayı yakalandıktan ya da

✉: sbuyukyoruk@adu.edu.tr

* Bu çalışma, 9. Ulusal ve 3. Uluslararası Veteriner Gıda Hijyeni Kongresinde poster bildiri olarak sunulmuştur (04-07 Kasım 2021, Antalya).

yetiştiriciliği yapıldıktan sonra mümkün olan en kısa sürede dondurulmalı ya da kaynatılmalıdır (10). *Vibrio* cinsinde yer alan organizmaların, su ile ilgili tabiatta bulunabilmelerinden dolayı bu su veya su ürünlerinin tüketilmesiyle birlikte gıda enfeksiyonlarına ya da intoksikasyonlarına rastlanılmaktadır (11).

Bu çalışmada, mavi yengeç örneklerinden *V.parahaemolyticus*'un izolasyonu, identifikasyonu ile antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Örneklenme

Vibrio'lar, sıcak yaz aylarında daha sıklıkla kendilerini belli ettiği için, toplam 30 adet mavi yengeç (*Callinectes sapidus*) örneği Aydın İli ve çevresindeki balıkçılardan Mayıs-Eylül aylarında temin edildi.

2.2. *Vibrio parahaemolyticus*'un izolasyonu ve identifikasyonu

Vibrio türlerinin belirlenmesi amacıyla, 25 g örnek, 225 ml Alkali salin peptonlu su (Oxoid, CM1117)'da 24 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra bu inkübasyon sıvısından 1ml örnek Thiosulfate Citrate Bile Sucrose TCBS (Oxoid, CM0333B)'a geçiş yapıldı ve 24 saat 37°C'de inkübe edildi. Bu besi yerinde üreyen şüpheli kolonilere (2-3 mm çapında ve sükröz negatif olduğu için yeşil ile mavi-yeşil renkteki, her bir örnekten 2 adet koloni seçildi), %3 NaCl içeren Nutrient Broth (Oxoid, CM0501) ve Nutrient Agar (Oxoid, CM0309) 37°C'de bir gece inkübe edilerek ileri saflaştırma işlemleri uygulandı ve bu izolatlar (n=60), Real Time PCR ile onaylanıncaya kadar -80°C'de muhafaza edildi (12). PCR ile onaylama işlemi için DNA izolasyonu Roche firmasının talimatları doğrultusunda yapıldı. Bu amaçla High Pure PCR Template Preparation kiti ile çalışıldı.

DNA'ların elde edilmesiyle, uygulanacak olan PCR koşulları ise, Eschbach ve ark. (11)'e göre yapıldı. Bu amaçla; Tüm PCR analizleri, TaqMan prob prensibine göre, Roche Light Cycler 480 ile ABI Prism 7700 Sequence Detector ve LightCycler 480 software (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Germany) kullanılarak yapıldı.

Tek bir PCR siklus;

95°C'de 10 dk başlangıç denatürasyonu,

95°C'de 20 sn ve 45 siklus denatürasyon,

60°C'de 30 sn bağlanma (annealing),

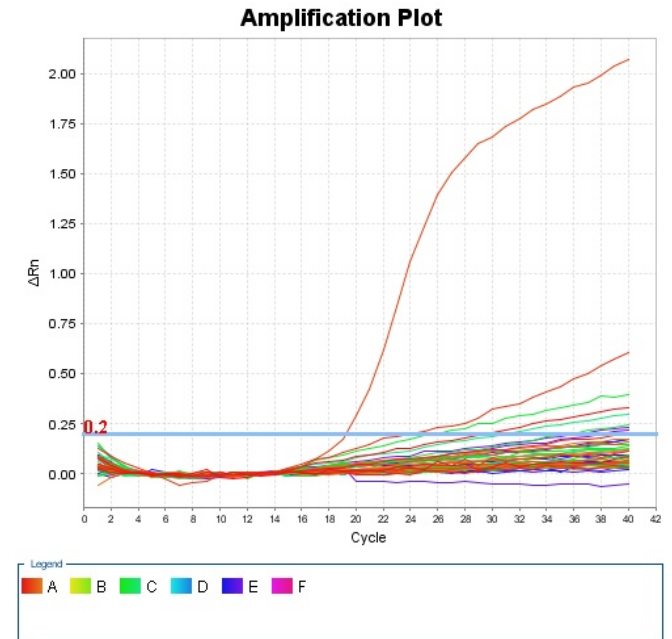
72°C'de 20 sn uzatma (extension) uygulandı ve *V. parahaemolyticus* sentetik plazmid kontrol, pozitif kontrol olarak kullanıldı (11).

2.3. Antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi

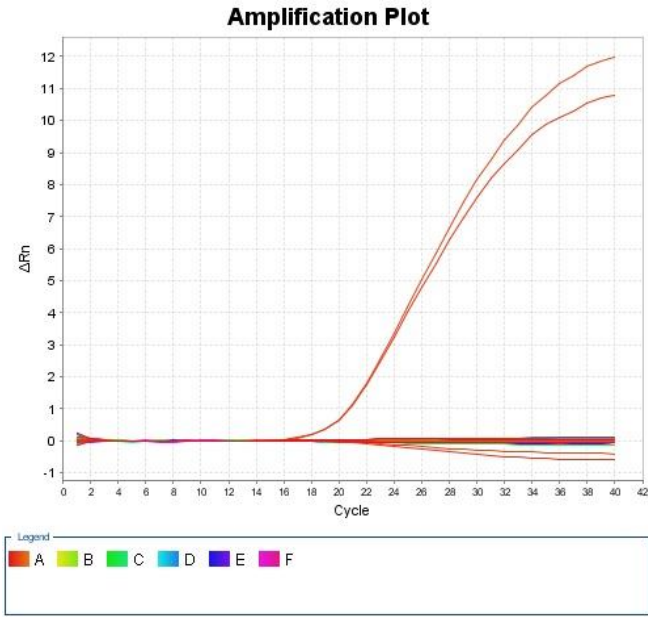
Real Time PCR ile *V. parahaemolyticus* olarak onaylanmış suşlar için penicillin G (10 unit), clindamycin (2 µg), piperacilin (100 µg), amoxicillin-clavulanic acid (30 µg), ciprofloxacin (5 µg) ve gentamicin (10 µg) antibiyotiklerine karşı dirençlilikleri disk-difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi (13). Bakteriyel dirençlilik, clindamycin, piperacilin, amoxicillin-clavulanic acid, ciprofloxacin ve gentamicin için Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI, 2010) klavuzu, penicillin G için ise CLSI (2016) kılavuzuna göre değerlendirildi.

3. Bulgular

Konvansiyonel yöntemlerle elde edilen ve real-time pcr ile analize alınıncaya kadar -80°C'de muhafaza edilen 60 adet izolatın, 4 adedi (%6,66) polimeraz zincir reaksiyonu ile *V. parahaemolyticus* olarak pozitif sonuç vermiştir. Real-Time PCR görüntülerine ait şekiller "Şekil 1 ve 2'de gösterilmektedir. Her bir örnek, pozitif kontrol ve negatif kontrol dublike çalışılmıştır. Real Time PCR ile *V. parahaemolyticus* olarak onaylanmış izolatların antibiyotik dirençlilikleri Tablo 1'de özetlenmiştir. Buna göre penisilin G ve klindamisine tüm izolatlar direnç gösterirken diğer antibiyotiklere değişen düzeylerde direnç göstermişlerdir.



Şekil 1: Real Time PCR sonuçlarına göre örneklere, pozitif kontrole ve negatif kontrole ait amplifikasyon görüntüsü



Şekil 2: Pozitif kontrollere ve negatif kontrollere ait amplifikasyon görüntüsü

Tablo 1: Real Time PCR ile *Vibrio parahaemolyticus* olarak onaylanmış izolatların antibiyotik dirençlilikleri.

Antibiyotik	İz*4	İz10	İz33	İz37
Penicillin G	R	R	R	R
Clindamycin	R	R	R	R
Piperacilin	S	S	S	R
Amoxicillin- Clavulanic acid	I	R	I	R
Ciprofloxacin	S	S	S	R
Gentamicin	S	S	S	R

*: İzolat, R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta Derecede Duyarlı

4. Tartışma ve Sonuç

Çalışmamızda şüpheli *V. parahaemolyticus* olarak izole edilen 60 adet suşun, real time pcr ile yapılan analizlerinden, 4 tanesi (%6,66) pozitif reaksiyon vermiştir. Doğruer ve Telli (2020), 100 adet balık ve 100 adet karides örneğinden *V. parahaemolyticus* varlığını, direkt kültür yöntemi (DPC), kantitatif ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (qLAMP) ve canlı-ölü hücre ayırımı için propidium monoazide (PMA)-qLAMP yoluyla araştırmışlar ve bu organizmayı sırası ile 8 (%4), 12 (%6) ve 12 (%6) oranlarında tespit etmişlerdir (14). Xu ve ark. (2017), incelemiş oldukları 50 adet karides örneğinden 2 adet (%10) *V. parahaemolyticus* ve 1 adet (%5) *V. vulnificus*'u multiplex PCR ile tespit etmişlerdir (4).

Chang ve ark. (2017), *V. parahaemolyticus*'u incelemiş oldukları 117 adet istiridyeden 44 tanesinde (%37,6), Haziran, Temmuz, Ağustos, Eylül ve Ekim aylarında sırası

ile 3 (%6.8), 11 (%25.0), 16 (%36.4), 8 (%18.2) ve 6 (%13.6) oranında izole etmişlerdir. Yine aynı çalışmada izole edilen bu 44 adet suşun antibiyotik dirençliliği incelenmiş; 6 izolatin gentamisine ve 40 izolatin vankomisine dahi direnç gösterdiği bildirilmiştir (7). Yaashikaa ve ark. (2016), *V. parahaemolyticus*'un antibiyotik dirençliliğini disk difüzyon ile kontrol etmiş ve çalışmamızdakine benzer şekilde bu mikroorganizmanın penisilin G ve clindamisine dirençli olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda, 11 adet izolattan birisinde piperasiline karşı dirençlilik tespit edilirken aynı çalışmada bu antibiyotiğe karşı dirençlilik belirtilmiştir (10).

Tan ve ark. (2017), 130 uskumru örneğinden 116 (%89,2)'sında toplam *V. parahaemolyticus*'u izole ederken, bu örneklerden 21'inin (%16,2) patojenik karakterde olduğunu bildirmiştir. Aynı zamanda disk difüzyon ile bu izolatların antibiyotik dirençlilik durumları incelenmiş, ampisilin sulbaktam, meropenem, seftazidim ve imipeneme yüksek oranda duyarlı, penisilin G ile ampisiline ise dirençli olduklarını tespit etmişlerdir. İki (%2,99) izolatin ise çoklu antibiyotik (7 adet antibiyotiğe) dirençliliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir (13). Çalışmamızda da bir (%1,1) izolat, incelemiş olduğumuz tüm antibiyotiklere direnç göstermiştir. Maestu ve ark. (2016) incelemiş oldukları 101 adet midye örneğinde *V. cholerae* ya da *V. vulnificus*'u tespit edemezken, %68 oranında *V. parahaemolyticus*'u izole etmişlerdir. Tespit edilen bu *V. parahaemolyticus* suşlarından 19 adedi non-patojenik karakterde (tdh/trh negatif) iken, 50 (%72) tanesinin ise en az bir virulens geni taşıdığı bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada *V. parahaemolyticus* suşlarından %52'sinde eritromisin dirençlilik geni tespit edilirken, hiçbir suşta tetrasiklin geni tespit edilmemiştir (3).

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliğinde ve Uluslararası Mikrobiyolojik Standartlar Komisyonu tarafından yengeçlerde *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*'nin bulunmaması gerektiği önerilmiştir. Kaya ve Yalçın (2018), incelemiş oldukları 180 adet mavi yengecin bu standarda uygun olmadığını bildirmişlerdir (2). Rodgers ark., (2014) Maryland Körfezindeki mavi yengeçlerde yaptıkları çalışmada ise *V. parahaemolyticus* ve *V. vulnificus* tespit etmişlerdir (15). Yalcinkaya ve ark. (16), mavi yengeçler üzerine yaptıkları çalışmada, *V. alginolyticus* (30.1%), *V. fluvialis* (10.8%), *V. damsela* (9.6%), *V. harveyi* (3.6%), *V. metschnikovii* (3.6%) ve *V. vulnificus*'u (2.4%) oranında izole etmişler ve türlere göre değişmekle birlikte doxycycline, tetracycline ve ciprofloxacin antibiyotiklerine hayli duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Parlapani ve ark. (2019), mavi yengeçlerin raf ömrü üzerine yaptıkları çalışmada, +4°C'de ve 10°C'de bu süreyi sırasıyla 10 gün ve 6 gün olarak tespit etmişler ve bozulmada

dominant etkili florayı ise Rhodobacteraceae ailesi (%52) ve *Vibrio* spp. (%40.2) olarak bildirmişlerdir (17).

Gerek doğal yaşamdaki gerekse kültürü yapılan mavi yengeçler, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* ve *V. vulnificus* ile enfekte olabilmekte (18) ve hemolenf yumrularında bu etkenlerin yüksek sayılarda bulunmasıyla birlikte solunum kapasitesinin, metabolik aktivitenin ve diğer fizyolojik etkinliklerin düşmesi ile birlikte yengecin zayıf düşmesine ve ölümüne sebep olmaktadır (19).

Sonuç olarak, *Vibrio*'ların su ürünlerinde potansiyel bir biyotehlike olabildikleri için bu ürünlerin yetiştiriciliği ile ticaretinin yapıldığı yerlerde patojen *Vibrio* türlerinin izlenmesi, bu *Vibrio* türlerin bulunabileceği özellikle tüketime hazır gıdaların üretim akış hattında HACCP ve iyi üretim sistemlerinin uygulanmasına yönelik çalışmaların yapılması sağlanmalıdır. Halk sağlığının sağlanması adına su ürünlerinde önemli derecede bir risk arz eden bu patojen *Vibrio* türlerinin coğrafi dağılımlarının yoğun olduğu yerlerde takip sistemi ile rutin kontrollerin geliştirilmesi önerilmektedir.

Kaynaklar

- Baron S, Lesne J, Jouy E, Larvor E, Kempf I, et al. Antimicrobial susceptibility of autochthonous aquatic *Vibrio cholerae* in Haiti. *Frontiers Microbiology* 2016; 7: 1671-1683. doi: 10.3389/fmicb.2016.01671.
- Kaya KY ve Yalçın H. Mersin Körfezinde Avlanan Mavi Yengecin (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) Mikrobiyolojik Kalitesinin Araştırılması. *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi* 2018; 6: 881-886. doi: 10.24925/turjaf.v6i7.881-886.1858
- Maestu AG, Leon AL, Souto RRR, Maneiro RV, Chapela MJ, et al. Presence of pathogenic *Vibrio* species in fresh mussels harvested in the southern Rias of Galicia (NW Spain). *Food Control* 2016; 59:759-765. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.06.054.
- Xu YG, Sun LM, Wang YS, Chen PP, Liu ZM, et al. Simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in seafood using dual priming oligonucleotide (DPO) system-based multiplex PCR assay. *Food Control* 2017; 71: 64-70. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.06.024.
- Cecchini F, Fajš L, Cosnier S, Marks RS. *Vibrio cholerae* detection: Traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors. *Trends in Analytical Chemistry* 2016; 79: 199–209. doi: 10.1016/j.trac.2016.01.017.
- Singh A and Barnard TG. Surviving the acid barrier: responses of pathogenic *Vibrio cholerae* to simulated gastric fluid. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2016; 100: 815–824. doi: 10.1007/s00253-015-7067-2.
- Chang HK, Shin YJ, Jang SC, Yu HS, Kim SK, et al. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea: Resistance to various antibiotics and prevalence of virulence genes. *Marine Pollution Bulletin* 2017; 118: 261–266. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.02.070.
- Lü CH, Yuan Y, Sun N, Bi Z, Guan B, et al. Characterization of *Vibrio cholerae* isolates from 1976 to 2013 in Shandong Province. *Brazilian Journal of Microbiology* 2017; 48: 173–179. doi: 10.1016/j.bjm.2016.09.013.
- Li B, Chen R, Wang D, Tan H, Ke B, et al. Distribution and molecular characteristics of *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates recovered in Guangdong Province, China, 1961–2013. *Infection, Genetics and Evolution* 2016; 37: 70–76. doi: 10.1016/j.meegid.2015.11.004.
- Yaashikaa PR, Saravanan A, Kumar PS. Isolation and identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* from prawn (*Penaeus monodon*) seafood: Preservation strategies. *Microbial Pathogenesis* 2016; 99: 5-13. doi: 10.1016/j.micpath.2016.07.014.
- Eschbach E, Martin A, Huhn J, Seidel J, Heuer R, et al. Detection of enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*: performance of real-time PCR kits in an interlaboratory study European Food Research Technology 2017; 243: 1335–1342. doi:10.1007/s00217-017-2844-z.
- Tan CW, Rukayadi Y, Hasan H, Thung TY, Lee E, et al. Prevalence and antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different types of seafood in Selangor, Malaysia. *Saudi Journal of Biological Sciences* 2020; 27: 1602-1608. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.01.002.
- Tan CW, Malcolm TTH, Kuan CH, Thung TY, Chang WS, et al. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Short Mackerels (*Rastrelliger brachysoma*) in Malaysia. *Frontiers Microbiology* 2017; 8: 1087-1096. doi: 10.3389/fmicb.2017.01087.
- Doğruer Y ve Telli AE. Determination of *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods using direct plate counting, quantitative loop-mediated isothermal amplification and propidium monoazide-qLAMP. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2020; 67: 349-355. doi: 10.33988/auvfd.603868.
- Rodgers C, Parveen S, Chigbu P, Jacobs J, Rhodes M, et al. Maryland Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus* in blue crabs (*Callinectes sapidus*), seawater and sediments of the coastal bays. *Journal of Applied Microbiology* 2014; 117: 1198–1209. doi: 10.1111/jam.12608.
- Yalcinkaya F, Ergin C, Agalar C, Kaya S, Aksoylar Y. The presence and antimicrobial susceptibilities of human-pathogen *Vibrio* spp. isolated from blue crab (*Callinectes sapidus*) in Belek tourism coast, Turkey. *International Journal of Environmental Health Research* 2003; 13: 95–98. doi: 10.1080/0960312021000063304.
- Parlapani FF, Michailidou S, Anagnostopoulos DA, Koromilas S, Kios K et al. Bacterial communities and potential spoilage markers of whole blue crab (*Callinectes sapidus*) stored under commercial simulated conditions. *Food Microbiology* 2019; 82: 325–333. doi: 10.1016/j.fm.2019.03.011.
- Sullivan TJ, Neigel JE. Effects of temperature and salinity on prevalence and intensity of infection of blue crabs, *Callinectes sapidus*, by *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus* in Louisiana. *Journal of Invertebrate Pathology* 2018; 151: 82–90. doi: 10.1016/j.jip.2017.11.004.
- Thibodeaux LK, Burnett KG, Burnett LE. Energy metabolism and metabolic depression during exercise in *Callinectes sapidus*, the Atlantic blue crab: effects of the bacterial pathogen *Vibrio campbellii*. *The Journal of Experimental Biology* 2009; 212: 3428-3439. doi: 10.1242/jeb.033431.



Elektrokemoterapi ve Veteriner Hekimlikte Kullanım Alanları

Ülfet TANDOĞAN¹, Duygu TARHAN², Banu DOKUZEYLÜL¹, A. Meltem ERCAN², M. Erman OR¹

¹ İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Avcılar, İstanbul/TÜRKİYE

² İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Cerrahpaşa, İstanbul/TÜRKİYE

◆ Geliş Tarihi/Received: 03.02.2022

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 24.02.2022

◆ Yayın Tarihi/Published: 30.06.2022

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Tandogan Ü, Tarhan D, Dokuzeylül B, Ercan AM, Or ME. Elektrokemoterapi ve Veteriner Hekimlikte Kullanım Alanları. Bozok Vet Sci (2022) 3, (1):5-11.

Özet: Elektrokemoterapi, doksanlı yılların başından itibaren beşeri hekimlikte kullanılmaya başlanan, son yıllarda da veteriner hekimlikte kullanılan önemli ve yeni bir lokal antitümöral tedavi yöntemidir. Elektroporasyon ile kemoterapinin birleşimi, hem kemoterapinin yüksek düzeydeki yan etkilerini minimuma indirmiş hem de elektroporasyon sayesinde, kullanılan kemoterapötik ilaçların sitotoksik etkinliğini maksimum seviyede tutmayı başarmıştır. Elektrokemoterapi uygulamaları 2006 yılından itibaren hem beşeri hekimlikte hem de veteriner hekimlikte Avrupa standartlarında belirlenmiş prosedürlere göre uygulanmaktadır. Veteriner hekimlikte elektrokemoterapi kedi, köpek, at ve son yıllarda egzotik hayvanlarda özellikle kutanöz tümörlerin tedavisinde kullanım alanı bulmuştur. Bu derlemenin amacı, elektrokemoterapinin çalışma mekanizmasını ve veteriner hekimlikte yer bulan uygulamalarını sunarak bu yeni teknik hakkında genel bir bilgi oluşmasına yardımcı olmaktır.

Anahtar Kelimeler: Elektrokemoterapi, Elektroporasyon, Veteriner hekimlik

Electrochemotherapy and Its Usefulness in Veterinary Medicine

Abstract: Electrochemotherapy is an important and new local antitumoral treatment method that has been used in human medicine since the beginning of the nineties and has been used in veterinary medicine in recent years. The combination of electroporation and chemotherapy both minimized the high-level side effects of chemotherapy and managed to keep the cytotoxic efficiency of the chemotherapeutic drugs used at the maximum level. Electrochemotherapy applications have been applied in both human medicine and veterinary medicine according to the procedures of European standards since 2006. In veterinary medicine, electrochemotherapy has been used in the treatment of cutaneous tumors in cats, dogs, horses and in recent years, exotic animals. The aim of this review is to give information about this new technique by presenting the working mechanism of electrochemotherapy and its applications in veterinary medicine.

Keywords: Electrochemotherapy, Electroporation, Veterinary medicine

1. Giriş

Elektrokemoterapi (EKT), elektroporasyon ile hücre zarının geçirgenliğini geri dönüşümlü bir şekilde artırarak, kemoterapötik ilaçların sitoplazmaya girişini kolaylaştıran, lokal olarak spesifik elektrik darbelerinin uygulandığı bir tedavi yöntemidir (18). Bu yöntem yalnız başına kullanılabileceği gibi onkolojik cerrahi ile birlikte de uygulanabilir. Onkolojik cerrahide hem intraoperatif hem de cerrahi müdahalenin öncesinde tümör hacmini küçültmek amacıyla "neoadjuvan" veya sonrasında lokal nüks olasılığını azaltmak için "adjuvan" tedavi olarak da kullanılabilir (25).

Uygulama kolaylığı, etkinliğinin yüksek olması, düşük morbidite oranı, minimum toksisite ve diğer tedavi yöntemlerine göre daha az maliyetli olması elektrokemoterapinin seçilme nedenleri arasında sayılabilir (3).

Bu derlemede elektrokemoterapinin çalışma mekanizması, uygulama şekli ve veteriner hekimlik alanında yapılan araştırmalara yer verilmiştir.

2. Elektrokemoterapi'nin çalışma mekanizması

EKT'nin antitümöral etkisinin belirlenmesinde biyolojik olarak önemli olan üç etki mekanizması bulunmaktadır. Bunlar; elektroporasyon, vasküler etkiler ve immün yanıtın katılımıdır (6).

2.1. Elektroporasyon

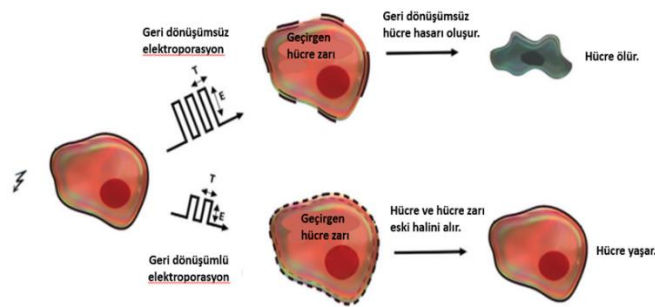
Yüksek voltajlı elektrik darbelerinin hücrelerin membran geçirgenliğini artırması prensibine elektroporasyon denir (6). Uygulanan elektrik darbelerinin genliğine, darbe sayısına ve süresine bağlı olarak elektroporasyon geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olabilir (Şekil 1) (6). Hamilton ve Sale (9) 1967 yılında yaptıkları çalışmada, bir hücre popülasyonunun ölüm sebebi olarak elektrik darbe uzunluğunu ve darbe sayısını göstererek geri dönüşümsüz

elektroporasyonun temellerini atmışlardır. 1972 yılında Neumann ve Rosenheck (16) elektrik darbelerinin geçici geçirgenlik değişikliklerine neden olduğunu ve membran özelliklerinin geri geldiğini bulmuşlardır. Bu keşif geri dönüşümlü elektroporasyonun kanıtı olarak kayıtlara geçmiştir.

2.1.1. Elektroporasyon'un temel ilkeleri

Fizyolojik şartlarda hücre zarının elektrik potansiyeli sabittir. Lipid yapıda olan hücre zarı üzerindeki iyon pompaları ve kanal sistemi tarafından dengede ve dinlenme potansiyelinde kalması sağlanır (18). Yüksek voltajlı elektrik darbeleri uygulandığında, sitoplazma ve dış ortamın elektriksel özellikleri arasındaki farktan dolayı, hücre zarı boyunca dinlenme potansiyeli değişir. Biriken transmembran potansiyeli kritik bir değeri aşarsa, membran kararsız hale gelir ve nano ölçekli gözenekler oluşur (6). Bu durum hücre zarı üzerinde lokalize bir olay olarak gerçekleşir (3). Gözenek oluşumu membran geçirgenliğini artırır ve normal şartlarda hücre içine girişi olmayan moleküllerin girişine izin verir (12). Bu sayede, geri dönüşümlü elektroporasyon, hücre canlılığına zarar vermeden hidrofilik ilaç moleküllerinin veya hücre zarını geçemeyecek kadar büyük olan genetik materyalin hücreye girişi için kullanılır (17).

Geri dönüşümsüz elektroporasyonda hücre zarını bozmak ve hücre ölümüne neden olmak için kısa ancak yoğun elektrik darbeleri kullanılır. Bu yöntem hücrelerin toparlanamaması için elektrik darbelerinin belirli bir eşiği (çok yüksek bir elektrik alanı, çok uzun darbeler veya çok fazla darbe) aşmasını gerektirir. Geri dönüşümlü elektroporasyon kısa fakat yoğun elektrik darbelerinin daha az kullanılmasıyla gerçekleşir. Bu yöntem ise hücre zarının geçirgenleşmesi için yeterli olan ancak zarın iyileşebilmesini ve hücrenin hayatta kalmasını sağlamak için belirli bir eşiğin altında olan elektrik darbeleri gerektirir (Şekil 1) (6).



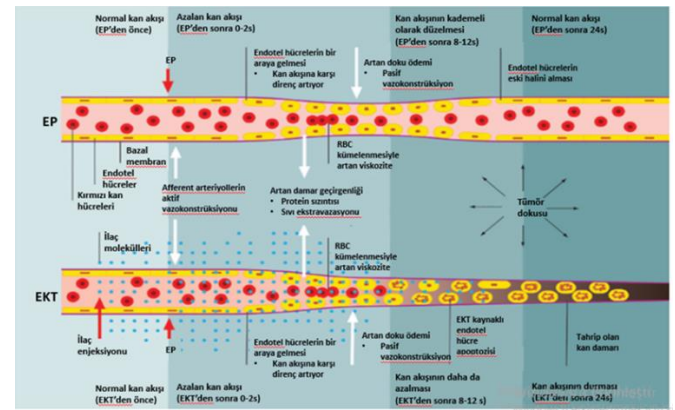
Şekil 1: Geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz elektroporasyonun şematik görünümü (6).

2.2. Vasküler etkiler

EKT uygulaması sırasında elektrik darbelerinin damar ağı üzerine etkisi sonucunda kan akışı ve damar geçirgenliğinde bozulmalar meydana gelir (18). Bu bozulmalar özellikle

vaskülerizasyonu iyi tümörlerde daha çok gözlemlenmiştir (6). Uygulanan elektrik akımıyla sempatik sinir sistemi ve prekapiller sfinkterler uyarılır. Bu uyarımı takiben ani bir lokal vazokonstriksiyon etkisi meydana gelir. Bu yanıt "vasküler kilit etkisi" de denmektedir. Bu etki sayesinde tümör hücreleri antitümör ilaç moleküllerine daha uzun süre maruz kalmaktadırlar (2,10).

EKT'nin damarlar üzerindeki etkilerinden bir tanesi de antivasküler etkidir. Elektrik darbelerinin uygulanması endotel hasarına yol açarak tümörün kan akışında önemli bir azalmaya neden olur. Bu durum geçici olup, bu süre içerisinde tümörün beslenmesi engellenir ve tümürlü hücrelerin ölümüne katkı sağlar (3,6,10,18) (Şekil 2). EKT'nin bu etkisinden hemorajiye yatkın tümörlerin kanamalarını hafifletmek amacıyla da yararlanılmıştır (2).



Şekil 2: Elektroporasyon (EP) ve Elektrokemoterapi (EKT) tarafından indüklenen tümörlerde vasküler kilit etkisinin şematik gösterimi (6).

2.3. İmmün yanıt oluşumu

EKT'nin diğer bir etki mekanizması da bağışıklık sisteminin uyarılmasıyla açıklanır. Apoptoza uğrayan tümör hücrelerinden antijen dökülmesi nedeniyle sistemik bağışıklık devreye girer. İnterlökin 2 ve 12, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör ve sitotoksik T lenfosit (CD8) aktivasyonu görülür (2,3). Elektrokemoterapi sonrası bağışıklık sisteminin indüklenmesi tümör hücrelerinin yok edilmesinde önemlidir (2).

3. Elektrokemoterapi'nin sağlıklı dokular üzerine etkisi

Elektroporasyon eşiği hücrenin boyutu, şekli, iskelet yapısı ve zar bileşimi gibi fizyolojik ve biyolojik özelliklerin yanı sıra elektrik akımının genliği, süresi, darbe sayısı vb. elektriksel parametrelere bağlıdır (14). Yapılan çalışmalarda sağlıklı karaciğer dokusunun kanserli karaciğer dokusundan daha yüksek empedansa sahip olduğu, bu sayede daha düşük iletkenlik özelliği gösterdiği belirtilmiştir. Elektroporasyonun sağlıklı dokular üzerinde etkisinin olmaması dokuların birbirinden farklı elektriksel empedansa sahip olduğunu gösterir (34). Aynı zamanda elektrokemoterapi uygulamasında kullanılan antikanser ilaçların etkisinin hızlı

bölünen hücrelerde daha çok olduğu bilinmektedir. Bu da elektrokemoterapi uygulamasının sağlıklı hücreler üzerinde etkinliğinin olmadığını bir diğer göstergesi olmuştur (5).

4. Elektrokemoterapi'nin uygulama şekli

Veteriner EKT'yi insan EKT'sinden ayıran bazı önemli noktalar vardır. İnsanlarda EKT genellikle lokal anestezi altında uygulanır. Hayvanlarda ise tam anlamıyla bir zapt-ı rapt sağlanamadığından EKT uygulamalarında ağır sedasyon veya genel anesteziye gereksinim vardır. Standartlaştırılmış protokollere göre butarfenol, medetomidin, asepromazin, metadon ve ketamin gibi farklı ilaçların kombinasyonları eşliğinde hasta sedasyona alınır. Anestezi derinliğini sağlamak için ise propofol veya barbitüratlar kullanılır. Daha sonrasında genellikle izofluran veya sevofluran gibi gazlarla anestezi idame ettirilir (25).

Hasta uygun şekilde anesteziye alındıktan sonra EKT uygulaması uluslararası standartlara uygun olarak belirlenmiş prosedürlere göre yapılır. Elektrokemoterapi için ilk olarak 2006 yılında Mir ve arkadaşları(15) tarafından Elektrokemoterapi için Avrupa Standart Çalışma Prosedürleri (ESOPE) yazılmıştır. Daha sonrasında geniş bir çalışma yelpazesi bulan bu yöntem için deneyimler artmış ve bu çalışma prosedürlerine 2018 yılında güncelleme getirilmiştir (8). Elektrokemoterapi sırasında kullanılan elektrik darbeleri genellikle elektrotlar arasındaki mesafeye ve şekillerine bağlı olarak, 100-1000 Volt genliği olan 100 µs süreli 8 darbeli bir diziden oluşur. 1-5000 Hz'lik bir darbe tekrarlama frekansı kullanılır. Yüksek frekans, 8 darbenin sadece 1,5 ms' de iletilmesini sağlar (15).

4.1. Elektrokemoterapi'de kullanılan ilaçlar

4.1.1. Bleomisin

Elektrokemoterapi'de en sık kullanılan antitümör ila, sitotoksitesi yüksek olan bleomisindir. Normal şartlar altında hücreye girdikten sonra gerekli kofaktörler varlığında (Fe ve O₂ gibi) DNA sarmalının parçalanmasına yol açarak etkisini gösterir (4). Bunun yanında bleomisin lipofobik bir ilaçtır ve hücre zarından geçerken protein reseptörlerini kullanır. Bu reseptörlerin tümör hücreleri tarafından yok edilmesi, bleomisine karşı bir kemoterapi direnci oluşmasına neden olmuştur. Elektrokemoterapiyle birlikte kullanılan ilaç moleküllerinin porlar aracılığıyla hücre içine girişi ve aynı doğrultuda DNA parçalanmaları hızla artar ve kanserli hücreler apoptoze uğrar (25).

4.1.2. Sisplatin

Sisplatin de bleomisin gibi hücre zarından geçmekte zorluk çeken ancak hücre içine girdikten sonra oldukça sitotoksik olan bir ilaçtır. DNA pürin bazlarına çapraz bağlanarak DNA içindeki onarım mekanizmalarını engeller ve hücre ölümüne neden olur. Elektroporasyon, bu ilacın transmembran geçişini 4-8 kat artırır, böylece çapraz

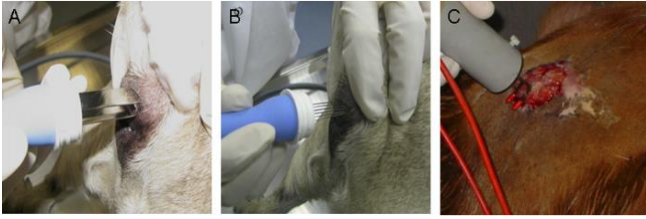
bağlantı sayısı ve apoptozis artmış olur (2,25). Gehl, Skovsgaard ve Mir (7) yaptıkları çalışmada hücrelerin elektroporasyonu ile birlikte bleomisin sitotoksitesinin 1000 kata kadar ve sisplatin sitotoksitesinin de 70 kata kadar arttığını gözlemlemişlerdir.

Tedavi stratejisini belirlemek için tümör boyutları ve sayısı önemlidir. Tümör sayısı ve boyutuna bağlı olarak intratümöral ilaç uygulaması yerine intravenöz uygulama yapılır. Sisplatin sadece intratümöral olarak kullanılabilirken, bleomisin intravenöz olarak da kullanılabilir (8,32). Köpeklerde EKT için sisplatin ya da bleomisin kullanılabilirken, kedilerde sisplatin kontraendike olduğu için sadece bleomisin kullanılır (32).

4.2. Elektrot seçimi

Elektrokemoterapi uygulanırken dikkat edilmesi gereken bir diğer husus elektrot seçimidir. Elektrotların dizilimindeki farklılıklar dokudaki elektrik alan dağılımını etkilediğinden uygun elektrot tipini seçmek oldukça önemlidir. Hayvanlarda üç tip elektrot kullanılır. Bunlar kontakt (L şekilli), plaka ve iğne uçlu elektrotlardır (25,32). Kedi ve köpeklerin elektrokemoterapisi için plaka ve iğne elektrotları kullanılırken, atların tedavisinde kontakt elektrotlar kullanılır (3,25) (Şekil 3). Plaka elektrotlar paralel paslanmaz çelik plakalardan oluşur ve elektrotlar arasındaki mesafeyi kaplayacak büyüklükteki yüzeysel tümörler için uygundur (25,32). İğne elektrotlar derinliği daha fazla olan tümörler için uygun olsa da invaziv olduğu için derisi kalın ve sert olan hayvanlarda kullanımı zordur (25). İğne elektrotlar paralel veya altıgen şekilde dizilmiş olarak bulunur. Tümör boyutu 3 cm'den küçükse plaka veya paralel iğne elektrotlar kullanılabilir. Daha büyük boyutlu tümörlerin tedavisinde ise altıgen iğne elektrotları kullanılır (8,32).

Elektrik darbelerinin uygulanmasını takiben kemoterapötik ilaç uygulaması yapılır. İlaç intratümöral olarak uygulandığında, sızıntıyı önlemek için yavaş uygulanmalıdır. İntravenöz uygulama için ise bolus halinde uygulanabilir. Eğer kemoterapötik ilaç intravenöz olarak veriliyorsa, ilaç dağılımının sağlanması için beklenmeli ve uygulamadan 8 dakika sonra elektrik darbelerine başlanmalıdır. İntratümöral olarak uygulanıyorsa da, elektrik darbeleri enjeksiyondan sonraki 1 dakika içerisinde uygulanmaya başlanmalıdır. Tümör boyutu paralel veya kontakt elektrotlar arasındaki mesafeden daha büyükse, uygulama tümörün kenarlarından başlamalı ve tümörün merkezine doğru ilerlemelidir. İğne elektrotlar kullanılıyorsa, elektrik alanının uygun dağılımını sağlamak için tüm iğnelerin dokuya girmiş olmasına dikkat edilmelidir. ESOPE'ye göre uygulama 40 dakikaya kadar sürebilir (32).



Şekil 3: Farklı elektrot tipleri ile elektrik darbelerinin uygulanması: (A) Plaka, (B) İğne, (C) Kontakt elektrotlar (3).

5. Elektrokemoterapi'nin Veteriner Hekimlikte kullanım alanları

5.1. Yumuşak doku sarkomları

Yumuşak doku sarkomları, genellikle çevre dokulara infiltrat olma özelliğine sahiptir. Cerrahi prosedürler sonrası bölgede infiltrat kenar dokular kalabilir ve böylece tümörün nüksmesine neden olur. Özellikle sınırları belli olmayan vakalar için adjuvan tedavi desteği gereklidir (22).

Spugnini ve ark. (2019) (26) kedi ve köpeklerde yumuşak doku sarkomlarının tedavisi için elektrokemoterapiyi içeren birkaç çalışma yapmış ve bunun cerrahi müdahaleden sonra tedaviye katkı sağladığını göstermişlerdir.

2006 yılında, enjeksiyon yeri sarkoması bulunan 72 kedi üzerinde çalışma yapan Spugnini ve ark. (21) elektrokemoterapinin postoperatif etkinliğini değerlendirmişlerdir. Bu çalışma, operasyon sonrası elektrokemoterapi uygulanan kedilerin, sadece cerrahi operasyonla tedavi edilen kedilerden daha iyi sağaltım sonucu aldığını göstermiştir. Bunun yanında yan etkilerin minimal düzeyde, metastaz oranının ise çok düşük ve ihmal edilebilir düzeyde olduğunu da kanıtlanmışlardır.

Bir diğer çalışmayı 2008 yılında yapan Spugnini ve ark. (22), 11 yaşındaki bir köpekte tekrarlayan yumuşak doku sarkomunun tedavisinde cerrahi operasyon ile elektrokemoterapiyi birlikte kullanmışlardır. Uygulanan tedavinin olumlu yanıt verdiği ve operasyondan sonra düzenli aralıklarla 2 yıl boyunca akciğer radyografisi çekilerek yapılan kontrollerde herhangi bir metastaz bulgusuna rastlanmadığı bildirilmiştir.

2020 yılında yayınlanan Spugnini ve ark.'nın (27) yaptığı başka bir çalışmada ise enjeksiyon bölgesi sarkomu olan ve cerrahi operasyon uygulanan 27 kediye antitümöral ajan olarak kombine intravenöz bleomisin ve lokal sisplatin kombinasyonu kullanılarak EKT uygulandığı bildirilmiştir. Kedilere operasyondan 2 hafta sonra başlayarak 2 hafta arayla iki seans EKT uygulanmış olduğu, sistemik yan etkilerin görülmediği, lokal inflamasyonların da bir anti inflamatuvar ilaç kullanılarak iyileştiği bildirilmiştir. Farklı zamanlarda yapılan kontrollerde 27 kediden 20'sinde nüks görülmemiş olup üçünde nüks, ikisinde lokal nüks ve metastaz, ikisinde de uzak metastaz gözlemlenmiştir.

Spugnini ve ark. çalışmalarını daha önceki çalışmalarla karşılaştırdıklarında, bu çalışmanın sonuçlarında tümörsüz sağkalım ve hastalısız geçen sürenin daha uzun olduğunu bildirmişlerdir.

5.2. Sarkoidler

Sarkoidler, atlarda en sık karşılaşılan deri tümörleridir. Bu tümörler metastazik değildir fakat atların hem yaşam kalitesini hem de maddi değerini olumsuz etkiler. Sarkoidler bu zamana kadar genellikle klasik cerrahi eksizyon, lazer terapisi, kriyoterapi gibi uygulamalar kullanılarak tedavi edilmeye çalışılmıştır. Fakat bu uygulamalar tam sağaltım sağlamadığı gibi nükslere de yol açmıştır. Tamzali ve ark. (29), ilk olarak 2000 yılında, daha önce cerrahi operasyona alınan fakat sonradan nükseden sarkoidli 3 at üzerinde elektrokemoterapi uygulayarak her at için en fazla 3 seans yaptıklarını ve bir buçuk yıl sonrasında dahi nüks görmediklerini belirtmişlerdir.

Daha sonra 2011 yılında yine Tamzali ve ark. (30) 48 at üzerinde, bazı vakalarda cerrahi operasyonla birlikte bazılarında ise yalnız başına elektrokemoterapi uygulayarak toplamda 194 tane tümörü tedavi etmişler ve tüm hayvanların tedaviyi iyi tolere ettiklerini, 4 yıllık takip sürecinin sonunda da sadece bir tümörde nüks gördüklerini bildirmişlerdir.

5.3. Melanomlar

Melanomla ilgili ilk çalışmayı yapan Spugnini ve ark. (23) 2011'de melanom teşhisi konulan bir ata elektrokemoterapi uygulamışlardır. 2 seanstan sonra, nodüllerde %50 oranında gerileme kaydetmişler ve atın yaşam kalitesinde yükselme fark etmişlerdir. Tedavinin yarım kalması ve sadece 2 seans uygulanmasına rağmen 1 yıl sonra dahi mevcut nodüllerde çok küçük büyümeler olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışma ile atlarda büyük melanomları hafifletmek için elektrokemoterapinin kullanılabilir bir uygulama olduğu belirtilmiştir (23,24).

Yine Spugnini ve arkadaşlarının (28) 2021 yılında yayınladıkları bir çalışmada 9 melanomlu, 4 fibrosarkomlu, 3 skuamöz hücre karsinomlu 16 at üzerinde EKT uygulamışlardır. 16 hastanın 7'sine intraoperatif kombinasyonla birlikte EKT uygulanırken, 9'una tek tedavi yöntemi olarak EKT uygulanmıştır. Tek başına EKT uyguladıkları 9 atın 2'sinden tam yanıt 5'inden de kısmi yanıt elde ederken, cerrahi operasyonla birlikte kombinasyon halinde EKT uyguladıkları 7 atın tamamından tam yanıt almışlardır ve 9 ila 60 ay arasında değişen farklı zamanlardaki kontrollerde tümör oluşumunun tekrarlanmadığı gözlemlenmiştir. Uygulanan prosedürler sırasında, sistemik bir toksisite olmaksızın geçici inflamasyonla sınırlı olmak üzere, minimum rahatsızlık gözlemlenmişlerdir. Büyük perianal melanomlu bir ata ilk EKT seansı sonrası yan etki olarak fistül oluştuğunu fakat

topikal tedaviyle spontan olarak iyileştiğini, tolere edilebilirlik açısından diğer atların tedaviyi iyi karşıladıklarını bildirmişlerdir.

5.4. Skuamöz hücreli karsinomlar

Skuamöz hücreli karsinom kedilerde ve köpeklerde en sık görülen kötü huylu tümörlerden biridir. Genel tedavi prosedürlerinin invaziv olması, maliyet yüksekliği, yan etkileri vb. nedenlerle alternatif tedavi seçenekleri aranmıştır. Tozon ve ark. (31) 2008-2011 yıllarında farklı klinik evrelerde bulunan toplamda 17 skuamöz hücre karsinomu olan 11 kedi üzerinde elektrokemoterapi uygulamış ve 17 nodülden biri hariç hepsinin elektrokemoterapiye cevap verdiğini ve bunlardan 14'ünde 2 aydan 3 yıla kadar devam eden tam yanıt elde edildiğini bildirmişlerdir. Kedilerin elektrokemoterapiyi iyi tolere ettikleri görülmüş ve lokal veya sistemik yan etkiye rastlanmamıştır.

Boncea ve ark. (2019) yaptıkları bir çalışmada yaygın skuamöz hücreli karsinom tanısı konulan 4 yaşlı Dogo Argentino ırkı köpekte elektrokemoterapi uygulaması yapmışlar ve antitümöral ajan olarak kullanılan sisplatin uygulamasından bir ay sonra tümör nodüllerinde tam gerileme kaydettiklerini belirtmişlerdir.

2021 yılında yayınlanan çok merkezli bir çalışmada (19) nazal planumda skuamöz hücre karsinomu bulunan 61 kedi üzerinde tek tedavi olarak EKT uygulanmış olup 61 kедiden 40'ından tam yanıt, 19'undan kısmi yanıt alındığı bildirilmiştir. Antitümöral ajan olarak intravenöz bleomisin kullanılan bu çalışmada tedaviye genel yanıt oranı %96,72'dir. Yapılan çok merkezli çalışmada lokal toksisite, ilk EKT uygulamasından sonra 6 noktalı bir toksisite skoru kullanılarak değerlendirilmiş; burada 0- toksisite yok, 1- hafif şişlik, 2- şişme/nekroz < 1 cm, 3- şiddetli şişlik, 4- derin nekroz ve 5- şiddetli şişlik ve doku kaybı olarak belirlenmiş olup EKT toksisitesinin kedilerin %51'inde > 2, %49'unda < 2 toksisite skoru gözlemlendiği bildirilmiştir.

Kore'de yapılan ve 2021 yılında yayınlanan bir başka çalışmada (33) ikisinde skuamöz hücre karsinomu (SHK) ve birinde liposarkom bulunan 3 köpeğe EKT uygulaması yapılmıştır. Tümör lokasyonları servikal, oral ve abdominal boşluk olan köpeklere antitümöral ajan olarak bleomisin intratümöral şekilde uygulanmış olup her birine uygulanan 2 EKT seansından sonra oral SHK'ü olan köpekten kısmi yanıt servikal SHK'ü olan köpekten tam yanıt alındığı bildirilmiştir. İntraabdominal liposarkomu olan köpeğin ultrasonografi eşliğinde uyguladıkları EKT tedavisi 3.seans sonrası bölgede meydana gelen nekrozun çok şiddetli olması sebebiyle durdurulmuş olup 8 hafta boyunca yapılan kontrollerde durumunun stabil olduğu gözlemlenmiştir. Yazarlar EKT'nin uygulanmasının nispeten kolay olduğunu, sistemik yan etkisinin bulunmadığını ve cerrahi müdahale

edilemeyecek durumda olan tümörlerin tedavisinde avantajlı bir adjuvan tedavi olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

5.5. Mast hücre tümörleri

Mast hücre tümörleri, köpeklerde tüm malign kutanöz tümörlerin %11- 27'sini oluşturmaktadır. Bu tip tümörlerin tedavisinde tercih edilen ilk yöntem cerrahi eksizyondur. Spugnini ve ark.(20), köpeklerde tam rezeke edilememiş mast hücre tümörlerinde adjuvan tedavi olarak elektrokemoterapi yöntemini uygulamıştır. Bu çalışmada bleomisin, EKT ile başarılı bir şekilde kullanılmış ve %85 oranında başarıya ulaşmışlardır.

2009 yılında Kodre ve ark. (11) tarafından yapılan bir çalışmada köpeklerde mast hücre tümörlerinin standart cerrahi tedavisi ile elektrokemoterapi tedavisinin etkinliği karşılaştırılmıştır. Bu çalışma sonunda EKT'nin mast hücre tümörlerinin tedavisinde cerrahi eksizyona hem alternatif tedavi hem de yardımcı tedavi yöntemi olarak kullanılabileceği görülmüştür. Özellikle sadece tek bir seans sonrasında uzun süreli tam yanıt alınabilen küçük nodüller için ve nodülün lokalizasyonu nedeniyle cerrahi prosedür uygulanamayacak durumlarda olan nodüller için alternatif bir tedavi olabileceği kanısına varılmıştır. Ayrıca, EKT ile tedavi edilen tümörler için tümörün nüks etme süresi daha uzun olarak hesaplanmıştır.

Lowe ve ark.'nın (13) yaptığı başka bir çalışmada mast hücre tümörlerinin tedavisinde EKT, cerrahi prosedürlerle kombine halde kullanılmıştır. Çalışmada 51 köpeği kapsayan 4 farklı grup olup bunlardan 15'i yalnızca EKT ile, 11'i intraoperatif EKT ile, 14'ü cerrahiye adjuvan postoperatif EKT ile ve 11'i cerrahi uygulamayı takiben nüks sonrası EKT ile tedavi edilmiştir. Tek başına EKT'nin %80, intraoperatif EKT'nin %91 ve postoperatif EKT'nin %93 oranında tam remisyona sağladığı bu çalışma EKT'nin intraoperatif ya da postoperatif kullanılabilirliğini ve başarısını kanıtlamıştır.

6. Sonuç

Elektrokemoterapi gerek tek başına birincil tedavi yöntemi olarak gerekse intraoperatif ve postoperatif yöntemlerle cerrahi müdahalelere destek tedavi amacıyla onkolojik tedavi prosedürlerinde oldukça önemli bir yere sahiptir. Özellikle etkisinin elektriksel darbelere maruz kalan bölgelerle sınırlı olması hastayı olası sistemik yan etkilerden korumakta ve bu özelliğiyle tercih edilebilir bir yöntem olarak kabul görmektedir. Nüks durumlarında tekrarlanabilmesi özelliği EKT uygulamalarının kullanımını arttırmaktadır. Geliştirilmesi ve üzerine çalışılması gereken yeni bir yöntem olarak EKT uygulamalarının veteriner alanda da hem küçük hayvan hem de büyük hayvan pratiğinde yaygınlaşarak kullanılacağı görülmektedir.

Kaynaklar

1. Boncea AM, Cristea A, Bourdeau P. Electrochemotherapy as treatment for generalised squamous cell carcinoma in a dog. *Veterinary Record Case Reports* 2019; 7: 787. doi:10.1136/vetreccr-2018-000787.
2. Campana LG, Miklavčič D, Bertino G, Marconato R, Valpione S, et al. Electrochemotherapy of superficial tumors—Current status: Basic principles, operating procedures, shared indications, and emerging applications. In *Seminars in Oncology* 2019; 46: 173-191. doi:10.1053/j.seminoncol.2019.04.002.
3. Cemazar M, Tamzali Y, Sersa G, Tozon N, Mir LM, et al. Electrochemotherapy in veterinary oncology. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008; 22: 826-831. doi:10.1111/j.1939-1676.2008.0117.x.
4. Chen J, Ghorai M K, Kenney G, Stubbe J. Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage. *Nucleic Acids Research* 2008; 36: 3781-3790. doi:10.1093/nar/gkn302.
5. Frandsen SK, Gehl JA. Review on differences in effects on normal and malignant cells and tissues to electroporation-based therapies: A focus on calcium electroporation. *Technology in Cancer Research and Treatment* 2018; 17. doi:10.1177/1533033818788077.
6. Geboers B, Scheffer HJ, Graybill PM, Ruarus AH, Nieuwenhuizen S, et al. High-voltage electrical pulses in oncology: irreversible electroporation, electrochemotherapy, gene electrotransfer, electrofusion, and electroimmunotherapy. *Radiology* 2020; 295: 254-272. doi:10.1148/radiol.2020192190.
7. Gehl J, Skovsgaard T, Mir LL. Enhancement of cytotoxicity by electropermeabilization: an improved method for screening drugs. *Anti Cancer Drugs-International Journal on Toxic and Non Toxic Anti Cancer Agents* 1998; 9: 319-326. doi:10.1097/00001813-199804000-00005
8. Gehl J, Sersa G, Matthiessen LW, Muir T, Soden D, et al. Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases. *Acta Oncologica* 2018; 57: 874-882. doi:10.1080/0284186X.2018.1454602
9. Hamilton, WA, Sale AJH. Effects of high electric fields on microorganisms: II. Mechanism of action of the lethal effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1967; 148: 789-800. doi:10.1016/0304-4165(67)90053-0
10. Kanthou C, Kranjc S, Sersa G, Tozer G, Zupanic A, et al. The endothelial cytoskeleton as a target of electroporation-based therapies. *Molecular Cancer Therapeutics* 2006; 5: 3145-3152. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0410
11. Kodre V, Cemazar M, Pecar J, Sersa G, Cör A, et al. Electrochemotherapy compared to surgery for treatment of canine mast cell tumours. In *Vivo* 2009; 23: 55-62. 0258-851X/2009.
12. Kotnik T, Miklavčič D. Theoretical evaluation of voltage inducement on internal membranes of biological cells exposed to electric fields. *Biophysical Journal* 2006; 90: 480-491. doi:10.1529/biophysj.105.070771
13. Lowe R, Gavazza A, Impellizeri JA, Soden DM, Lubas G. The treatment of canine mast cell tumours with electrochemotherapy with or without surgical excision. *Veterinary and Comparative Oncology* 2017; 15: 775-784. doi:10.1111/vco.12217.
14. Miklavčič D, Serša G, Breclj E, Gehl J, Soden D, et al. Electrochemotherapy: technological advancements for efficient electroporation-based treatment of internal tumors. *Medical and Biological Engineering and Computing* 2012; 50: 1213-1225. doi:10.1007/s11517-012-0991-8.
15. Mir LM, Gehl J, Sersa G, Collins CG, Garbay JR, et al. Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator™ by means of invasive or non-invasive electrodes. *European Journal of Cancer Supplements* 2006; 4: 14-25. doi:10.1016/j.ejcsup.2006.08.003.
16. Neumann E, Rosenheck K. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *The Journal of Membrane Biology* 1972; 10: 279-290. doi:10.1007/BF01867861.
17. Probst U, Fuhrmann I, Beyer L, Wiggemann P. Electrochemotherapy as a new modality in interventional oncology: a review. *Technology in Cancer Research and Treatment* 2018; 17: 1-12. doi:10.1177/1533033818785329.
18. Rangel MM, Luz J, Oliveira KD, Ojeda J, Freytag JO, et al. Electrochemotherapy in the treatment of neoplasms in dogs and cats. *Austral Journal of Veterinary Sciences* 2019; 51: 45-51. doi:10.4067/S0719-81322019000200045.
19. Simcic P, Pierini A, Lubas G, Lowe R, Granziera V, et al. A Retrospective Multicentric Study of Electrochemotherapy in the Treatment of Feline Nasal Planum Squamous Cell Carcinoma. *Veterinary Sciences* 2021; 8: 53. doi:10.3390/vetsci8030053.
20. Spugnini EP, Vincenzi B, Baldi F, Citro G, Baldi A. Adjuvant electrochemotherapy for the treatment of incompletely resected canine mast cell tumors. *Anticancer Research* 2006; 26: 4585-4589.
21. Spugnini EP, Baldi A, Vincenzi B, Bongiorno F, Bellelli C, et al. Intraoperative versus postoperative electrochemotherapy in high grade soft tissue sarcomas: a preliminary study in a spontaneous feline model. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2007; 59: 375-381. doi:10.1007/s00280-006-0281-y.
22. Spugnini EP, Vincenzi B, Betti G, Cordahi F, Dotsinsky I, et al. Surgery and electrochemotherapy of a high-grade soft tissue sarcoma in a dog. *The Veterinary Record* 2008; 162: 186. doi:10.1136/vr.162.6.186.
23. Spugnini EP, D'Alterio GL, Dotsinsky I, Mudrov T, Dragonetti E, et al. Electrochemotherapy for the treatment of multiple melanomas in a horse. *Journal of Equine Veterinary Science* 2011; 31: 430-433. doi:10.1016/j.jevs.2011.01.009.
24. Spugnini EP, Baldi A. Electrochemotherapy in veterinary oncology: from rescue to first line therapy. Li S, Cutrera J, Heller R, Teissie J. Eds. In: *Electroporation Protocols: Preclinical and Clinical Gene Medicine*. Humana Press, New York, NY 2014; pp.247-256.
25. Spugnini EP, Baldi A. Electrochemotherapy in veterinary oncology: state of the art and perspectives. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 2019; 49: 967-979. doi:10.1016/j.cvsm.2019.04.006.
26. Spugnini EP, Vincenzi B, Amadio B, Baldi A. Adjuvant electrochemotherapy with bleomycin and cisplatin combination for canine soft tissue sarcomas: A study of 30 cases. *Open Veterinary Journal* 2019; 9: 88-93. doi:10.4314/ovj.v9i1.15.
27. Spugnini EP, Vincenzi B, Carocci F, Bonichi C, Menicagli F et al. Combination of bleomycin and cisplatin as adjuvant electrochemotherapy protocol for the treatment of incompletely excised feline injection site sarcomas: A retrospective study. *Open Veterinary Journal* 2020; 10: 267-271. doi:10.4314/ovj.v10i3.4.
28. Spugnini EP, Scacco L, Bolaffio C, Baldi A. Electrochemotherapy for the treatment of cutaneous solid tumors in equids: A retrospective study. *Open Veterinary Journal* 2021; 11: 385-389. doi:10.5455/OVJ.2021.v11.i3.8.

29. Tamzali Y, Teissie J, Rols MP. Cutaneous tumor treatment by electrochemotherapy: preliminary clinical results in horse sarcoids. *Revue de Medecine Veterinaire* 2001; 152: 605-610.
30. Tamzali Y, Borde L, Rols MP, Golzio M, Lyazrhi F et al. Successful treatment of equine sarcoids with cisplatin electrochemotherapy: a retrospective study of 48 cases. *Equine Veterinary Journal* 2012; 44: 214-220. doi:10.1111/j.2042-3306.2011.00425.x.
31. Tozon N, Pavlin D, Sersa G, Dolinsek T, Cemazar M. Electrochemotherapy with intravenous bleomycin injection: an observational study in superficial squamous cell carcinoma in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 2014; 16: 291-299. doi:10.1177/1098612X13507071.
32. Tozon N, Tratar UL, Znidar K, Sersa G, Teissie J, et al. Operating procedures of the electrochemotherapy for treatment of tumor in dogs and cats. *Journal of Visualized Experiments* 2016; 116. doi:10.3791/54760.
33. Yeom SC, Song KH, Seo KW. The application of electrochemotherapy in three dogs with inoperable cancers. *Korean Journal of Veterinary Research* 2021; 61: 1-9. doi:10.14405/kjvr.2021.61.e9.
34. Zielichowska A, Daczewska M, Saczko J, Michel O, Kulbacka J. Applications of calcium electroporation to effective apoptosis induction in fibrosarcoma cells and stimulation of normal muscle cells. *Bioelectrochemistry* 2016; 109: 70-78. doi:10.1016/j.bioelechem.2016.01.005.



Enterobacteriaceae Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz ile Karbapenem ve Kolistin Direnci

^{ID} Ali Anıl SÜLEYMANOĞLU¹, ^{ID} Harun AKSU¹, ^{ID} Ali AYDIN¹

¹ İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, İstanbul/TÜRKİYE

◆ Geliş Tarihi/Received: 13.02.2022

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 28.02.2022

◆ Yayın Tarihi/Published: 30.06.2022

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Süleymanoglu AA, Aksu H, Aydın A. *Enterobacteriaceae* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz ile Karbapenem ve Kolistin Direnci. Bozok Vet Sci (2022) 3, (1):12-19.

Özet: Son yıllarda antibiyotik dirençliliği insan ve hayvan sağlığını tehdit eden önemli bir tehdit haline almaktadır. Özellikle çoklu antibiyotik dirençlilik durumu araştırmacılar tarafından sıklıkla bildirilmektedir. Antibiyotik dirençliliği konusundaki önemli bir konu Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamazlar (GSBL) olup, GSBL grubu çoklu antibiyotik direnci gösteren mikroorganizmalardan oluşmaktadır. GSBL pozitif bakteriler hayvanlarda da mevcut olup gıda aracılığıyla insanları enfekte edebilmektedir. Bu nedenle GSBL konusu hem beşeri tıp hem de veteriner tıbbının ortak konusudur. GSBL bilim dünyası tarafından yakından takip edilmekte ve GSBL sınıflandırılması ile tür analiz çalışmalarını devam ettirmektedir. Nitekim Dünya Sağlık Örgütü, çoklu antibiyotik direnç geliştiren mikroorganizmaların düzenli takip edilmesini önermektedir. GSBL tarama ve doğrulama yöntemleri çeşitli analizler ile yapılabilmektedir. Karbapenem içeren antibiyotikler beşeri hekimlikte kullanılan önemli bir grup olarak bildirilmekte olup, GSBL pozitif bakterilere karşı kullanılan karbapenem grubu antibiyotiklere olan direnç sürekli artış göstermektedir. Bununla birlikte, GSBL'ye karşı kullanılan karbapenem grubundaki antibiyotik direnci özellikle yoğun bakımdaki hastalarda hayati tehlikeye neden olmaktadır. Son çare antibiyotigi olarak bilinen ve kombine bir şekilde kullanılan kolistin, bu gelişmeler ile tekrardan bilim dünyasında ilgi odağı olmaktadır. Bu çalışmanın amacı, ESBL, karbapenem ve kolistin antibiyotik grupları ve bu antibiyotik gruplarına karşı gelişen direncin önemini ortaya koymaktır.

Anahtar Kelimeler: *Enterobacteriaceae*, Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, Karbapenem, Kolistin, Çoklu antibiyotik direnci

Extended Spectrum Beta-Lactamase with Carbapenem and Colistin Resistance on *Enterobacteriaceae* Strains

Abstract: Recently, antibiotic resistance has become an important hazard threatening human and animal health. Multiple antibiotic drug resistance is frequently reported by researchers. An important topic on antibiotic resistance is Extended Spectrum Beta-lactamases (ESBL), and the ESBL group consists of microorganisms that show multiple drug resistance. ESBL positive bacteria are also present in animals and can infect humans through food. Therefore, the issue of ESBL is a common subject of both human and veterinary medicine. ESBL is followed closely by the scientific world and continues its classification and species analysis studies. Therefore, the World Health Organization recommends regular follow-up of microorganisms that develop multiple antibiotic resistance, and ESBL screening and verification methods can be performed with various analyzes. Antibiotics containing carbapenems are reported as an important group used in human medicine, and resistance to carbapenem group antibiotics used against ESBL positive bacteria is increasing continually. However, antibiotic resistance in the carbapenem group used against ESBL is life-threatening, especially in patients in intensive care. Colistin is known as the last resort antibiotic and used in combination then once again the focus of attention in the scientific world with these developments. This study aimed to reveal the importance of ESBL, carbapenems, and colistin antibiotic groups and the resistance developing against these antibiotic groups.

Keywords: *Enterobacteriaceae*, Extended spectrum beta-lactamase, Carbapenem, Colistin, Multi-drug resistance

1.Giriş

Enterobacteriaceae bakterileri orta büyüklükte (0,3-1,0 x 1,0-0,6 µm) Gram- negatif sporsuz, fakültatif anaerop, çomak şeklinde bakterilerdir (1). Söz konusu bakteri familyasındaki mikroorganizmaların geliştirdiği antibiyotik direnç mekanizmaları, önemli halk sağlığı tehditleri meydana getirmektedir. Bu bakteri ailesinde gelişen antibiyotik direnç çeşitlerinin önemli türleri arasında Genişlemiş Spektrumlu β-Laktamaz (GSBL) ve karbapenem direnci yer almaktadır (2). Kolistin adlı antibiyotigin ise Gram-negatif bakterilerin geliştirdiği çoklu antibiyotik

direncine karşı cevap olarak, günümüzde yeniden kullanımını söz konusu olmuştur (3).

1.1. *Enterobacteriaceae*

Enterobacteriaceae oldukça önemli Gram-negatif basilleri içeren en büyük bakteri ailesidir. Bu bakteri familyası, doğada birçok ortamda gözlemlenebilen mikroorganizmalardan oluşmakta ve insanlar ile çoğu hayvanın doğal intestinal mikrobiotasında bulunabilmektedir. Bu familyada çok sayıda cins, tür ve alt türler yer almaktadır. Bu cinsler genel olarak; antijenik

karakterine, biyokimyasal özelliklerine, gen sekans analizine ve protein yapılarına bakılarak kategorize edilmektedir. Bu mikroorganizma ailesinin büyüklüğüne rağmen, insanlar için az sayıda patojen bakteri bu ailede yer almaktadır. *Enterobacteriaceae* familyasında bulunan *Salmonella* spp., *Escherichia coli* (E. coli) O157:H7 gibi bazı bakteriler klinik vakalarda patojen olarak düşünülürken, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* ise intestinal mikrobiota bakterileri olup klinik vakalarda fırsatçı mikroorganizma olarak görülebilmektedir (4).

Enterobacteriaceae ailesindeki çoklu antibiyotik direnci; hasta tedavisi, enfeksiyon kontrolü ve toplum sağlığı açısından oldukça önemli bir sorun halini almaktadır. Özellikle GSBL ve karbapenem direnci bu ailede sıklıkla görülmektedir. Bundan dolayı, bu tarz antibiyotik direncine sahip patojenlerin güvenilir ve hızlı bir şekilde tanımlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır (2). *Enterobacteriaceae* ailesindeki antibiyotik dirençliliğinin saptanması için HPA (Sağlık Koruma Örgütü), CDC [Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri] ve EUCAST (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi) tarafından farklı analiz çeşitleri tavsiye edilmektedir (5, 6, 7).

1.2. Antibiyotik direnci

Antibiyotik direnci; herhangi bir bakterinin, antimikrobiyal preparatın bakterisit ya da mikroorganizmaların üremesini inhibe edici (bakteriyostatik) özelliğinden korunmasıdır. Antibiyotiklere karşı mikroorganizmaların geliştirdikleri direnç mekanizmaları genel olarak 3 şekilde ifade edilmektedir. Bunlardan doğal direnç; mikroorganizmanın sahip olduğu özellikler sonucu ilacın afinite gösterdiği yapıyı taşıyamakta veya ilaç hedefine etki edememektedir. Kazanılmış direnç ise; mikroorganizmaya eskiden etki edebilen antibiyotiklerin artık etki edememesidir ki bu direnç türü diğer direnç türlerine göre daha fazla önem taşımaktadır. Son olarak çevre şartlarına bağlı direnç; normal koşullarda bakteriye karşı etkili olan ilacın, koşullar farklılaştığında etki edeceği bölgeye erişememesi ya da istenilen etkinliği gösterememesi olarak bilinmektedir (8).

Gram-negatif bakterilerde Multi-Drug Resistance (MRD) yani çoklu ilaç direnci global bir tehdit olarak görülmektedir. MRD Gram-negatif bakteriyel enfeksiyonlar, günümüzde enfeksiyon hastalıklarının en çok zorlanılan problemleri arasında yer almaktadır (9).

CDC yılda 2 milyondan fazla insanın dirençli organizmalar ile enfekte olduğunu tahmin etmekte ve bu yüzden yıllık 23.000 insanın hayatını kaybettiğini varsaymaktadır. Ne yazık ki, antimikrobiyal dirençli organizmaların sayısı sürekli artış göstermektedir. 2014 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) dünyanın çoğu bölgesinde oldukça yüksek direnç rakamları bildirmiştir. Örneğin, tüm *Klebsiella*

suşlarının %50'sinden fazlasının üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli olduğu ifade edilmektedir. Nitekim CDC, özellikle karbapenem dirençli *E. coli* ve *K. pneumoniae* ile GSBL üreten Gram-negatif basilleri önemli sağlık tehdidi olarak ifade etmektedir (10).

1.3. Antibiyotik dirençli bakteriler ve gıda ürünleri

Dünyamızın artan insan popülasyonu ile beraber insanların yaşam koşullarının gelişmesi sonucu gıda değeri olan hayvanlarda kullanılan ilaçların çeşit ve sayılarındaki gelişmeler, oldukça önem arz etmektedir. İnsanlarda ve hayvanlarda terapötik olarak kullanılan antibiyotik sınıfları büyük oranda benzerlik gösterip, bu sebeple enfeksiyona neden olanlar ile antibiyotik dirençli bakterilerin ortaya çıkma ve yayılma riski artmaktadır (11, 12).

Et, yumurta, süt, su ve bal gibi gıda ürünlerinde antibiyotik kalıntılarının saptanabilmesinde çok sayıda sebep bulunabilmektedir. Esas nedenleri olarak, hayvanlara yüksek dozda antibiyotik uygulanması ve sonrasında yasal bekleme süresi bitmeden söz konusu hayvanlara ait ürünlerinin insan tüketim için kullanıma sunulması gösterilmektedir (13).

Gıdalar, antimikrobiyel dirençli bakteriler ile farklı yollar ile kontamine olabilmektedir. Antibiyotik dirençli bakteriler suda, toprakta veya insan ile hayvan dışkısında bulunabilmektedir. Tarımsal ürünler, hayvan veya insan dışkısı ile kontamine sular ile sulanması ile kontamine olabilmektedir (14). Gıda ürünleri ilk ürün iken kontamine olabileceği gibi çapraz bulaşma ile sonradan da antibiyotik dirençli bakteriler ile kontamine olabilmektedir (15).

1.4. Beta laktam hakkında genel bilgi

β -laktam grubu antibiyotikler; dört üyeli β -laktam halkasından meydana gelmektedir. β -laktam antibiyotik gruplarındaki farklılıklar, yapılarındaki yan zincir çeşitleri ile farmakokinetik karakterlerinden meydana gelmektedir. Bu antibiyotik grubu; kimyasal yapılarına, aktivite tipine (bakterisit/bakteriyostatik) ve bakteri etki spektrumuna göre sınıflandırılmaktadır (16).

1.5. Beta laktamazlar hakkında genel bilgi

Bir enzim olan beta-laktamazlar; beta-laktam halkasında bulunan amid bağını parçalamak suretiyle beta laktam grubu antibiyotiklerin etkinliğini düşürmektedir. Bir beta laktam olan penisilin Alexander Fleming tarafından keşfedilmiş olmakla birlikte, Abraham ve Chain (17) *E. coli*' den elde ettikleri özütün kısa bir süre içerisinde penisilin etkisini ortadan kaldırdığını bildirmişlerdir.

1.6. GSBL hakkında genel bilgi

Halk sağlığını tehdit eden enfeksiyonlardan çoğunlukla Gram-negatif bakteri türleri sorumlu tutulmaktadır. Beta-laktam antibiyotiklere karşı direncin genel sebebi olan beta-

laktamazlar, söz konusu etkenlerin sağlık problemleri oluşturmadaki en önemli nedeni olarak bilinmektedir. İlk keşfedilen beta-laktamazlar, penisilinler ile birinci kuşak sefalosporinleri etkisizleştirmekle birlikte; seftaksim, seftazidim gibi geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere karşı duyarlıdır. Keşiflerinden sonra geniş spektrumlu beta-laktam preparatların yaygın kullanılmaları ile gelişen mutasyonlar neticesinde “GSBL” olarak isimlendirilen yeni enzimler oluşmuştur (18).

1.7. GSBL pozitif bakterilerin önemi

GSBL pozitif Gram-negatif bakteriler, çeşitli klinik semptomlara neden olabilmektedir. Oluşan klinik vakalarda özellikle üriner sistem enfeksiyonları ile solunum sistemi enfeksiyonları öne çıkmaktadır. Ek olarak sepsis, menenjit, kolanjit gibi çeşitli rahatsızlıklarda görülebilmektedir. GSBL kaynaklı klinik vakalar ile karşılaşan dahiliye uzmanı doktorlar gerekli çıktılardan faydalanamadıkları için tedavi süreçlerinde zorlanabilmektedir. Yoğun bakım ünitelerinde GSBL pozitif bakteriler sayesinde direncin aktarılabilmesi devam eden tedavi süreçlerini olumsuz etkilemektedir (19).

GSBL pozitif bakterilerin tespiti sonrasında, bulunan türlerinin çoğunluğunun *Enterobacteriaceae* olması, bu bakteri ailesinin önemi ifade etmektedir (20). GSBL pozitif ana mikroorganizma grubu *Enterobacteriaceae* familyasıdır. *Enterobacteriaceae*'da bulunan GSBL pozitif önemli bakteriler arasında *E. coli* ve *K. pneumoniae* ilk iki sırada yer almaktadır (21).

GSBL pozitif *Enterobacteriaceae* familyasındaki bakterilerin mikrobiyoloji laboratuvarlarında saptanması

Tablo 1: Beta laktamaz enzim çeşitlerinin sınıflandırması

Bush-Medeiros-Jacoby Sistemi	Önemli Alt Gruplar	Ambler Sistemi	Belli Başlı Özellikler
Grup 1 sefalosporinazlar		Grup 1 sefalosporinazlar	Genellikle kromozomal; karbapenemler dışında tüm β-laktamlara direnç; klavulanat ile inhibisyon yok
Grup 2 penisilinazlar (klavulanik aside duyarlı)	2a 2b 2be 2br 2c 2e 2f 2d	A (serin β-laktamazlar) A A A A A A D (oksasilin hidrolizi)	Stafilokok penisilinazları Geniş spektrumlu TEM-1, TEM-2, SHV-1 Genişlemiş spektrumlu: çoğunlukla TEM ve SHV çeşitleri İnhibitörlere dirençli TEM Karbenisilini hidrolize edenler Klavulanat ile inhibe olan sefalosporinazlar Klavulanat ile inhibe olan karbapenemazlar Oksasilini hidroliz edenler (OXA)
Grup 3 metallo β-laktamazlar	3a 3b 3c	B (metalloenzimler) B B	Çinko bağımlı karbapenemazlar
Grup 4 β-laktamazlar		Sınıflandırılmamış	Birçoğu dizi analizi yapılmamış, çeşitli enzimler

büyük önem taşımaktadır. Genel olarak ifade etmek gerekir ise; GSBL pozitif bakterilerin doğrudan kontaminasyon riskinden dolayı gerekli önlemler alınmalı, GSBL pozitif bakteri kaynaklı enfeksiyonlarda sefalosporin grubu antibiyotikler reçete edilmemeli ve bu enfeksiyonlarda karbapenem grubu antibiyotiklerin kullanılmasının mortalite rakamlarını düşürmesinden ötürü karbapenem kullanımı ve direncinin takibi gerekmektedir (22).

1.8. GSBL grubu bakterilerin sınıflandırması

Gram-negatif bakterilerde β-laktam grubu antibiyotiklere karşı oluşan direncin en önemli mekanizması; beta laktamaz üretimi olarak bilinmektedir. İlave olarak kromozomal ya da ekstrakromozomal mekanizmalarda etkin olup, plazmid aracılığıyla aktarılan ekstrakromozomal β-laktamazlar, Gram-negatif bakteriler arasında giderek artmaktadır (23). β-laktamaz enzim çeşitleri Bush-Jacoby-Medeiros fonksiyonel ve Ambler moleküler sınıflandırma olmak üzere iki şekilde kategorize edilmektedir (Tablo 1). Bush-Jacoby-Medeiros (24) fonksiyonel sınıflandırmasında; beta laktamaz enzimleri substrat ve inhibitör profilleri gibi fonksiyonel özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Ambler sınıflandırılmasına (24) göre ise; beta laktamaz enzimlerinin protein benzerliğine göre A, B, C, D grupları şeklinde sınıflandırma yapılmaktadır. Sınıf A, C ve D'de yer alan enzimler serin β-laktamaz olmakla beraber, sınıf B grubunda olan enzimler metallo-β-laktamazlardır (24).

GSBL konusu, yalnızca beta-laktam grubu antibiyotikler için sorun olmayıp aynı zamanda florokinolonlar, aminoglikozidler gibi birçok farklı antibiyotik grubunda direnç konusunu da ilgilendirmektedir (25).

1.9. GSBL tiplerine genel bakış

SHV-1 enziminin bir varyantı olan ilk plazmid aracılı beta laktamaz, *K. pneumoniae*'da Almanya'da 1983 yılında bildirilmiştir. Bu buluşu, Fransa'da TEM-1 ve TEM-2 enzimlerinin varyantlarının tespit edilmesi takip etmiştir. Bu gelişmeler üzerine SHV ile TEM Philippon ve ark. (26) tarafından "GSBL" olarak adlandırılmıştır. Başlıca GSBL tipleri, TEM, SHV, OXA, CTX-M, PER, VEB, IBC, BEL, GES, BES, SFO, TLA enzimleridir. TEM ve SHV enzimleri çoğu GSBL'nin kaynağı olarak bilinmektedir (23). GSBL grubundaki enzimlerin sayıları giderek artış göstermekte olup, günümüzde 200'den fazla GSBL enzimi bulunmaktadır. Bu durum ise gelişen mutasyonlara neden olmaktadır (27). GSBL tipleri ve kısa açıklamaları:

●SHV enzim grubu:

K. pneumoniae'da en sık bulunan SHV, ampisilin ve piperasiline karşı antibiyotik direncinin gelişmesine neden olmaktadır. Bu enzim grubu oksimino sefalosporin grubu antibiyotiklere karşı duyarlıdır (28).

●TEM enzim grubu:

TEM-1 plazmid kökenli en eski enzim olup, penisilin ile birinci kuşak sefalosporin grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişiminden sorumludur. Bu enzim Gram-negatif bakterilerde en çok sentezlenen enzim olarak bilinmektedir. Bununla beraber söz konusu enzim, ampisiline dirençli *E. coli* suşlarının en sık gözlemlenen nedeni olarak gösterilmektedir (29). TEM-1 enziminin keşfinden bugüne kadar gelişen mutasyonlar sonucu farklı TEM grubu enzimler oluşmuştur (30).

●OXA enzim grubu:

Oksasilini hidrolize edebilmesi ile bu gruba OXA adı verilmiştir. Bu grup enzimler TEM ve SHV enzimlerinden fonksiyonel grup 2d ve moleküler sınıf D'de yer almaları ile farklılık göstermektedir. En yaygın olanı OXA-1 enzimi olup, en sık *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)'da bulunsa da Gram-negatif birçok bakteride bulunabilmektedir (31).

●CTX-M enzim grubu:

CTX-M grubu GSBL ilk kez *E. coli* bakterisinde bulunmuştur. Söz konusu grup bu keşif sonrası birçok *Enterobacteriaceae* türünde saptanmıştır. Bu grup GSBL bakterileri substrat olarak sefotaksim grubu antibiyotikleri tercih etmektedir (32).

●PER enzim grubu:

PER grubu bir Türk hastadan izole edilen *P. aeruginosa* izolatından bildirilmiştir. PER-1 enzimi penisilin ve sefalosporin grubu antibiyotiklere karşı dirençli olup klavulanik asit ile inhibe olmaktadır (33). İlave olarak, PER

enzimleri ile TEM ve SHV tipi enzimler ile DNA baz dizilimleri açısından %25-27 düzeyinde benzerlik göstermektedir (34).

●VEB enzim grubu:

VEB-1 ilk kez bir *E. coli* suşunda keşfedilmiş olup, seftazidim sefotaksim ve aztreonam antibiyotiklerine karşı yüksek direnç ve klavulanik asite karşı duyarlılık göstermektedir (35).

●Karbapenemazlar:

Karbapenemazlar; karbapenemleri hidrolize eden enzim grubu olarak bilinmektedir (36).

1.10. GSBL bakterilerinin teşhis yöntemi

GSBL varlığının saptanması ile enzim çeşitlerinin belirlenmesi, özellikle enfeksiyon kontrolü bakımından tavsiye edilmektedir. *Enterobacteriaceae* familyasındaki bakteriler için GSBL saptanmasında önerilen yol, ilk olarak oksimino-sefalosporinlere duyarlı olmama özelliğinin tespit edilmesidir. Sonraki aşamalarda ise fenotipik (bazen genotipik) doğrulama testleri gerçekleştirilmektedir (37, 38).

Enterobacteriaceae familyasındaki bakterilerde GSBL tarama testleri için önerilen yöntemler; sıvı dilüsyon, agar dilüsyon, disk difüzyon veya otomatize sistemlerdir.

Enterobacteriaceae familyasında EUCAST (38)'e göre GSBL tarama yöntemlerinde bakteriler sınıflandırılarak 2 gruba ayrılmıştır. İlk grupta *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Raoultella spp.*, *P. mirabilis* bulunmaktadır (39, 40). İkinci grupta ise *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*, *Providencia*, *Citrobacter freundii* bulunmaktadır. Buradaki sınıflandırmanın nedeni olarak; ikinci grup bakteri topluluğunda deprese kromozomal AmpC β-laktamaz üretimi ile sefalosporin grubu antibiyotiklere karşı direnç yol açan mekanizmalara daha sık rastlanması gösterilmektedir (41).

GSBL tarama testleri sonrası doğrulama yöntemleri kullanılmaktadır. Genel olarak bu doğrulama yöntemleri fenotipik ve genotipik yöntemler olarak iki kategoriye ayrılabilir (38). Fenotipik yöntemler içerisinde kombinasyon disk testi (KDT), çift disk sinerji testi (ÇDS) (şekil 1), GSBL gradient strip testi ve sıvı mikrodilüsyon testi yer almaktadır. Bunların dışında biyokimyasal (kolorimetrik) yöntemlerde bulunmaktadır (40, 41, 42).



Şekil 1: GSBL pozitif *E.coli* suşunun çift disk sinerji testi

1.11. Çift disk sinerji testi ile çeşitli otomatize sistemlerin karşılaştırılması

GSBL üretimini belirlemeye yönelik analizlerle ilgili yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Çeşitli otomatize sistemler (43, 44) ve Çift Disk Sinerji (ÇDS) testi kullanılarak 150 enterik bakteri ile yapılmış karşılaştırmalı bir çalışmada, moleküler metotlar referans olarak alındığında, ÇDS testi, E-test, Phoenix Automated Microbiology System (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, ABD), VITEK 2 (bioMérieux, Fransa) ve MicroScan WalkAway-96 System (Dade Behring, Inc., West Sacramento, CA, ABD), yöntemlerinin GSBL saptanmasında duyarlılıkları sırasıyla, %97; %72,7; %100; %84,5; %98,6; %94,4 ve %98,6 olarak bulunmuş olup ÇDS testinin rutin laboratuvarlar için daha uygun bir yöntem olabileceği sonucuna varılmıştır (43, 44).

GSBL tiplerinin tam olarak tanımlanıp doğrulanabilmesi için moleküler genetik analiz metodlarına ihtiyaç duyulmaktadır. GSBL'nin keşfi sonrası ilk zamanlarda izoelektrik noktalarının belirlenmesi tiplendirme için yeterli olarak görülmüş olsa da (45), günümüzde genetik yöntemler çeşitlenmiş olup Polimer Zincir Reaksiyonundan (PZR) tüm gen sekans analizine kadar çeşitli yöntemler doğrulama metodu olarak kullanılabilir (38, 46).

1.12. Karbapenem

Karbapenem grubu antibiyotikler, toprakta bulunabilen *Streptomyces cattleya* adlı mantar türünden üretilen bir antibiyotik olan tienamisin türevleridir. 1. pozisyonda sülfür yerini alan bir karbon atomu ve beş üyeli tiyazolidin halkasında C2 ve C3 arasında bir çift bağ olması ile penisilin grubu antibiyotiklerden farklılık göstermektedir (47).

1.13. Karbapenem önemi

Karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerden çok MDR ve GSBL üreten bakteri suşlarının ortaya çıkması ve yayılması, dünya çapında önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır. Bu durum halihazırda

kullanılmakta olan antibiyotiklerin etkinliklerine karşı büyük bir tehdit oluşturmaktadır (48).

1.14. Karbapenamazlar

Karbapenamazlar; penisilinleri, sefalosporinlerin çoğunu, değişen derecelerde olmak üzere karbapenemleri ve monobaktamları hidrolize eden beta-laktamazlardır (49). Karbapenamazların moleküler ailesi; New Delhi metallo β -laktamaz (NDM), çeşitli metallo beta laktamazlar [imipenemaz (IMP) Verona Integron Mediated metallo β -laktamaz (VIM)] ile serin karbapenamazlardan (*K. pneumoniae carbapenemase* (KPC) ve OXA tipi karbapenamazlardan) oluşmaktadır (50).

Karbapenamaz türlerinin görülme sıklığı sürekli artmakta olup, daha çok KPC endemik özelliği olmasıyla öne çıkmakta ve endemik olarak ABD, Latin Amerika, İsrail ve Yunanistan'da daha çok tespit edilmektedir (51).

Enterobacteriaceae üyelerinde karbapenamaz üretiminin saptanması için önerilen yöntemler arasında; fenotipik karbapenamazların aranacağı testler, kombinasyon disk testi, karbapenem inaktivasyon testi, kontrol suşları ile test, biyokimyasal testler, lateral akım yöntemleri, MALDI-TOF ile karbapenem hidrolizinin saptanması yer almaktadır (38).

1.15. Karbapenem direnci saptanmasında genotipik yöntemler

Karbapenamaz şüpheli örneklerin kesin tanısında, moleküler genetik yöntemler "Altın Standart" olarak kabul edilmektedir (52). Genetik analiz metodlarında sıklıkla PZR'dan faydalanılmaktadır. Doğrulama için gen sekans analiz yöntemine de başvurulabilmektedir (53, 54).

1.16. Kolistin

Kolistin; *Bacillus polymyxa* subspecies *calistimus*'tan elde edilmiş bir antibiyotiktir. (55). Kolistin 1940'lı yıllarda keşfedilmiş olup polimiksin grubu üyesidir ve polimiksin E olarak isimlendirilmektedir. Ayrıca kolistin, polipeptit yapılı antibiyotik olarak bilinmektedir. Kolistin heptopeptid halka içeren 10 amino asitten oluşan amid bağından ve 2-4 aminobütirik asit ile bağlı yağ asit kuyruğundan meydana gelmektedir (55, 56).

1.17. Kolistinin önemi ve riskler

Kolistin'in etki spektrumu oldukça dardır. Çoğu *Enterobacteriaceae*'ye (*Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. ile *Morganella morganii*, dışında) ve *Acinetobacter* spp. ve *P. aeruginosa* karşı oldukça etkilidir. Buna karşın kolistin, Gram-pozitif veya Gram-negatif koklara, Gram-pozitif basil, çoğu anaerobik bakteri, mantar ve parazite karşı etkili göstermemektedir (57).

Kolistin 1950-1980 yılları arasında tedavi amacıyla sıklıkla kullanılmıştır. 2000'li yıllarda ise nefrotoksik yan

etkilerinden dolayı, kullanımı sadece kistik fibrozlu hastalarda çoklu ilaç dirençli Gram-negatif bakteriler ile oluşan akciğer enfeksiyonları ile sınırlı kalmıştır (58). Ancak, kolistin geçmiş on yılda son çare antibiyotiği olarak; çoklu antibiyotik direncine sahip Gram-negatif bakterilerin bulunduğu enfeksiyonlarda tekrardan kullanılmaya başlanmıştır (59).

Kolistin kullanımında farmokokinetik/farmokodinamik etkinliği ile alakalı önemli veriler olsa da söz konusu antibiyotiğin terapötik kullanımında alternatif çoklu antibiyotik dirençli bakterilere karşı kullanılacak antimikrobiyal madde eksikliği veya çoklu antibiyotik direncine karşı yeni ürünlerin maliyeti etkili olmaktadır. İlave olarak, kolistin önemli yan etkileri olması da kullanımını sınırlandırmaktadır (60).

Karbapenemlere ve sefalosporinlere karşı direnç global düzeyde artarken kolistin son çare antibiyotiklerden biri olarak kabul edilerek DSÖ'nün insan tıbbi için kritik olarak önemli antimikrobialeri listesinde yer almaktadır (3).

1.18. Kolistin direncinin tespiti

Moleküler özellikleri sebebiyle kolistin diğer antibiyotikler gibi duyarlılık testlerinde güvenilir veriler sunmamaktadır (61). Bu dezavantajlı durumun sebebi, kolistin büyük molekül yapısı sebebiyle agara diffüze olmaması sonucunda disk diffüzyon çaplarının güvenilirliğinin az olması şeklinde gösterilmektedir (62, 63). Bu özelliği ile kolistin direncinin araştırılmasında, disk diffüzyon yöntemi uygun bulunmamaktadır (63). Kolistin moleküler yapısına bağlı olarak, kolistin için disk difüzyon testi yerine, tedavide bu antibiyotiğin kullanılmasından önce kesin Minimal İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri ölçülmesini gerektiği ifade edilmektedir (64). Kolistin MİK değerinin saptanması için altın standart olarak belirlenen metot olarak ise sıvı mikrodilüsyon yöntemi gösterilmektedir (65). Kolistin direnci moleküler genetik yöntemler ile de araştırılabilmektedir. Kolistin direncinin araştırılmasında PZR ve tüm genom sekansı gibi teknikler kullanılabilir (66, 67, 68).

2. Sonuç

Antibiyotik direnci, dünya sağlığı için oldukça önemli bir konu olup, önemi günden güne artmaktadır. *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı geliştirdikleri ve geliştirmekte oldukları dirençleri, hem beşeri hem de veteriner tıp dünyası tarafından yakından takip edilmesi gerekmektedir. Hayvanlardan insanlara doğrudan ya da gıda aracılığı ile geçebilen çoklu antibiyotik dirençli bakteriler, gelecekte ciddi halk sağlığı problemlerine neden olabilecektir. Bu konu dâhilinde, GSBL ve bu gruba karşı kullanılan karbapenemlere karşı gelişen direnç durumu konunun ciddiyetini açıkça göstermektedir. Karbapenem direncine

karşı kullanılan son çare antibiyotiği olarak adlandırılan kolistin kullanımını aslında mecburiyetten ortaya çıkarmıştır. Önemli yan etkileri bulunan kolistin, çoklu antibiyotik dirençli bakterilere karşı kullanabileceğimiz imkanların kısıtlılığından dolayı, tekrar kullanılmak durumunda kalmıştır. *Enterobacteriaceae* grubunda yer alan mikroorganizmalarda antibiyotik gelişiminin takip edilmesi ve elde edilen sonuçlara göre gerekli önlemlerin alınması, ülkemiz toplum ve halk sağlığı ile hayvan sağlığı açısından hayati öneme sahip bir durum olarak değerlendirilmektedir.

Kaynaklar

1. Topçu AW, Söyletir G, Doganay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Üçüncü Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008; pp. 2126-2135.
2. Ofer-Friedman H, Shefler C, Sharma S, Tirosh A, Tal-Jasper R, et al. Carbapenems Versus Piperacillin/Tazobactam for Bloodstream Infections of Nonurinary Source Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. *Infection Control Hospital Epidemiology* 2015; 36: 981-5. doi: 10.1017/ice.2015.101.
3. Giske CG. Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomycin, mecillinam and nitrofurantoin. *Clinical Microbiology and Infection* 2015; 10: 899-905. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.05.022>.
4. Murray RP, Rosenthal KS, Pfaller AM. Enterobacteriaceae in Bacteriology. *Medical Microbiology* 2009; 25: 257-270.
5. Richter SS, Marchaim D. Screening for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Who, When, and How?. *Virulence* 2017; 8: 417-426. doi: 10.1080/21505594.2016.1255381.
6. Capone A, Giannella M, Fortini D, Lappa A, Venditti M, et al. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infection accounts for an excess of mortality. *Clinical Microbiology and Infection* 2013; 19: 23-30. doi: 10.1111/1469-0691.12070.
7. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 2007; 20: 440-58.
8. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999; 509-511.
9. Lukac PJ, Bonomo RA, Logan LK. Extended-Spectrum -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Children: Old Foe, Emerging Threat. *Clinical Infection Disease* 2015; 60: 1389-1397. doi: 10.1093/cid/civ020.
10. Forster CS, Courter J, Jackson EC, Mortensen JE, Haslam DB. Frequency of Multidrug-Resistant Organisms Cultured From Urine of Children Undergoing Clean Intermittent Catheterization. *Journal of Pediatric Infectious Diseases Society* 2016; 6: 20. doi: 10.1093/jpids/piw056.
11. Prescott JF. Antimicrobial use in food and companion animals. *Animal Health Research Reviews* 2008; 2: 127-133.
12. Magiorakos AP. Joint opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. *EFSA Journal*, 2009; 7: 1372.
13. Aydın A, Sudağdan M. Büyüyen küresel tehdit: antibiyotik direnci. Büyüenal SK, editör. Gıdanın Geleceğini Riske Eden Güncel Etmenler Tek Tıp Tek Sağlık Konsepti Yaklaşımı. Birinci Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2022. p.8- 17.
14. Bergogne-Bérézin, E. Who or what is the source of antibiotic resistance? *Journal of Medical Microbiology* 1997; 46: 461-47.
15. Walsh C, Duffy G, Nally P, O'Mahony R, McDowell DA, et al. Transfer of ampicillin resistance from Salmonella Typhimurium DT104 to Escherichia coli K12 in food. *Letters in Applied Microbiology* 2008; 46: 210-215.

16. Murray BE, Anderson K, Arnold K, Barlett J, Carpenter C. Erratum. *Clinical Infectious Diseases* 2005; 41: 279. doi.org/10.1086/430468.
17. Gür D. Beta-laktamazlar. *Flora Dergisi* 1997; 2: 3-18.
18. Pitout JDD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public health concern. *The Lancet Infectious Diseases* 2008; 8: 159-166. doi: 10.1016/S1473-3099(08)70041-0.
19. Ramphal R, Ambrose GP. Extended-Spectrum β -Lactamases and Clinical Outcomes: Current Data, *Clinical Infectious Diseases*, 2006; 42: 164–172, https://doi.org/10.1086/500663.
20. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 2008; 14: 144–153. doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01850.x.
21. Brolund A, Edquist PJ, Mäkitalo B, Olsson-Liljequist B, Söderbloma T, et al. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Sweden 2007–2011. *Clinical Microbiology and Infection* 2014; 20: 344-352. doi: 10.1111/1469-0691.12413.
22. Paterson DL. Recommendation for treatment of severe infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). *Clinical Microbiology and Infection* 2000; 6: 460-463. doi:10.1046/j.1469-0691.2000.00107.x.
23. Harada S, Ishii Y, Yamaguchi K. Extended-spectrum β -lactamases: Implications for the clinical laboratory and therapy. *Korean Journal of Laboratory Medicine* 2008; 28: 401-412. doi: 10.3343/kjlm.2008.28.6.401.
24. Bush K, Jacoby AG. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2010; 969–976. doi: 10.1128/AAC.01009-09.
25. Tolun V, Küçükbaşmacı O, Törümküney-Akbulut D, Catal C, Anđ-Küçükler M, Anđ O. Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Clinical Microbiology and Infection* 2004; 10: 72-75. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.00723.x.
26. Canton R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion In Microbiology* 2006; 9: 466-475. doi: 10.1016/j.mib.2006.08.011.
27. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews* 2005; 18: 657-686. doi: 10.1128/CMR.18.4.657-686.2005.
28. Stürenburg E, Mack D. Extended spectrum beta-lactamases: Implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *Journal of Infection* 2003; 47: 279-295. doi: 10.1016/s0163-4453(03)00096-3.
29. Gür D. ESBL'ların genel özellikleri ve ESBL tipleri, yeni ve yeniden gündeme gelen infeksiyonlar. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004.
30. Canton R, Morosini MI, Martin O, Maza S. IRT, and CMT beta-lactamases and inhibitor resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 2008; 14: 53-62 doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01849.x.
31. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance, *Clinical Microbiology Reviews* 1995; 8: 557-84. doi: 10.1128/CMR.8.4.557.
32. Vincent JL. *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine* 1999. Springer Science & Business Media, 2013; pp. 124-125.
33. Nordman P, Ronco E, Naas T, Dupont C, MichelBriand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1993; 37: 962–969. doi: 10.1128/AAC.37.5.962.
34. Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 Extended spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1994; 38: 104-114. doi: 10.1128/AAC.38.1.104.
35. Poir L, Naas T, Guibert M, Chaibi B, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *E. coli* integron gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999; 43: 573-581. doi.org/10.1128/AAC.43.3.573.
36. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology Infection* 2002; 8: 321–331. doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00401.x.
37. Cockerill FR, Patel JB, Alder J, Hardy DJ, Zimmer BL, et al. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first informational Supplement. CLSI documents 2011; 144-147.
38. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, et al. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *Journal of Clinical Microbiology* 2012; 50: 3877-3880.
39. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews* 2005; 18: 657-86. doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005.
40. Biedenbach DJ, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones Antimicrobial Surveillance Program (1997- 2004), *Diagnostic Microbiology and Infection Disease* 2006; 54: 13-21.
41. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of Extended-Spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection* 2008; 14: 90-103. doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01846.x.
42. Platteel TN, Cohen Stuart JW, de Neeling AJ, Vorts GM, Scharringa J, et al. Multi-centre evaluation of a phenotypic Extended Spectrum β -lactamase detection guideline in the routine setting. *Clinical Microbiology and Infection* 2013; 19: 70-76. doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03739.x.
43. Wiegand I, Geiss HK, Mack D, Stürenburg E, Seifert H. Detection of extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45: 1167- 1174. doi.org/10.1128/JCM.01988-06.
44. Sanguinetti M, Posteraro B, Spanu T, Ciccaglione D, Romano L, Fiori B. Characterization of clinical isolates of Enterobacteriaceae from Italy by the BD Phoenix extended-spectrum beta-lactamase detection method. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41: 1463-1468. doi: 10.1128/JCM.41.4.1463-1468.2003.
45. Randall LP, Kirchner M, Teale CJ, Coldham NG, Liebana E, et al. Evaluation of CHROMagar CTX, a novel medium for isolating CTX-M-ESBL positive Enterobacteriaceae while inhibiting AmpC- producing strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009; 63: 302-308. doi.org/10.1093/jac/dkn485.
46. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14: 933-951. doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001.
47. Yohei D. Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Doripenem, and Aztreonam. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases 2015; 22: 285-290.

48. Patel G, Bonomo AR “Stormy waters ahead”: global emergence of carbapenemases. *Frontier in Microbiology* 2013. doi: 10.3389/fmicb.2013.00048.
49. Cantón, R, Carmeli Y, Giske G, Nass, Miriagou V. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 2012; 18: 413-431, doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x.
50. Kumarasamy KK, TolemanMAM, Walsh RT, Bagaia J, Butt F, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infection Diseases* 2010; 10: 597-602. doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70143-2.
51. Logan LK, Weinstein RA. The epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace. *The Journal of Infectious Diseases* 2017; 215: 28-36. doi.org/10.1093/infdis/jiw282.
52. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske C G, Poirel L. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology and Infections* 2012; 18: 432-438 doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03815.x.
53. Avlami A, Bekris S, Gantries G, Kraniotaki E, Paniara O, et al. Detection of metallo-beta-lactamase genes in clinical specimens by a commercial multiplex PCR system. *Journal of Microbiological Methods* 2010; 83: 185-187. doi.org/10.1016/j.mimet.2010.08.014
54. Poirel L, Walsh RT, Cu villier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011; 70: 119-23. doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002.
55. Biswas S, Brunel JM, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Rolain JM Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 2012; 10: 917-934.
56. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Dokuzuncu Baskı. İzmir: Fakülteler Kitapevi, 2009; pp. 428-429.
57. Boisson M, Gregoire N, Couet W, Mimoz O. Colistin in critically ill patients. *Minerva Anesthesiology* 2013; 79: 200-208.
58. Akalin H. Kolistin. *Ankem* 2007; 21: 26-28.
59. WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR) Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. Third edition. Geneva: WHO Press, 2011; p. 7-8.
60. Lenhard JR, Bulman ZP, Tsuji BT, Kaye KS. Shifting gears: the future of polymyxin antibiotics. *Antibiotics*, Basel, 2019; 8: 42. doi.org/10.3390/antibiotics8020042.
61. Giske CG, Kahlmeter G. Colistin Antimicrobial Susceptibility Testing—Can the Slow and Challenging Be Replaced by the Rapid and Convenient?. *Clinical Microbiology and Infection* 2018; 24: 93-94. doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.007.
62. Stürenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D. Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum β -lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004; 54: 134-138. doi.org/10.1093/jac/dkh274.
63. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MicVariability by Method for Contemporary Clinical Isolates of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51: 1678-1684. doi.org/10.1128/JCM.03385-12.
64. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. *Bailey & Scott’s Diagnostic Microbiology*. Baltimore: Mosby Year Book, 1994; pp.362-387.
65. Leclercq R, Canton R, Brown JDF, Giske GC, Heisig P, MacGowan PA, et al. Eucast Expert Rules in Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Infections* 2013; 19: 141-160 doi: 0.1111/j.1469-0691.2011.03703.x.
66. Humphries RM, Ambler J, Mitchell LS, Castanheira M, Dingle T, et al. CLSI Methods Development and Standardization Working Group Best Practices for Evaluation of Antimicrobial Susceptibility Tests, *Journal of Clinical Microbiology*, 2018; 56.
67. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. *Eurosurveillance* 2018; 23. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672.
68. Zankari E, Hasman H, Kaas RS, Seyfarth AM, Agersø Y, et al. Genotyping using whole genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013; 68: 771-777. doi: 10.1093/jac/dks496.



Köpeklerde Lösemi

Emre TÜFEKÇİ¹, Gencay EKİNCİ¹, İhsan KELEŞ¹

¹ Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri/TÜRKİYE

◆ Geliş Tarihi/Received: 04.03.2022

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 17.03.2022

◆ Yayın Tarihi/Published: 30.06.2022

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Tüfekçi E, Ekinci G, Keleş İ. Köpeklerde Lösemi. Bozok Vet Sci (2022) 3, (1):20-27.

Özet: Bu derleme Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Uygulama Hastanesi İç Hastalıkları Kliniği'ne getirilip, lösemi teşhisi konulan köpek sayısındaki artış göz önünde bulundurularak hazırlanmıştır. Hastalığın yaygın olarak görüldüğü Alman çoban köpekleri ve Golden Retriever gibi köpek ırklarının ülkemizde giderek yaygınlaştığı da dikkate alınarak, sorunun ülkemizde yakın gelecekte de artarak devam edeceği düşünülmektedir. Veteriner hekimliğinde bu hastalığın teşhis ve tedavi protokolünde fikir birliğinin olmayışından yola çıkılarak, bu derlemede hastalığın türleri, etiyojisi, patofizyolojisi, klinik bulguları, teşhisi, tedavisi ve muhtemel prognozu hakkında bilgiler verilmiştir. Derlemenin amacı, lösemili köpeklerde, doğru teşhis ve uygun tedavi protokolleri ile yaşam kalitesini artırma ve yaşam sürelerini uzatmaktır. Mevcut literatür bilgisi ışığında hazırlanan bu derlemenin veteriner hekimler için yararlı olacağı kanaatini taşımaktayız.

Anahtar Kelimeler: Akut lenfoblastik lösemi, Akut miyeloid lösemi, Köpek, Kronik lenfositik lösemi

Leukemia in Dogs

Abstract: This review has been prepared considering the increase in the number of dogs diagnosed with leukemia brought to the Erciyes University Faculty of Veterinary Medicine Training, Research and Practice Hospital Internal Diseases Clinic. Considering that dog breeds such as German shepherds and Golden Retrievers, where the disease is common, are becoming increasingly widespread in our country, so, the problem might continue in increasing manner in the near future in our country. Based on the lack of consensus on the diagnosis and treatment protocol of this disease in veterinary medicine, information about the types, etiology, pathophysiology, clinical signs, diagnosis, treatment and possible prognosis of the disease is given in this review. The aim of this review is to improve the quality of life and prolong the life span of dogs with leukemia with correct diagnosis and appropriate treatment protocols. We believe that this review, prepared in the light of existing literature, will be useful for veterinarians.

Keywords: Acute lymphoblastic leukemia, Acute myeloid leukemia, Chronic lymphocytic leukemia, Dog

1.Giriş

Lösemi; kanın şekilli elemanlarının üretim yeri olan kemik iliği kaynaklı bir hastalıktır. Bilindiği üzere kemiklerin iç yapısındaki süngerimsi dokuda (kemik iliği), kırmızı ve beyaz kan hücreleri (alyuvarlar ve akyuvarlar) ile kanın pıhtılaşmasını sağlayan trombositler üretilmektedir. “Lösemi” ve “lenfoma (lenfosarkom)” terimleri kemik iliğinden üretilen beyaz kan hücrelerinde bulunan çok çeşitli lenfositlerden köken alan çeşitli kanserleri ve farklı işlevlere sahip miyeloid hücreleri tarif etmek için kullanılmaktadır (1). Lösemi terimi, kan ve kemik iliğinde ortaya çıkan neoplastik hücrelerin varlığında kullanılırken, lenfoma terimi ise diğer bölgelerden kaynaklanan lenfoid neoplaziyi ifade eder (2). Daha geniş bir ifade ile lösemi, kemik iliğindeki olgunlaşmamış beyaz kan hücrelerinin (WBC) tümörlü proliferasyonu veya artan yaşam süresi ile kendini

gösteren bir grup hematolojik maligniteyi tanımlar (3,4). Ayrıca lösemi, halk arasında kan kanseri olarak da bilinmektedir (5).

Dolaşımdaki şekilli elemanlar hematopoetik kök hücrelerden köken alır. Olgun kan hücreleri, “stem cell” (kök hücre) veya “progenitör hücre” adı verilen hücrelerden bir dizi karmaşık olayı içeren bölünme, farklılaşma ve olgunlaşma yoluyla meydana gelirler (6). Öncelikle, kök hücrelerden lenfoid ve miyeloid kök hücreleri oluşur. Bunlar kan hücrelerinin öncü hücreleridir (Tablo 1). Bu öncü hücreler (lenfoblast/miyeloblast) aşırı üretildiğinde lösemik hücreler olarak adlandırılır ve bunlar kemik iliğindeki sağlıklı lökositlerin üretimini baskılar. Böylece, normal hematopoezi engelleyerek enfeksiyonlarla mücadelede, oksijen taşınmasında ve kanamayı kontrol etmede aksaklıklara neden olur (4,7).

Tablo 1: Kök hücrelerden türeyen miyeloid ve lenfoid kök hücrelerin dönüşümü ile oluşan kanın şekilli elemanları

Miyeloid kök hücreler 4 tip kan hücresine dönüşür.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kırmızı Kan Hücreleri (Alyuvarlar/Eritrositler) 2. Megakaryositler <ul style="list-style-type: none"> - Trombositler (Kan Pulcukları) 3. Mast Hücreleri 4. Miyeloblastlar <ul style="list-style-type: none"> -Nötrofil^a -Eozinofil^a -Bazofil^a -Monositler^b <ul style="list-style-type: none"> -Makrofajlar -Dentrik hücreler
Lenfoid kök hücreler, beyaz kan hücrelerinden lenfositlere dönüşür.	<ol style="list-style-type: none"> 1. B-Lenfositler <ul style="list-style-type: none"> -Plazma hücreleri 2. T-Lenfositler 3. NK Hücreleri

^a: Granülosit, ^b:Agranülosit

2. Lösemilerin sınıflandırılması

Lösemiler, malignitenin geliştiği hücre kökenine göre miyeloid ve lenfoid olarak iki ana kategoriye ayrılır (Tablo 2). Ayrıca neoplastik hücre popülasyonu tarafından gösterilen hücre farklılaşmasının derecesine bağlı olarak da akut veya kronik olarak kategorize edilirler. Miyeloid lösemi veya miyeloproliferatif hastalıklar; genellikle eritrositler, granülositler, monositler ve megakaryositlerin meydana getirdiği hücrelerden köken alan neoplaziyi ifade eder. Lenfoid lösemi ise, genellikle T, B veya Naturel Killer (NK)

hücrelerinden kaynaklanan neoplazmaları ifade eder. Lenfoid lösemiler akut lenfoblastik ve kronik lenfositik lösemi olarak ikiye ayrılırken, kedi ve köpeklerdeki miyeloid neoplaziler için sınıflandırmada ortak bir görüş bulunmamaktadır. Akut lösemi formu hızla gelişir ve lösemik hücre sayısı hızla artar. Kronik lösemi ise yavaş ilerler ve daha olgun lökositler bazı normal işlevlerini yerine getirebilirler (4,8) (Tablo 3). Bu derlemede miyeloid neoplazilerin sınıflandırılması için Keleş ve ark.'nin (9) gruplandırması uygun sınıflandırma olarak görülmüştür.

Tablo 2: Lösemilerin sınıflandırılması (8)

Lenfoid Lösemiler

- Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)
- Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)

Non-Lenfoid (Miyeloid) Lösemiler

Akut Miyeloproliferatif Bozukluklar

- Akut Miyeloid Lösemi (AML)
- Akut Miyelomonositik Lösemi (AMML)
- Akut Megakaryoblastik Lösemi
- Akut Monositik Lösemi
- Eritrolösemi
- Akut Farklılaşmamış Lösemi

Kronik Miyoproliferatif Bozukluklar

- Kronik Miyeloid Lösemi
- Birincil/Esansiyel Trombositemi
- Bazofilik Lösemi
- Eozinofilik Lösemi
- Polisitemi Vera

3. Epidemiyoloji ve insidans

Her iki tip lenfoid lösemi de B, T veya NK hücre klonlarından kaynaklanabilir (10). İnsanlarda Kronik

lenfositik lösemi (KLL) vakalarının %95'ini B hücreli neoplazi oluşturur. Fakat köpeklerde KLL'de T hücreli neoplazi, B hücreli neoplaziden daha yaygındır (10,11). Köpeklerdeki Akut lenfoblastik lösemi (ALL) vakalarında

ise B hücreli neoplazi insidansının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. (10,12).

Köpeklerde lenfoid lösemisinin gerçek insidansı bilinmemekle birlikte, miyeloproliferatif hastalıklardan daha yaygın olduğu düşünülmektedir (13). Nitekim, akademik çalışmalarda lenfoid lösemisinin, köpeklerde en yaygın neoplazi türlerinden olduğu ve tüm köpek neoplazilerinin yaklaşık % 40'ını oluşturduğu belirtilmiştir (10,14).

Akut miyeloid lösemi (AML) nadir görülen bir hastalık olmakla birlikte, akut lösemili 69 köpekte yapılan bir akademik çalışmada, AML'nin ALL'den daha yüksek oranda olduğunu bildirmişlerdir (15). Birçok araştırmada, köpek lösemilerinde hücre tipi sadece morfolojiye dayanarak belirlendiğinden, köpeklerde farklı lösemilerin gerçek insidans oranları tam olarak belirlenememiştir (10,16).

Yapılan bir çalışmada, lösemisinin yıllık insidansının kediler için % 0,2243, köpekler için ise % 0.0305 olduğu bildirilmiştir (17). Yine, kedilerin, köpeklere göre 6.1 kat daha fazla malign lenfomaya ve 15.7 kat daha fazla miyeloproliferatif hastalığa yakalandığı rapor edilmiştir (17). Bir çalışmada AML teşhisi konulan köpeklerde ortalama yaş 8 (1.5-12 yaş) olarak bulunmuş ve erkeklerde daha çok görüldüğü tespit edilmiştir (16). Ayrıca, hem Golden Retriever hem de Alman çoban köpeklerinin daha sık etkilendiği görülmüştür. Bu hastalığın Golden Retriever ve Alman çoban köpeklerinde görülme sıklığının yüksek olmasının nedeninin, ırk yatkınlığının yanında, bu ırkların diğer ırklara göre daha çok sahiplenilmesi, dolayısıyla köpek popülasyonu içinde sayılarının daha fazla olması ile ilişkili olabileceğini de düşünülmektedir (1,13).

Köpeklerde lösemisinin nedenleri tam olarak ortaya konulamamıştır. Retrovirusların, kediler, sığırlar ve kuşlar da dâhil olmak üzere bazı hayvan türlerinde lenfoid lösemiye neden olduğu tespit edilmiştir. Fakat iki ayrı vaka raporu dışında Retrovirusların köpeklerde lösemojenik olduğu kanıtlanmamıştır (10).

4. Akut lenfoblastik lösemi (ALL)

Akut lenfositik lösemi (18) veya akut lenfoid lösemi (15) olarak da adlandırılan akut lenfoblastik lösemi (ALL); kemik iliği ve diğer lenfatik organlardan (lenf yumruları, lenf damarları, dalak, tonsiller ve payer plakları) köken alan olgunlaşmamış, farklılaşmasını yeterince tamamlamamış lenfositlerin (lenfoblastlar) progresif, kötü huylu infiltrasyonudur (19). Akut lösemiler tüm hematopoietik neoplazmaların yüzde 10'undan azını oluşturur (20). ALL, henüz olgunlaşmamış hücrelerden kaynaklanır ve morfolojik olarak büyük blast hücrelerine benzeyen hücrelerle karakterizedir (10).

ALL, çoğu genç ve orta yaşlı köpeklerde görülür (21). Yapılan bir çalışmada, ALL tanısı konulan köpeklerin 1-12 yaş aralığında olduğu ve ortalama yaşın 6.2 olduğu belirtilmiştir (19). Başka bir çalışmada ise ortalama yaş 8 olarak tespit edilmiştir (22). Yapılan bir çalışmada, Alman çoban köpekleri ve bazı büyük ve saf ırklarda hastalığın baskın olduğu belirtilmiştir (23). Cinsiyet, hastalık için belirleyici bir değişken değildir (24). Ancak, yapılan bir çalışmada, erkeklerin dişilerden 3/2 oranında hastalığa daha yatkın olduğu bildirilmiştir (10,20,25). Kedilerdeki ALL'nin etiolojisinde 2/3 oranında retrovirus familyasına ait Feline Leukemia Virus (FeLV) rol oynar ve hastalık genellikle genç yaşlarda görülür (20,24).

4.1. Etiyoloji

ALL'nin insanlarda ve köpeklerdeki etiyojisi, kapsamlı çalışmalara rağmen henüz tam olarak belirlenememiştir. Beşeri hekimlikte hastalıkla ilişkili kromozomal değişiklikler ve mutasyonların hamilelikten miras olabileceği veya bebeklik ve çocukluk döneminde gelişebileceği ve bu değişiklikler ve mutasyonların daha sonra en azından bazı ALL tiplerine yol açabilen belirli çevresel maruziyetlerle etkileşime girdiği belirlenmiştir (18). Radyasyon ve benzen maruziyetinin insanlarda ALL'ye neden olduğu belgelenmiştir. İyonlaştırıcı radyasyon, onkojenik virüsler ve çeşitli kimyasal maddelerin çeşitli hayvan türlerinde lösemojenik olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, klinik olarak hastalığın ortaya çıkması için tek bir olaydan ziyade genetik, doğuştan gelen ve çevresel nedenler dâhil olmak üzere bir dizi faktörün gerekli olduğu düşünülmektedir (19).

4.2. Patofizyoloji

Kemik iliği veya periferik kan, morfolojik olarak olgunlaşmamış prekürsör hücreleri içerir. Lenfoblast olarak adlandırılan bu hücrelerin aşırı üretimi, kemik iliğindeki normal hücrelerin yerini alarak karaciğer, lenf düğümleri, dalak ve merkezi sinir sistemi (MSS) gibi temel organlara yayılarak ALL'ye neden olurlar (2).

4.3. Klinik görünüm

ALL, hem hastalığın gelişmesi hem de hızı açısından ciddi klinik bulgularla ortaya çıkma eğilimindedir (20). Klinik belirtiler, bozulmuş hematopoez sonucu başlangıçta akut olarak gelişir (26). Uyuşukluk, anoreksi, kilo kaybı, kusma ve diyare gibi klinik belirtiler görülür (2,25). Daha az yaygın belirtiler arasında ateş, solunum stresi, nörolojik fonksiyon bozukluğu, poliüri ve polidipsi bulunur (10,27). ALL'li köpeklerin % 70'inden fazlasında splenomegali, % 50'sinde ise hepatomegali geliştiği tespit edilmiştir (10,14,25).

5. Kronik lenfositik lösemi (KLL)

Kronik lenfositik lösemi, sıklıkla şiddetli bir lenfositozis olarak ortaya çıkan, küçük, olgun görünümlü lenfositlerin

klonal, neoplastik bir proliferasyonudur (10,13,24). Ortalama 10 yaşındaki köpeklerde görülür. Cinsiyetin hastalığın gelişmesinde etkisi yoktur. Golden Retriever ve Alman çoban köpekleri hastalığa daha yatkındır. Kedilerde KLL ortalama 14 yaşlarında görülür fakat nadir görülen bir hastalıktır (24).

5.1. Etiyoloji

Etiyolojisi tam olarak bilinmemektedir.

5.2. Patofizyoloji

Neoplastik hücreler, normal hematopoez sürecinde kemik iliğinde çoğalır, kana yayılır ve periferik organlara (dalak, karaciğer, lenf düğümleri) infiltre olur (20).

5.3. Klinik görünüm

Kronik lösemide hafif veya tekrarlayan klinik belirtiler görülebilir ve bazı vakalar asemptomatik olabilir. En sık görülen belirtiler; uyuşukluk, iştahsızlık, poliüri, polidipsi ve kusmadır (20,28).

WBC sayımında genellikle morfolojik olarak normal görünebilen ancak işlevsel olarak anormal olabilen olgun lenfositlerde belirgin bir artış söz konusudur. Aynı zamanda hafif anemi, trombositopeni ve nötropeni görülebilir. Semptomların şiddeti ve hematolojik anormallikler, hastalığın seyri süresince artabilir. Monoklonal gammopati, hemolitik anemi, saf eritrosit aplazisi ve bazı durumlarda hiperkalsemi, KLL ile ilişkili paraneoplastik sendromlardır (28). Asemptomatik köpekler dâhil çoğu KLL hastasında splenomegali ve daha az sıklıkla hepatomegali görülebilir (11,24,29).

6. Akut miyeloid lösemi (AML)

AML, kemik iliğinde olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin birikmesi ile karakterize hematopoetik bir hastalık olmakla

birlikte nadir görülen ve hızlı ilerleyen bir neoplazmdır (16). Görülme yaşı değişkendir. Retrospektif çalışmalar, Alman çoban köpekleri, Golden Retriever ve Labrador Retriever ırklarında hastalığın insidansının yüksek olduğunu göstermektedir (24). Erkekler dişilerden daha çok AML riski taşır ve büyük ırk köpekler hastalığa daha yatkındır (23,24).

6.1. Etiyoloji

Köpeklerde AML'nin etiyolojisi, diğer miyeloid neoplazmalarda olduğu gibi tam olarak bilinmemektedir. Hastalığın gelişiminde radyasyona, ilaçlara veya toksik kimyasallara maruz kalma gibi çeşitli çevresel faktörlerin yanı sıra genetik faktörlerin de rol oynadığı düşünülmektedir. Köpeklerde genetik faktörleri tanımlamak zordur. Çünkü, köpek karyotipleme, kromozomların çok sayıda olması ve morfolojik benzerlikleri nedeniyle zorlu bir süreçtir (24).

6.2. Patofizyoloji

AML; kontrolsüz çoğalan veya olgunlaşmayan hücrelerin azalmış apoptozundan kaynaklı, yetersiz şekilde farklılaşmış miyeloid ve blast hücrelerinin birikmesine yol açan bir bozukluktur. Bu hastalık, iyi farklılaşmış hücrelerin birikmesine yol açan, eksik/kusurlu olgunlaşma sergileyen hücrelerin düzensiz çoğalmasından kaynaklanan diğer miyeloid neoplazmalardan farklıdır (24).

6.3. Klinik görünüm

AML'nin klinik seyri hızlıdır. Yaygın klinik belirtiler; aşırı uyuşukluk, sekonder enfeksiyon ve kanamadır. Ayrıca iştahsızlık, periferik lenfadenopati ve taşipne görülebilir (16). Anemi, nötropeni ve trombositopeni de yaygındır. Dalak, lenf düğümleri ve karaciğer sıklıkla etkilenir, ancak kalp, böbrek veya merkezi sinir sistemi (MSS) gibi diğer bölgelere de infiltre olabilir (24).

Tablo 3: Lösemilerin özellikleri (8)

Lösemi Tipleri	Hücre Dizisi	Özellikleri	Tedavi	Prognoz
ALL	➤ Olgunlaşmamış Lenfoblastlar	➤ Tedaviye yanıt zayıf ➤ Progresif klinik seyirli ➤ Kan ve kemik iliğinin sitolojik değerlendirmesi gerekli	➤ Agresif Kemoterapi	➤ Elverişsiz
KLL	➤ Olgun lenfositler	➤ Yavaş klinik seyirli ➤ Bazen asemptomatik ➤ Kan ve kemik iliğinin sitolojik değerlendirmesi gerekli	➤ Klorambucil (Prednizon ile birlikte)	➤ İhtiyatlı
AML	➤ Olgunlaşmamış Miyeloblastlar	➤ Hızlı klinik dönem ➤ İmmünofenotipik ve immünohistokimyasal tanı gerekli	➤ Agresif Kemoterapi ➤ Destekleyici bakım	➤ Elverişsiz

7. Teşhis

Lösemili hayvanlarda bariz bir tümör kitlesi veya yumru tespit edilemez, bunun yerine uyuşukluk, halsizlik, iştahsızlık, kilo kaybı gibi hastalığa spesifik olmayan klinik belirtiler gösterirler (Tablo 4). Bu nedenle hastalığın teşhisi için bir dizi klinik ve laboratuvar analizlerinin yapılması gereklidir (20).

Rutin hematolojik muayene lösemilerin ilk teşhis basamağıdır ve lenfoid lösemili hastalarda lenfositoz en yaygın görülebilen anormalliktir. Lenfosit sayıları 6.000-100.000/μl arasında değişebilir. ALL hastalarında lökositoz genellikle dolaşımdaki neoplastik lenfositlerden kaynaklanır (4.000-100.000/μl) ve aşırı durumlarda lenfosit sayıları 500.000/μl'yi geçebilir (10). KLL'de hafif veya belirgin lenfositoz (6000-100.000 lenfosit/μL) görülebilir (10,24).

AML'de ise yaygın olarak WBC sayısı 150.000/μl'ye kadar yükselebilir ve bunun yanında anemi nötropeni ve trombositopeni de yaygındır (24). Davis ve ark.'ları (16) 2018 yılında 35 köpekte yaptıkları retrospektif bir çalışmada WBC sayısını ortanca değer olarak 49.7x10⁹/μl, aralığını ise 0.6-285.7x10⁹/μl olduğunu bildirmişlerdir.

Biyokimyasal değerlendirmede, lenfoid lösemi vakalarında hiperkalsemi, miyelomlu veya KLL'li hayvanlarda hiperproteinemi veya akut lösemili hastalarda neoplastik infiltrasyona bağlı organ yetmezliği gibi paraneoplastik komplikasyonlar da tespit edilebilir (20). Radyografi ve ultrasonografi, olası neoplastik oluşumları ve metastatik yayılımı tespit etmek için kullanılabilir. Özellikle karaciğer, dalak ve akciğerlerdeki muhtemel neoplastik infiltrasyonu değerlendirmek için endikedirler (20).

Tablo 4: Lösemi teşhis basamakları (19)

Rutin Hematoloji	➤ Sitopeni (Non-rejeneratif anemi, nötropeni, trombositopeni) ➤ Lökopeni ➤ Anormal hücre morfolojisi
Serum Biyokimya	➤ Hiperkalsemi ➤ Hipergamaglobulinemi ➤ Böbrek yetmezliği ➤ Karaciğer Yetmezliği
İdrar Tahlili	➤ Düşük spesifik gravite ➤ İdrar yolu enfeksiyonu
Pıhtılaşma Profili	➤ Dissemine İntravasküler Koagülopati (DIC)
Kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi	➤ Lenfoblast ve miyeloblast kök hücrelerinin tespiti ve lösemilerin sınıflandırılması
Diyagnostik Görüntüleme	➤ Etkilenen organ/organların teşhisi ve metastazın belirlenmesi
İmmunofenotiplendirme	➤ Lösemilerin sınıflandırılması

Lösemik hücrelerin tanımlanması ve morfolojik sınıflandırılması ALL tanısında ilk adımdır (26). ALL'de lenfositik lenfoblastlar çok hızlı ve kontrolsüz olarak çoğalırlar ve normal bağışıklık tepkisi oluşturamazlar. Normal kemik iliği hücrelerinin üretiminde bir düşüşe neden olup, dolaşımdaki kırmızı kan hücreleri (nonrejeneratif anemi), trombositler (trombositopeni) ve beyaz kan hücrelerinden özellikle nötrofillerde (nötropeni) eksikliğe neden olurlar ve nadiren monoklonal gamopati görülür (18,28). Kemik iliğinin yoğun infiltrasyonu ve yıkımı, miyelosupresyona ve sonunda miyelofitizise yol açarak şiddetli anemi, trombositopeni ve nötropeniye neden olur (28).

Hayvanlarda akut miyeloid ve akut lenfoid lösemiye ayırt etmek için lökositlerdeki enzim aktivitesini belirlemek amacıyla sitokimyasal boyalar kullanılmıştır. Miyeloid hücrelerde genellikle miyeloperoksidaz (MPx), kloroasetat esteraz (CAE) ve anaftil butirat esteraz (ANBE) gibi enzim aktiviteleri ekspres edilir. Zira, bu enzimler lenfoid hücrelerde bulunmazlar (15). Beşeri hekimlikte insan lösemilerinin sınıflandırılması için altın standart olarak flow

sitometri ile immünofenotipleme uygulanmaktadır. İnsanlarda miyeloid ve lenfoid lösemileri ayırt etmek için kullanılan flow sitometrinin doğruluğu günümüzde %98'e yaklaşmaktadır. Anormal hücre morfolojisi ve boyamanın, genellikle doğru sınıflandırmayı engellediği için bu sınıflandırmaya dayalı veriler güvenilir olmayabilir. İmmünofenotipleme, lösemilerin sınıflandırılmasında veteriner hekimliği için de altın standarttır (22) ve köpeklerde giderek daha fazla kullanılmaktadır (26).

Köpeklerin lenfoid ve miyeloid kaynaklı akut lösemileri, klinik bulguları, sitolojik görünimleri ve immünofenotipleri ile tanımlanır. Tanı en sık periferik kanda yapılır. KLL'de genellikle periferik kandaki benzer hücreler ile beraber, kemik iliğindeki küçük lenfositlerin >% 30 olmasına dayanılarak teşhis konulur (20). AML'de ise flow sitometrik immünofenotipleme ve sitokimyasal boyamaya dayalı olarak kemik iliği veya periferik kanda miyeloblast sayısı > % 20 olduğunda teşhis konulur (16). ALL'deki blast sayısı AML ile benzerdir. Hücre morfolojisinin değerlendirilmesi, ikisi arasında ayırım yapılmasına yardımcı olabilir. Kesin tanı için MPx ve spesifik olmayan enzimler (CAE ve

ANBE) gibi sitokimyasal boyaların kullanımına veya immunofenotiplendirmeye gerek duyulur (20). Ancak son zamanlarda moleküler sitogenetik analizdeki ilerlemeler, insan AML'sine benzer köpek kromozomal anormalliklerinin keşfedilmesine yardımcı olmuştur ve bunlar yalnızca teşhis ve prognoz olarak değil, aynı zamanda tedavi hedeflerine de yardımcı olabilir (24).

8. Tedavi

Tedavinin amacı lösemik hücreleri yok etmek ve normal hematopoezin yeniden başlamasını sağlamaktır. Akut lösemi formlarında tedavi agresif olmalıdır. Başta CHOP (Tablo 5) tabanlı (siklofosfamid, doksorubisin, vinkristin, prednizon) olmak üzere standart lenfoma protokolleri, agresif maligniteler için mevcut tedavi standardıdır ve veteriner onkoloji alanında yaygın olarak kullanılan protokollerdendir (Tablo 6) (1,24). Özellikle ALL'li hayvanlar için doksorubisin (1 mg/kg, serum fizyolojik veya %5 dekstroz içerisinde, 3 haftada 1 kez, IV yolla) içeren ilaçların kullanımı önerilmektedir. KLL'li hayvanlar için klorambusil (2-8 mg/m², günde 1 kez, 7-14 gün süre ile, ağız yoluyla, daha sonra 20 mg/m², 2 haftada 1 kez, tek doz, ağız yoluyla)

ve prednizon (40 mg/m², günde 1 kez, 7 gün süre ile, ağız yoluyla, daha sonra 20 mg/m², 48 saate 1 kez) uygulaması tavsiye edilmektedir. AML vakalarında ise antrasiklinlerle (doksorubisin, epirubisin vb.) beraber sitozin arabinosit (50 mg/m², günde 2 kez, 2 gün süre ile, deri altı yolla) sıklıkla uygulanır. Fakat, bu kemoterapi protokollerine AML nadiren yanıt verir (20,24).

Köpeklerdeki AML'nin nadir görülmesi nedeniyle etkili bir kemoterapötik tedavi protokolü tanımlanmamıştır. AML için diğer lösemi formlarında olduğu gibi hematopoetik kök hücre transplantasyonu (HSCT) uygulanabilir bir tedavi seçeneğidir. Bunun yanında tedavi, hastalığın hızlı ilerlemesi nedeniyle genellikle sitozin arabinosid, doksorubisin, vinkristin ve siklofosfamid gibi ilaçlarla sınırlıdır. Yoğun destekleyici bakım gereklidir ve kan ve/veya trombosit açısından zengin plazma infüzyonunun yanı sıra sekonder enfeksiyonlar için agresif antibiyotik tedavisi uygulanabilir. Ayrıca hiperkalsemi ve hipergammaglobulinemi gibi paraneoplastik komplikasyonlar da dikkate alınmalıdır (20,24).

Tablo 5: Köpeklerde lösemi tedavisinde kullanılan ilaçlar ve tedavi dozları

Akut lenfoblastik lösemi	➤ Siklofosfamid, doksorubisin, vincristin, prednisolon	Siklofosfamid: 50-100 mg/m ² , PO, SID, 4-7 gün veya 50 mg/m ² , PO, SID veya iki günde bir, haftalık total doz 200-300 mg/m ² 'yi geçmeyecek şekilde (Köpeklerde 200 mg/m ² IV dozunda haftada bir)
	➤ (CHOP) tabanlı protokoller uygulanır (Agresif kemoterapi).	Doksorubisin: 1 mg/kg dozunda serum fizyolojik veya % 5 dekstrozun içerisinde, 3 haftada 1 kez yavaş IV uygulanır (Orta ve büyük ırk köpeklerde 240 mg/m ² dozunu aşmamak kaydı ile 30mg/m ² dozunda 6 uygulama şeklinde önerilmektedir).
	➤ Kemik iliği veya kök hücre nakli (Veteriner hekimliğinde nadiren uygulanmaktadır)	Vincristin: 0.5-0.75 mg/m ² , IV, hafta 1 kez Prednisolon: 2 mg/kg, PO, SID, haftalık olarak doz azaltılır.
Kronik lenfositik lösemi	➤ Klorambusil	Klorambusil: 2 ila 8 mg/m ² , PO, 7-14 gün, SID, ardından 2 mg/m ² her 48 saate bir ^a veya 20 mg/m ² , PO, iki haftada bir kez, tek doz olarak
	➤ Prednizon	Prednizon: 40 mg/m ² , PO, yedi gün boyunca, SID, ardından her 48 saate bir 20 mg/m ²
Akut miyeloid lösemi	➤ Sitozin arabinosid, doksorubisin, vinkristin ve siklofosfamid	Sitozin Arabinosid (Sitarabin): Tek doz olarak uygulanacağı durumlarda haftada bir kez 600 mg/m ² IV dozda
	➤ Kan transfüzyonu	
	➤ Yoğun destekleyici bakım	

^a: 0.2 mg/kg, ağızdan, günde bir kez indüksiyon için ve 0.1 mg/kg, ağızdan, idame için günde bir kez

PO: ağızdan, IV: damar içi, SID: günde bir kez

Tablo 6: Wisconsin – Madison Üniversitesi Lenfoma CHOP-19 Protokolü

Haftalar	Tedavi
1.Hafta	Vincristin 0.5 – 0.7 mg/m ² , IV, Prednison 2 mg/kg, PO, SID
2.Hafta	Sitoksan 250 mg/m ² , PO, Furosemid 1 mg/kg, PO, Prednison 1.5 mg/kg, PO, SID
3.Hafta	Vincristin 0.5 – 0.7 mg/m ² , IV, Prednison 1 mg/kg, PO, SID
4.Hafta	Doksorubisin 30 mg/m ² , IV, Prednison 0.5 mg/kg, PO, SID
5.Hafta	Tedavi uygulaması yok
6.Hafta	Vincristin 0.5 – 0.7 mg/m ² , IV
7.Hafta	Sitoksan 250 mg/m ² , PO, Furosemide 1 mg/kg, PO
8.Hafta	Vincristin 0.5 – 0.7 mg/m ² , IV
9.Hafta	Doksorubisin 30 mg/m ² , IV
10.Hafta	Tedavi uygulaması yok
11.Hafta	Vincristin 0.5 – 0.7 mg/m ² , IV
12.Hafta	Sitoksan 250 mg/m ² , PO, Furosemid 1 mg/kg, PO
13.Hafta	Vincristin 0.5 – 0.7 mg/m ² , IV
14.Hafta	Doksorubisin 30 mg/m ² , IV
15.Hafta	Tedavi uygulaması yok
16.Hafta	Vincristin 0.5 – 0.7 mg/m ² , IV
17.Hafta	Sitoksan 250 mg/m ² , PO, Furosemide 1 mg/kg, PO
18.Hafta	Vincristin 0.5 – 0.7 mg/m ² , IV
19.Hafta	Doksorubisin 30 mg/m ² , IV

PO: ağızdan, IV: damar içi, SID: günde bir kez

9. Prognoz

Terapötik yanıtın düşük ve sağ kalım süresinin kısa olması nedeniyle prognoz kötüdür. Akut lösemi vakalarında, kronik lösemi vakalarından daha sık ve daha şiddetli sitopeni görüldüğü belirlenmiştir. Şiddetli nötropeni sonucunda gelişen septisemi, lösemide meydana gelen sitopeninin ölümcül olmasına sebep olabilir. Fakat HSCT uygulanan köpeklerde hayatta kalma süreleri uzundur. Kökeni ne olursa olsun, akut lösemisinin prognozu agresif kemoterapi ile bile kötüdür (16,30).

ALL ve AML için indüksiyon ve remisyonun sürdürülmesinin düşük oranlarda olması ve ilaçların sitotoksik etkilerini artıran organ yetmezliği ve sekonder septisemi nedeni ile prognoz kötüdür. ALL'nin prognozu AML'den daha iyidir fakat, ALL hastalarının % 20-40'ı genellikle 1 ila 3 ay arasında kısa bir hayatta kalma süresine sahiptir. AML teşhisi konulan hayvanların hayatta kalma süresi nadiren 3 ayı geçer (20). Öte yandan, tedavi ile 24 ay kadar hayatta kalan megakaryoblastik lösemi tanısı konmuş bir köpeğin vaka raporu mevcuttur. Bu nedenle tüm AML'ler hızla ölümcül olan bir hastalık olmayabilir. Hastalığı doğrulanmış 16 köpekte yapılan bir çalışmada, AML teşhisi konulduktan sonra sağkalım ortalama 7 gün ve ortanca 20 gün (2-138 gün) olarak tespit edilmiştir (24).

10. Sonuç

Lösemi, insanlarda olduğu gibi, köpeklerde de görülebilen ve karmaşık bir patogeneze sahip, teşhis ve tedavi olanakları sınırlı, prognozu elverişsiz, veteriner sahada gün geçtikçe daha fazla karşılaşılabilecek hastalıklardan biri durumuna gelmiştir. Bu nedenle bu hastalığın meslektaşlarımız tarafından ana hatları ile tanınması ve yüzeysel de olsa teşhis ve tedavisi ile ilgili kısa ve öz bilgiler vermesi nedeniyle bu derlemenin faydalı olacağı kanaatine varılmıştır. Bu konuda ileriki yıllarda daha detaylı ve odaklanılmış çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

1. Avery AC. The genetic and molecular basis for canine models of human leukemia and lymphoma. *Frontiers in Oncology* 2020; 10: 23. doi: 10.3389/fonc.2020.00023.
2. Ağaoglu ZT, Başbuğ O. Hematolojik hastalıklar. Altuğ N. eds. In: Köpek ve Kedilerin Klinik Hekimliği. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2019; pp.734-744.
3. Desai B, Sollecito TP. Hematological disease. Patton LL. eds. In: The ADA Practical Guide to Patients with Medical Conditions. New York, NY: John Wiley & Sons, 2012; pp.143-171.
4. Bodzas A, Kodytek P, Zidek J. Automated detection of acute lymphoblastic leukemia from microscopic images based on human visual perception. *Frontiers Bioengineering and Biotechnology* 2020; 8: 1005. doi: 10.3389/fbioe.2020.01005.
5. Atıcı E. Tıp tarihinde kanser ve lösemi. *Türk Onkoloji Dergisi* 2007; 22: 197-204.
6. Özkalemkaş F. Nedir bu hematopoetik kök hücre? XXX. Ulusal Hematoloji Kongresi, III. Hematoloji İlk Basamak Kursu. Ekim, 10-14, 2013; İstanbul-Türkiye.

7. Daniels R, Nicoll LH. Hematological dysfunction: nursing management. Daniels R, Nicoll LH. eds. In: Contemporary Medical Surgical Nursing. New York, NY: Delmar, Cengage Learning, 2012; pp.752-779.
8. Serfontein W. Cancer Diagnosed: What Now? Second Edition. Bloomington: Xlibris, 2011.
9. Keleş İ, Çiğil M, Güneş V. Küçük Hayvanlarda Laboratuvar Testlerinin Yorumlanması ve Ayırıcı Tanı İçin Pratik Rehber, Hematoloji ve Biyokimya. Birinci Baskı. Kayseri: Verda Yayıncılık, 2020; pp.38-39.
10. Presley RH, Mackin A, Vernau W. Lymphoid leukemia in dogs. Compendium 2006; 28: 831-849.
11. Vernau W, Moore PF. An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. Veterinary Immunology and Immunopathology 1999; 69: 145-164. doi: 10.1016/s0165-2427(99)00051-3.
12. Moore PF, Vernau W. Immunophenotyping in the dog. Bonagura Jd. eds. Kirk's Current Veterinary Therapy. Philadelphia: WB Saunders, 2000, pp.505-509.
13. Workman HC, Vernau W. Chronic lymphocytic leukemia in dogs and cats: the veterinary perspective. The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practise 2003; 33: 1379-1399. doi: 10.1016/s0195-5616(03)00120-7.
14. Couto CG. Leukemias. Couto CG. eds. Small Animal Internal Medicine. St. Louis: Mosby, 2003; pp.1134-1138.
15. Stokol T, Schaefer DM, Shuman M, Belcher N, Dong L. Alkaline phosphatase is a useful cytochemical marker for the diagnosis of acute myelomonocytic and monocytic leukemia in the dog. Veterinary Clinical Pathology 2015; 44: 79-93. doi: 10.1111/vcp.12227.
16. Davis LL, Hume KR, Stokol T. A retrospective review of acute myeloid leukaemia in 35 dogs diagnosed by a combination of morphologic findings, flow cytometric immunophenotyping and cytochemical staining results (2007-2015). Veterinary and Comparative Oncology 2018; 16: 268-275. doi: 10.1111/vco.12377.
17. Schneider R. Comparison of age-and sex-specific incidence rate patterns of the leukemia complex in the cat and the dog. Journal of the National Cancer Institute 1983; 70: 971-977.
18. Wartenberg D, Groves FD, Adelman AS. Acute lymphoblastic leukemia: epidemiology and etiology. Estey EH. eds. In Acute leukemias. Berlin, Heidelberg: Springer, 2008; pp.77-93.
19. Leifer CE, Matus RE. Lymphoid leukemia in the dog: Acute lymphoblastic leukemia and chronic lymphocytic leukemia. The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practise 1985; 15: 723-739. doi: 10.1016/s0195-5616(85)50032-7.
20. Dobson J, Villiers E, Morris J. Diagnosis and management of leukaemia in dogs and cats. In Practice 2006; 28: 22-31. doi: 10.1136/inpract.28.1.22.
21. Morris J, Dobson J. Haematopoietic system. Morris J. eds. In: Small Animal Oncology. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2001; pp. 239-245.
22. Adam F, Villiers E, Watson S, Coyne K, Blackwood L. Clinical pathological and epidemiological assessment of morphologically and immunologically confirmed canine leukaemia. Veterinary and Comparative Oncology 2009; 7: 181-195. doi: 10.1111/j.1476-5829.2009.00189.x.
23. Tasca S, Carli E, Caldin M, Menegazzo L, Furlanello T, et al. Hematologic abnormalities and flow cytometric immunophenotyping results in dogs with hematopoietic neoplasia: 210 cases (2002–2006). Veterinary Clinical Pathology 2009; 38: 2-12. doi: 10.1111/j.1939-165X.2008.00099.x.
24. Kozicki AR. Lymphoid Leukemias, Myeloid Neoplasia, and Myelodysplastic Syndrome. Bruyette D. eds. In: Clinical Small Animal Internal Medicine. First Edition. USA: Wiley-Blackwell, 2020; pp.1223-1230.
25. Matus RE, Leifer CE, MacEwen EG. Acute lymphoblastic leukemia in the dog: A review of 30 cases. Journal of the American Veterinary Medical Association 1983; 183: 859-862.
26. Bennett AL, Williams LE, Ferguson MW, Hauck ML, Suter SE, et al. Canine acute leukaemia: 50 cases (1989–2014). Veterinary and Comparative Oncology 2017; 15: 1101-1114. doi: 10.1111/vco.12251.
27. Mori T, Kadosawa T. Acute respiratory failure caused by leukemic infiltration of the lung of a dog. The Journal of Small Animal Practise 2001; 42: 349-351. doi: 10.1111/j.1748-5827.2001.tb02472.x.
28. Henrich M. Hematopoietic Tumors. Klopfeisch R. eds. In: Veterinary Oncology, A Short Textbook. Switzerland: Springer International Publishing, 2016; pp.110-116.
29. McDonough SP, Moore PF. Clinical, hematologic, and immunophenotypic characterization of canine large granular lymphocytosis. Veterinary Pathology 2000; 37: 637-646. doi: 10.1354/vp.37-6-637.
30. Novacco M, Comazzi S, Marconato L, Cozzi M, Stefanello D, et al. Prognostic factors in canine acute leukaemias: a retrospective study. Veterinary and Comparative Oncology 2016; 14: 409-416. doi: 10.1111/vco.12136.



Nörogenetik Hastalıklarda Alternatif Model Organizma: Köpekler*

 Sinan KANDIR¹✉

¹ Çukurova Üniversitesi, Ceyhan Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Adana/TÜRKİYE

◆ Geliş Tarihi/Received: 20.10.2021

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 05.11.2021

◆ Yayın Tarihi/Published: 31.12.2021

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Kandır S. Nörogenetik Hastalıklarda Alternatif Model Organizma: Köpekler. Bozok Vet Sci (2021) 2, (2):28-32.

Özet: Köpekler, evcilleştirilme serüvenlerinde insanla yalnızca davranışsal olarak yakınlaşmakla kalmamış, birçok hastalığı da birlikte yaşar hale gelmiştir. Biyomedikal araştırmalar için uzun süreli, pahalı ve çok kontrollü deney hayvanları modelleri oluşturulmaktadır. Bunun yerine doğal olarak hastalığa sahip köpeklerin etik ve deontolojik kurallar çerçevesinde diagnostik, prognostik ve terapötik olarak değerlendirilmesi hem insan hem de hayvan tıbbında genetik hastalıkların fizyopatolojik mekanizmalarının anlaşılmasını kolaylaştırarak, yeni gen ve hücre tedavisi seçeneklerine olanak sağlayacaktır. Bu derlemede, translasyonel araştırmalar yapmayı hedefleyen bilim insanlarına, köpeklerin insanlardaki ile benzer nörogenetik hastalıkları hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nöron, Genetik, Köpek genetiği, Translasyonel tıp

Alternative Model Organism in Neurogenetic Diseases: Dogs

Abstract: The human has not been intimated the dog as only a behavioral during its domestication journey, but also many diseases have become to live together. Long-term, expensive and highly controlled experimental animal models are created for biomedical research. Instead of this, the use of naturally diseased dogs in the framework of ethical and deontological rules will facilitate understanding the physiopathological mechanisms of genetic diseases in both human and animal medicine. Thus, new gene and cell therapy options will be enabled. In this review, was aimed to give information, whose desired to do translational research, about canine neurogenetic diseases likely as humans.

Keywords: Neuron, Genetic, Canine genetics, Translational medicine

1. Giriş

Köpeğillerin (*Canidae*) tarihçesi yaklaşık 60 milyon yıl öncesine kadar uzanmaktadır. Eosen dönemde, Miacis adı verilen ve gelinciğe benzeyen memelilerin, karnivor takımının atası olduğu düşünülmektedir. Miacis teorisine göre uzun yıllar sonunda, köpek benzeri *Cynodictis* adı verilen canlıdan ilk gerçek köpek evrimleşmiştir. Bu görüşü destekleyen en kuvvetli paleontolojik bulgunun, yaklaşık 40 milyon yaşındaki *Prohesperocyon wilsoni* (1986) cinsi fosil olduğu bildirilmektedir (1). İnsan tarafından evcilleştirilen ilk hayvan türlerinin başında gelen ve tarih boyunca insanoğlunun en yakın dostu olan evcil köpek (*Canis lupus familiaris*), 6400 ila 14000 yıl önce dünyanın farklı bölgelerinde farklı zaman dilimlerinde, bugün vahşi doğada halen yaşamlarını sürdüren ataları gri kurtlardan (*Canis lupus*) evcilleştirilmiştir (2, 3). Uluslararası Kinoloji Federasyonu (FCI) verilerine göre günümüzde 354 adet farklı köpek ırkı resmi olarak tanımlanmıştır (4).

İnsanoğlu anatomi ve fizyolojisi anlayabilmek, biyomedikal araştırmalar yapmak için yüzyıllardır deneysel olarak hayvanlardan faydalanmaktadır (5-8). Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü'ne layık görülen 109 ödülün 18'inde köpeklerden yararlanılmıştır (5). Modern köpek ırklarının gelişimi yaklaşık 200 yıldır süregelen yoğun yapay seleksiyona dayanmaktadır. Bu sebeple, kinoloji federasyonları tarafından tanımlanan her safkan köpek ırkı kendi içinde yüksek fenotipik homojenite ve düşük genetik çeşitliliğe sahiptir (9). Bu durum, ırk spesifik hastalıklarda artışa neden olmaktadır. Köpek genomu, sekansı tamamlanan beşinci memelidir (10). Köpek, insan genomundan daha az bir genoma sahip olsa da yaklaşık 14.000 adet genin insandaki ile 1:1 oranında ortolog olduğu belirlenmiştir (11). Evcilleştirilen köpekler de tıpkı insanlar gibi barınma, beslenme, sosyalleşme gibi gereksinimlere ihtiyaç duymaktadır.

Köpek ve insan, evcilleştirme süreci içerisinde otoimmün, nörolojik, kardiyovasküler ve kanser gibi birçok hastalığı da

✉: sinankandir@cu.edu.tr

*Bu çalışma 5. Adana Genetik Günleri Nörogenetik Sempozyumu'nda (23-24 Mart 2019/Adana) davetli konuşma olarak sunulmuştur.

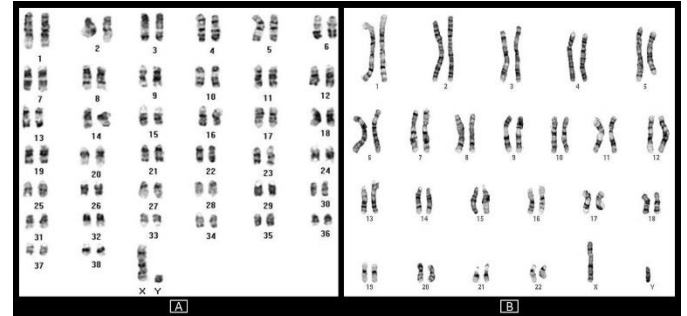
benzer patogenezi yaşamaya başlamıştır. Bu hastalık gruplarından birisi de nörogenetikdir. Nöroektoderm ve buna bağlı gelişen anatomik yapıların farklılaşması ve fonksiyonlarını bozan bir ya da daha fazla gende meydana gelen mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkan klinik tablo nörogenetik hastalıklar olarak tanımlanır (12, 13). Dünyada bilinen 200 civarında nörogenetik hastalık vardır, bu hastalıklar insanoğlu kadar köpeklerin sağlığında da önem arz etmekte ve her geçen gün tanımlanan nörogenetik hastalık sayısı artmaktadır. Bu derlemede, köpek genetiğinin insanla olan genetik benzeşimleri ele alınarak ortak fizyopatolojiye sahip bazı nörogenetik hastalıkların aktarılması amaçlanmıştır.

2. Köpek genetiği

İnsan genom projesi (1990-2003) (14, 15) ile birlikte birçok memeli canlının da genom haritasının çıkarılması hem evcil hayvan sağlığının biyoteknolojik gelişimi, hem de karşılaştırmalı olarak translasyonel araştırmalara yol göstermesi amacıyla başlatılmıştır. Genetik bilgi birikiminin artması, kompleks biyoinformatik analizlerin sürdürülmesini de sağlamıştır. Köpek genom analizi ile ilgili ilk çalışmalar 90'lı yıllar içerisinde dönemin teknolojisine uygun olarak yürütülmüştür. Mellersh ve ark. (16) tarafından genetik bağlantı haritalama yöntemi kullanılarak, üç nesil pedigrili 17 köpeğe ait 150 mikrosatelit belirtecin incelendiği araştırma ile köpek genom haritasının ilk parçaları oluşmaya başlamıştır. Uzun yıllardır devam eden Köpek Genom Projesi kapsamında, Lindblad-Toh ve ark. (11) tarafından dişi Boxer ırkı bir köpeğe ait ilk yüksek kaliteli genetik harita (7.5x) yayımlanmıştır. Dünya genelinden köpek genetiği uzmanları Dog10K adı altında 2015 yılında Uluslararası Köpek Genom Sekanslama Konsorsiyumunu (International Consortium of Canine Genome Sequencing) oluşturmuştur. Bu konsorsiyumun başlıca amaçları, köpekgiller ailesinden 10000 üyenin tüm genom analizini tamamlayarak hali hazırda araştırmacıların kullanmış olduğu Boxer ırkına ait genom bilgisine yeni referans genomlar eklemek, yüksek kaliteli (20x) genom haritası oluşturarak ırklar ve türler arası karşılaştırmalı köpek genom haritasının ortaya koymaktır (17, 18).

İnsan 22 çift otozomal ve iki cinsiyet kromozomundan oluşan toplam 46 çift, köpek genomu ise 38 çift otozomal ve iki cinsiyet olmak üzere toplam 78 kromozoma sahiptir (Şekil 1) (19-21). Köpek genomu 2.41 giga baz (Gb) büyüklüğü ile 2.91 Gb'lık insan genomundan daha küçük kalmaktadır (22-24). Kirkness ve ark. (26) tarafından köpek (1.5x) ve insan genomik fragmentlerinin karşılaştırıldığı çalışmada, kodlayan bölge sekansında %61 oranında uyum bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu oran fare (*Mus musculus*) de yaklaşık %77'dir. Ancak, transkripsiyon düzeyinde insan genomu ile birebir örtüşen fare genomundaki %80'lik (29,529 transkript) oran, köpek genomu ile karşılaştırıldığında %96'ya (29,673 transkript) çıkmaktadır.

Köpek, insan ve fare arasındaki bu farkın evrimsel olarak soyların ayrışmasında homolog genlerin kaybolması sebebiyle olabileceği vurgulanmıştır (26). Bu görüşü, filogenetik çalışmaları da desteklemektedir. İnsan ve köpek arasındaki karşılaştırma, insan genomunun %5.3'ünün her iki soyda da saflaştırma seçimi altında olan fonksiyonel elementleri içerdiğini göstermektedir. Fareler hariç olmak üzere bu elementlerin tümü memelilerde ortak bir fonksiyonel elementler kümesini temsil etmektedir (11). İnsan, köpek ve fare nükleer genomunda gerçekleştirilen detaylı filogenomik analiz sonucunda, fare hariç olmak üzere insan ve köpeğin güçlü akrabalık bağı olduğunu, ilaveten rat, şempanze, makak, inek gibi farklı türlerin analize dahilinde filogenetik ağacın topolojisinin etkilemediği bildirilmiştir (27). Elde edilen bu veriler, evcilleştirme, davranış ve hastalıklar gibi pek çok açıdan değerlendirilebilir.



Şekil 1: (A) Köpek ve (B) insan karyogramı (20, 26).

3. Köpeklerin nörogenetik hastalıkları

Hayvanlarda Çevrimiçi Mendelyan Kalıtsal Hastalıklar (Online Mendelian Inheritance in Animals / OMIA) veritabanına göre 2021 yılı itibarıyla köpeklerde toplamda 819 adet tanımlanan kalıtsal hastalığın 452'si Çevrimiçi Mendelyan Kalıtsal Hastalıklar (Online Mendelian Inheritance in Man / OMIM) veritabanındaki kalıtsal insan hastalıklarına potansiyel model olarak bildirilmiştir (28, 29, 30). Köpek ve insanlarda ortak görülen kalıtsal hastalıkların (çeşitli kanser tipleri, kan, kardiyovasküler, üriner, reproduktif, endokrin, musküler, respiratorik, dermatolojik, otoimmün ya da nörolojik hastalıklar) benzer fizyopatolojiye sahip olduğu bilinmektedir (23, 31). Köpeklerde görülen ve tablo 1. de sunulan bazı nörogenetik hastalıklar kalıtsal kökenlidir. Bu hastalıkların çoğu otozomal resesif karakterde olup ırk spesifitesine sahiptir.

İnsanlarda özellikle çocukluk döneminde sık görülen X-bağlı musküler distrofilerinden biri olan Duchenne Musküler Distrofi (DMD); X kromozomunun Xp21.2 lokusunda yer alan 79 ekzondan oluşan distrofin geninde meydana gelen delesyon, duplikasyon, insersiyon veya nonsense mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (32). İnsanlardakine benzer distrofin mutasyonuna sahip transgenik mdx fare modelleri en çok kullanılan hayvan

modeli olmasına karşın, insanlardakinin aksine genç dönemde dilate kardiyomiyopati gelişmemesi bakımından, hastalığın patogenezi insana göre hafif kalmaktadır. Bu durum, elde edilen bulguları translayonel aşamada sınırlamaktadır (33, 34). Golden Retriever, Cavalier King Spaniel, Irish Terrier, Alman Kısa Tüylü Pointer gibi köpek ırklarında Canine X-bağlı müsküler distrofiler doğal yollarla var olabildiği gibi deneysel olarak da oluşturulabilmekte, insan ile benzer patogeneze ve klinik bulgular görülmektedir (33, 35-37).

Tablo 1: Köpeklerde görülen bazı nörojenetik hastalıklar ve model olabileceği insan hastalıkları (32)

Köpeklerde kalıtsal nörolojik hastalıklar	İnsanlarda model olabilecek hastalıklar
Serebellar atrofi (ataksi)	Serebellar atrofi / Serebellar dejenerasyon
Serebellar hipoplazi	Serebellar hipoplazi
Servikal spondilomiyelopati (Wobbler sendromu)	Servikal spondilolitik miyelopati
Chiari benzeri malformasyon (CM) ve syringomyelia (SM)	Chiari benzeri malformasyon (CM) ve syringomyelia (SM)
Sağırlık	Sağırlık
Canine dejeneratif miyelopati (CDM)	Amiyotrofik Lateral Sklerozis (ALS)
Globoid hücreli lökodistrofi (galaktoserebrosidoz / Krabbe)	Globoid hücreli lökodistrofi (galaktoserebrosidoz / Krabbe)
Kalıtsal miyopati - Labrador retriever / Bouviers des Flandres miyopati	Miyopati
Hidrosefali	Hidrosefali
Hipo / dismyelinogenez ("titreyen yavru")	Otizm Spektrum Bozuklukları
İdiyopatik epilepsi	İdiyopatik epilepsi
Laringeal Paralizi	Laringeal Paralizi
Lökodistrofiler	Lökodistrofiler
Lizensefali	Lizensefali
Lizozomal depo hastalıkları	Lizozomal depo hastalıkları
Menenjit	Menenjit
Myastenia gravis (MG)	Myastenia gravis
Miyelodisplazi (spinal disrafizm)	Miyelodisplazi (spinal disrafizm)
Miyotoni	Miyotoni
Nöroaksonal distrofi	Nöroaksonal distrofi
Periferik nöropatiler	Periferik nöropatiler
Epileptoid kramp sendromu	Paroksizmal nonkineziyojenik diskinezi
Spina bifida	Spina bifida
Spinal müsküler atrofi / motor nöron hastalıkları	Spinal müsküler atrofi / motor nöron hastalıkları
Spinal stenoz (kauda ekina sendromu ile ilişkili)	Spinal stenoz
X'e bağlı müsküler distrofiler	X'e bağlı müsküler distrofiler

Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS), motor nöronlarda dejenerasyon ile karakterize ölümcül bir hastalıktır. ALS hastalığının fizyopatolojisinde kalıtsal yatkınlık yaklaşık %10-20 civarındadır. Hastalığın etiolojisinde süperoksit dismutaz 1 (SOD1) ve C9ORF72 genlerinde meydana gelen mutasyonlar başlıca rol oynamaktadır (38, 39). Çoğunlukla transgenik model olarak zebra balığı, fare, rat gibi deney

hayvanları ile translayonel çalışmalar yürütülmeye çalışılsa da hastalığın insanlardaki ile aynı patogeneze gerçekleşmemesi özellikle farmakolojik araştırmalarda dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır (40). Canine Dejeneratif Miyelopati (CDM), birçok ırkta karşılaşılabilen, üst motor nöronun spastik paraparezi ve arka bacakta genel proprioseptif ataksi ile başlayan ve alt motor nöronlara sirayet eden tetraparezis ile karakterize, nörodejeneratif bir hastalıktır. Son çalışmalar, köpeklerdeki CDM'nin de SOD1 genindeki yanlış anlamlı (missense) mutasyona bağlı olarak şekillendiğini göstermektedir (41, 42). CDM hastalığı fizyopatolojik olarak ALS ile oldukça benzerdir. Bu sebeple, ALS hastalığı için yürütülen translayonel araştırmalar ve yeni biyoteknolojik tedavi stratejileri CDM hastalığına sahip köpekler ile geliştirilmektedir (43, 44).

Otoimmün nöromusküler kavşak hastalığı olan Myasthenia Gravis (MG) araştırmalarında tavşan, rat ve sıçanlardan faydalanılmaktadır (45). İnsan ve hayvanlarda aynı fizyopatolojik özelliğe sahip, nöromusküler kavşak hastalığı olan MG kaslarda çabuk yorulma, güç kaybı ve megaözofagus ile karakterizedir. Etiyopatolojisinde nikotinik asetil kolin reseptörlerinin fonksiyonel bozukluğu veya yokluğu olmakla birlikte, otoimmün hastalıklarla bağlantılı olarak görülebilmektedir. Nitekim, ilerleyen yaşlarda T-lenfosit olgunlaşmasından sorumlu timus bezlerinde meydana gelen tümörlerle myasthenia gravis sendromu arasında sıkı bir ilişki bulunduğu bildirilmektedir (46-48).

Yine sık görülen kalıtsal demiyelinizan nöropatilerden birisi olan Charcot-Marie-Tooth (CMT) hastalığı, güncel çalışmalar ışığında Leonberger, Siyah Rus Terrier, Cocker Spaniel, Podhale (Tatra) Çoban Köpeği ve Minyatür Schnauzer ırkları arasında da varlığı ortaya konmuş ve insanlardaki ile benzer klinik tabloların ortaya çıktığı bildirilmiştir (49). CMT hastalığının birçok farklı alt tipi bulunmaktadır, Minyatür Schnauzer ırkı bir köpekte CMT4B2 alt tipinin 21. kromozomda bulunan SBF2/MTMR13 (SET-binding factor 2 / myotubularin-related protein-13) geninin 19. ekzonunda meydana gelen varyasyondan kaynaklandığı ortaya konmuştur (50). İnsanda da CMT4B2 hastalığında SBF2/MTMR13 genindeki varyasyonların sebep olduğu bilinmektedir (51, 52).

4. Sonuç

Veteriner hekimliğinde, tıp hekimliğine kıyasla nörojenetik hastalıkların tanısı daha zor konulmakta ve hayvanların yaşam kalitesi olumsuz etkilenmektedir. Bu süre zarfında birçok hasta çeşitli sebeplerle kaybedilebilmekte ya da sokağa terk edilebilmektedir. Veteriner hekimler, güncel biyoteknolojik gelişmeler karşısında hayvan ve insan sağlığına yapmış oldukları katkılara yenilerini eklemek için tam donanımlı olmalıdır. Köpeklerin, gerek sergiledikleri fiziksel ve davranışsal paternler, gerekse morfolojik ve

fizyolojik özellikleri nedeniyle sıçan, fare, tavşan, zebra balığı gibi model organizmalara kıyasla daha çok insana benzemeleri, onları genetik çalışmalarda ön sıralara taşımaktadır. Irklar arası görülen yüksek genetik çeşitliliğin, ırk içinde görülmemesi, hastalıkların genetik temellerini kavrama açısından büyük önem arz etmektedir.

Bu bağlamda, etik kurallar çerçevesinde köpek ve insanlarda görülen nörojenetik hastalıkların fizyopatolojik mekanizmalarını anlama, yeni gen ve hücrel tedavi protokolleri geliştirme ve farmakolojik ajan uygulamaları için köpekler sahip oldukları doğal hastalıklar yolu ile iyi birer model organizmadır. Veteriner hekimler ve tıp hekimlerinin oluşturacağı bir konsorsiyum ile klinik araştırmalar için ülkemizde hızlı ve yeni biyomedikal araştırma ve ürün geliştirme dönemi başlatılabileceği kanaatindeyiz.

Teşekkür

Derlemenin tam metin yazımında değerli katkılar sunan Prof. Dr. Ayşe Filiz KOÇ ve Prof. Dr. Handan Hilal YAVUZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Kaynaklar

- Wang X, Tedford RH. Dogs: Their Fossil Relatives and Evolutionary History. USA: Columbia University Press, 2008; p.219.
- Botigue LR, Song S, Scheu A, Gopalan S, Pendleton AL, et al. Ancient European dog genomes reveal continuity since the Early Neolithic. *Nature Communications* 2017; 8:16082. doi: 10.1038/ncomms16082.
- Frantz LA, Mullin VE, Pionnier-Capitan M, Lebrasseur O, Ollivier M et al. Genomic and archaeological evidence suggest a dual origin of domestic dogs. *Science* 2016; 352:6290:1228-1231. doi: 10.1126/science.aaf3161.
- Hedhammar ÅA, Indrebø A. Rules, regulations, strategies and activities within the Fédération Cynologique Internationale (FCI) to promote canine genetic health. *The Veterinary Journal* 2011; 189:2:141-146. doi:10.1016/j.tvjl.2011.06.011.
- Franco NH. Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. *Animals (Basel)* 2013; 3:1:238-273. doi: 10.3390/ani3010238.
- Kandır S, Keskin E. Serum IL-1 beta, IL-6, IL-10 and TNF-alpha Levels in Thyroidectomized Rats. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2016; 22:2:297-300. doi: 10.9775/kvfd.2015.14371.
- Kandır S, Keskin E. Effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on hematological parameters in rats. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2016; 63:4:371-376. doi: 10.1501/Vetfak_0000002755.
- Kandır S, Er C, Karakurt S. Pre- and post-exercise ADAMTS-4 and ADAMTS-5 Levels in Concur Horses. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2020; 13:2:99-103. doi: 10.47027/duvetfd.738477.
- Hytonen MK, Lohi H. Canine models of human rare disorders. *Rare Dis* 2016; 4:1:e1241362. doi: 10.1080/21675511.2016.1241362.
- Lindblad-Toh K. What animals can teach us about evolution, the human genome, and human disease. *Upsala Journal of Medical Sciences* 2020; 125:1-9. doi: 10.1080/03009734.2020.1722298.
- Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 2005; 438:803-819. doi: 10.1038/nature04338.
- Muller U, Graeber MB. Neurogenetic diseases: molecular diagnosis and therapeutic approaches. *Journal of Molecular Medicine* 1996; 74: 71-84. doi: 10.1007/BF00196782.
- Vallat JM, Goizet C, Tazir M, Couratier P, Magy L, et al. Classifications of neurogenetic diseases: An increasingly complex problem. *Revue Neurologique (Paris)* 2016; 172: 339-349. doi: 10.1016/j.neuro.2016.04.005.
- Green ED, Watson JD, Collins FS. Human Genome Project: Twenty-five years of big biology. *Nature* 2015; 526: 29-31. doi: 10.1038/526029a.
- Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science* 2003; 300: 286-290. doi: 10.1126/science.1084564.
- Mellersh CS, Langston AA, Acland GM, Fleming MA, Ray K, et al. A linkage map of the canine genome. *Genomics* 1997; 46: 326-336. doi: 10.1006/geno.1997.5098.
- Parker HG, Ostrander EA. Canine genomics and genetics: running with the pack. *PLoS Genetics* 2005; 1:5:e58. doi: 10.1371/journal.pgen.0010058.
- Wang GD, Larson G, Kidd JM, vonHoldt BM, Ostrander EA et al. Dog10K: the International Consortium of Canine Genome Sequencing. *National Science Review* 2019; 6: 611-613. doi: 10.1093/nsr/nwz068.
- Park C-E. Study on chromosomes survey of Korea native dogs. *Korean Journal of Veterinary Service* 2011; 34: 291-296. doi: 10.7853/KJVS.2011.34.3.291.
- Switonski M, Reimann N, Bosma AA, Long S, Bartnitzke S, et al. Report on the progress of standardization of the G-banded canine (*Canis familiaris*) karyotype. Committee for the Standardized Karyotype of the Dog (*Canis familiaris*). *Chromosome Research* 1996; 4: 306-309. doi: 10.1007/BF02263682.
- Reimann N, Bartnitzke S, Nolte I, Bullerdiek J. Working with canine chromosomes: current recommendations for karyotype description. *Journal of Heredity* 1999; 90: 31-34. doi: 10.1093/jhered/90.1.31.
- Ostrander EA, Wayne RK. The canine genome. *Genome Research* 2005; 15:1706-1716. doi: 10.1101/gr.3736605.
- Breen M. Canine cytogenetics--from band to basepair. *Cytogenetic and Genome Research* 2008; 120: 50-60. doi: 10.1159/000118740.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291:5507:1304-1351. doi: 10.1126/science.1058040.
- Giersch ABS. Introduction to Cytogenetics. McManus LM, Mitchell RN. eds. In: Pathobiology of Human Disease. San Diego: Academic Press; 2014, p.3304-3310.
- Kirkness EF, Bafna V, Halpern AL, Levy S, Remington K, et al. The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. *Science* 2003; 301: 1898-1903. doi: 10.1126/science.1086432.
- Cannarozzi G, Schneider A, Gonnet G. A phylogenomic study of human, dog, and mouse. *PLoS Computational Biology* 2007; 3: e2. doi: 10.1371/journal.pcbi.0030002.
- Nicholas FW. Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA): a record of advances in animal genetics, freely available on the Internet for 25 years. *Animal Genetics* 2021; 52: 3-9. doi: 10.1111/age.13010.
- Nicholas FW. Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA): a comparative knowledgebase of genetic disorders and other familial traits in non-laboratory animals. *Nucleic Acids Research* 2003; 31: 275-277. doi: 10.1093/nar/gkg074.

30. Nicholas FW, Crook A, Sargan DR. Internet resources cataloguing inherited disorders in dogs. *The Veterinary Journal*. 2011; 189: 132-135. doi:10.1016/j.tvjl.2011.06.009.
31. Starkey MP, Scase TJ, Mellersh CS, Murphy S. Dogs really are man's best friend--canine genomics has applications in veterinary and human medicine! *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* 2005; 4: 112-128. Doi: 0.1093/bfpg/4.2.112.
32. Okubo M, Minami N, Goto K, Goto Y, Noguchi S, et al. Genetic diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy using next-generation sequencing: validation analysis of DMD mutations. *Journal of Human Genetics* 2016; 61: 483-489. doi: 10.1038/jhg.2016.7.
33. Banks GB, Chamberlain JS. The value of mammalian models for duchenne muscular dystrophy in developing therapeutic strategies. *Current Topics in Developmental Biology* 2008; 84: 431-453. doi: 10.1016/s0070-2153(08)00609-1.
34. Yucel N, Chang AC, Day JW, Rosenthal N, Blau HM. Humanizing the mdx mouse model of DMD: the long and the short of it. *NPJ Regenerative Medicine* 2018; 3:4. doi: 10.1038/s41536-018-0045-4.
35. Amoasii L, Hildyard JCW, Li H, Sanchez-Ortiz E, Mireault A, et al. Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* 2018; 362: 86-91. doi: 10.1126/science.aau1549.
36. McCloy G, Moulton HM, Iversen PL, Fletcher S, Wilton SD. Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restores dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD. *Gene Therapy* 2006; 13: 1373-1381. doi: 10.1038/sj.gt.3302800.
37. Schatzberg SJ, Olby NJ, Breen M, Anderson LV, Langford CF, et al. Molecular analysis of a spontaneous dystrophin 'knockout' dog. *Neuromusc Disorders* 1999; 9: 289-295. doi: 10.1016/s0960-8966(99)00011-5.
38. Mejzini R, Flynn LL, Pitout IL, Fletcher S, Wilton SD, et al. ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? *Frontiers in Neuroscience* 2019; 13:1310. doi: 10.3389/fnins.2019.01310.
39. İşcan D, Koç F. Amiyotrofik Lateral Skleroz ve Gen Mutasyonları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 2019; 28:2:161-169. doi: 10.17827/aktd.421472.
40. Morrice JR, Gregory-Evans CY, Shaw CA. Animal models of amyotrophic lateral sclerosis: A comparison of model validity. *Neural Regeneration Research* 2018; 13: 2050-2054. doi: 10.4103/1673-5374.241445.
41. Fiszdon K, Gruszczynska J, Siewruk K. Canine Degenerative Myelopathy-pathogenesis, current diagnostics possibilities and breeding implications regarding genetic testing. *Acta Scientiarum Polonorum Zootechnica* 2020; 19: 3-10. doi: 10.21005/asp.2020.19.1.01.
42. Coates JR, Wining FA. Canine degenerative myelopathy. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 2010; 40:5:929-950. doi: 10.1016/j.cvsm.2010.05.001.
43. Awano T, Johnson GS, Wade CM, Katz ML, Johnson GC, et al. Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106: 2794-2799. doi: 10.1073/pnas.0812297106.
44. Crisp MJ, Beckett J, Coates JR, Miller TM. Canine degenerative myelopathy: biochemical characterization of superoxide dismutase 1 in the first naturally occurring non-human amyotrophic lateral sclerosis model. *Experimental Neurology* 2013; 248:1-9. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.05.009.
45. Mantegazza R, Cordiglieri C, Consonni A, Baggi F. Animal models of myasthenia gravis: utility and limitations. *International Journal of General Medicine* 2016; 9:53-64. doi: 10.2147/IJGM.S88552.
46. Shelton GD. Myasthenia gravis and disorders of neuromuscular transmission. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 2002; 32: 189-206, vii. doi: 10.1016/s0195-5616(03)00085-8.
47. Shelton GD, Schule A, Kass PH. Risk factors for acquired myasthenia gravis in dogs: 1,154 cases (1991-1995). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1997; 211: 1428-1431.
48. Robat CS, Cesario L, Gaeta R, Miller M, Schrempp D, et al. Clinical features, treatment options, and outcome in dogs with thymoma: 116 cases (1999-2010). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2013; 243: 1448-1454. doi: 10.2460/javma.243.10.1448.
49. Granger N. Canine inherited motor and sensory neuropathies: an updated classification in 22 breeds and comparison to Charcot-Marie-Tooth disease. *The Veterinary Journal* 2011; 188: 274-285. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.06.003.
50. Granger N, Lujan Feliu-Pascual A, Spicer C, Ricketts S, Hitti R, et al. Charcot-Marie-Tooth type 4B2 demyelinating neuropathy in miniature Schnauzer dogs caused by a novel splicing SBF2 (MTMR13) genetic variant: a new spontaneous clinical model. *PeerJ* 2019; 7:e7983. doi: 10.7717/peerj.7983.
51. Lassuthova P, Vill K, Erdem-Ozdamar S, Schroder JM, Topaloglu H, et al. Novel SBF2 mutations and clinical spectrum of Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 4B2. *Clinical Genetics* 2018; 94: 467-472. doi: 10.1111/cge.13417.
52. Chen M, Wu J, Liang N, Tang L, Chen Y, et al. Identification of a novel SBF2 frameshift mutation in charcot-marie-tooth disease type 4B2 using whole-exome sequencing. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2014; 12: 221-227. doi: 10.1016/j.gpb.2014.09.003.

BOZOK VETERİNER BİLİMLERİ (BOZOK VET BİL) YAZIM KURALLARI

AMAÇ

Bozok Veteriner Bilimleri'nde, Veteriner Klinik Bilimleri, Veteriner Klinik Öncesi Bilimleri, Veteriner Temel Bilimleri, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi, Zootekni ve Hayvan Besleme alanlarında hazırlanmış güncel ve özgün değeri olan orijinal araştırma makaleleri, olgu sunumları, derlemeler, kısa bildiriler ve editöre mektuplar yayımlanarak ulusal ve evrensel bilime katkı sağlamak amaçlanmıştır.

KAPSAM

Bozok Veteriner Bilimleri Yozgat Bozok Üniversitesinin bilimsel yayın organı olup Haziran ve Aralık aylarında olmak üzere yılda iki kez yayımlanır. Derginin kısaltılmış ismi 'Bozok Vet Sci'dir. Yayın hayatına 2020 yılından itibaren başlayacak olan Bozok Veteriner Bilimleri hakemli ve bilimsel süreli dergi olarak yayımlanacaktır.

Dergimizde, Türkçe ve İngilizce dillerinden birinde hazırlanmış olan ve daha önce başka bir dergiye eş zamanlı olarak sunulmamış Veteriner Klinik Bilimleri, Veteriner Klinik Öncesi Bilimleri, Veteriner Temel Bilimleri, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi, Zootekni ve Hayvan Besleme alanlarında hazırlanmış orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu, davetli ve editör onayı alınmış derlemeler, kısa bildiriler ve editöre mektuplar yayımlanır.

YAZIM KURALLARI (MAKALENİN-YAZININ HAZIRLANMASI)

1. Yazıların sorumlulukları yazarlarına aittir. Gönderilen yazının yayımlanabilmesi için, yayın kurulunca tayin edilen danışmanlar tarafından uygun bulunması şarttır. Dergide yayımlanan yazılar için ücret ya da karşılık ödenmez. Kabul edilmeyen yazılar ve ekleri, aksi belirtilmediği takdirde iade edilmez.
2. Derginin yayın dili Türkçe ve İngilizce. Yayının başında, Türkçe "Özet", İngilizce "Abstract" kısımları yer almalıdır. Özet (Abstract) bölümü 200 kelimeyi geçmemelidir.
3. Metinde sade ve anlaşılır bir yazım dili kullanılmalı, bilimsel yazım tarzı benimsenmeli, gereksiz tekrarlardan kaçınılmalı ve kısaltmalar ilk kullanıldığı yerde tanımlanmalıdır.
4. Bozok Veterinary Sciences'nde yayına kabul edildiği takdirde her türlü yayın hakkının devredildiğine dair beyanları kapsayan "Copyright Form - Yayın Hakkı Devir Sözleşmesinin" sorumlu yazar tarafından imzalanarak pdf formatında gönderilmesi gerekmektedir.
5. Dergiye sunulan çalışmaların "etik kurul onayı" sorumluluğu yazarlara aittir. Bununla beraber Editör, gerektiğinde yazarlardan etik kurul belgesi isteme hakkını saklı tutar.
6. Makalede yer alan tüm yazarların bir bilimsel araştırmacı tanımlama sistemi olan ORCID ID (Open Researcher and Contributor Identifier) kayıt numarası bilgisini makale gönderilme aşamasında sisteme yüklemesi gerekmektedir. ORCID ID kaydı, <http://orcid.org> adresinden ücretsiz yapılabilir
7. Yazışma adresinde belirtilen yazar; tüm yazışmalardan, makale üzerindeki değişikliklerden (yazar sayı ve sırası dahil) ve yayına kabul edilen yazıların matbaa provasının düzeltilmesinden sorumludur.
8. Elektronik sunum: Yayın inceleme sürecini hızlandırmak amacıyla yazılar tam olarak elektronik olarak sunulmalıdır.
9. Yayınlanması istenen çalışmalar; Microsoft Word 6.0 veya daha üst versiyonda, *Times Roman* yazı karakterinde 12 punto, çift aralıklı, sayfanın tüm kenarlarında 3 cm boşluk olacak şekilde ve ilk sayfadan başlayacak şekilde satır numaraları ile birlikte yazılmalıdır. Çalışmada yer alan yazarlar ile ilgili bilgiler "Başlık Sayfası-Title Page" ile "Esas Doküman-main document" den ayrı sunulmalıdır. Orijinal araştırma ve derleme makalelerinde 16 sayfa, literatür listesi mümkünse ise 30 adet sınırını, şekil ve tablo sayısı ise 8 adet sınırını aşmaması tercih edilmelidir. Kısa bildiri ve olgu sunumlarında 10 sayfayı aşmamalıdır.
10. Bozok Veteriner Bilimleri'ne gönderilen yazılar, aşağıdaki sıraya göre (Başlık, Özet, Metin, Kaynaklar, Tablolar ve Şekiller) düzenlenmeli, Tablo ve Şekiller ayrı sayfalarda belirtilmelidir.
11. Dergiye gönderilen çalışmalar Abstract, Özet, Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular, Tartışma ve Sonuç, Kaynaklar başlıklarından oluşmalıdır. Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular, Tartışma ve Sonuç bölümleri numara verilerek belirtilmelidir (1.Giriş, 2.Materyal ve Metot, 3.Bulgular, 4.Tartışma ve Sonuç). Alt başlıklar 1.1., 1.2., şeklinde ardışık olarak numaralandırılmalıdır. Referanslar bölümü numaralandırılmamalıdır.

a. Başlık: Başlık kısa, açık, tüm harfleri büyük ve yazı için uygun olmalıdır. Özellikle elektronik sunumda makalenin sadece başlığı, (yazar ve kurum adresi vermeksizin) yazılmalıdır. Bu yöntem, yazıların uzmanlarca tarafsız bir şekilde değerlendirilmesini sağlamak amacıyla uygulanmaktadır.

b. Özet: Türkçe yazılarda Türkçe ve İngilizce özet olmalıdır. İngilizce yazılarda Türkçe özet de gereklidir. Özet, 250 kelimedenden daha uzun olmamalı; amaç, materyal ve metot, bulgular ile sonucunu içermelidir. Özetlerin

altına 4-6 adet anahtar kelime verilmelidir. Türkçe anahtar kelimeler "Türkiye Bilim Terimleri (TBT)"ne uygun olarak verilmelidir (Bkz. <http://www.bilimterimleri.com>). İngilizce anahtar kelimeler "Medical Subject Headings (MESH)" e uygun olarak verilmelidir (Bkz. <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>).

c. Metin: Araştırma makalelerinde; Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular ile Tartışma ve Sonuç bölümleri, olgu sunumlarında ise; Giriş, Olgu Sunumu, Tartışma ve Sonuç bölümleri olmalıdır. Bölüm başlıkları ilk harfi büyük olacak şekilde küçük harfler ile yazılmalıdır. Yazılarda "Systeme International (SI)" birimleri kullanılmalıdır. Derleme makaleler için hazırlanan özet derlemenin konusu hakkında bilgi ve derlemenin amacından oluşmalıdır. Derleme makalesi "Giriş" ile başlamalı, yazar/lar tarafından belirlenecek ara başlıklarla devam etmeli, "Sonuç" ve "Kaynaklar" ile tamamlanmalıdır.

d. Sembol, birim ve kısaltmalar: Dergimiz, *Scientific Style and Format, The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, Council of Science Editors, Reston, VA, USA (7th ed.) tarafından belirtilen sistemi kabul etmektedir. ×, μ, η, veya v gibi semboller MS Word sembol listesinden seçilerek kullanılmalıdır. Derece (°) sembolü gösterimi için; "O" harfinin veya "0" rakamının üst simge şeklinde gösterilmesi ile yapılmamalı sembol menüsünden kullanım tercih edilmelidir. Çarpım "x" harfi değil sembol menüsü (×) kullanılmalıdır. Sayı, birim ve matematiksel semboller (+, -, ×, =, <, >), kullanıldıktan sonra bir boşluk bırakılmalı (örneğin., 3 kg), yüzde işaretinden sonra boşluk bırakılmamalıdır (örneğin, %45). Latince et al., in vitro veya in situ terimleri italic olarak gösterilememelidir.

e. Kaynaklar: Kaynaklar metin içinde parantez içinde numara ile belirtilmelidir. Birden fazla kaynağa atıf yapılacaksa aynı parantez içerisinde belirtilmelidir örn, (3,5,7-11). Literatür listesinde yer alan kaynakların her biri için metinde atıf yapılmalıdır.

Beşten fazla yazarı olan kaynaklarda, beşinciden sonrası için "et al." eki kullanılmalı, aşağıda verilen sistematik ile noktalama işaretleri ve yazım kurallarına dikkat edilerek yazılmalıdır.

- Kaynak süreli yayın ise;** Örnek: Durmuş İ, Demirtaş ŞE, Can M, Kalebaşı S. Determining egg consumption habits in Ankara. *Tavukçuluk Araştırma Dergisi* 2007; 7: 42-45 (article in Turkish with an English abstract).
- Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance* 2018; 11: 1645-1658. doi: 10.2147/IDR. S173867.
- Kaynak editörlü kitaptan bir bölüm ise;** Örnek: Gay CC, Besser TE. *Escherichia coli septicaemia in calves*. Gyles CL. eds. In: *Escherichia Coli in Domestic Animals and Humans*. Wallingford: CAB International, 1994; pp.75-90.
- Kaynak kitap ise;** Örnek: Varley H, Gowenlock AH, Bell M. *Practical Clinical Biochemistry*. Fifth Edition. London: William Heinemann Medical Books Ltd, 1984; p. 685.
- Kaynak editörlü kitap ise;** Örnek: Constable PD, Hinckliff KW, Done SH, Grunberg W. *Veterinary Medicine*. Eleventh Edition. London: W.B. Saunders Company, 2017; p.57.
- Kaynak kongre bildirisi ise;** Örnek: Kirbas A, Degirmencay S., Kilinc AA, Eroglu MS. Increased cardiac troponin-I concentration and cardiac enzyme activities in neonatal calves with sepsis. Second International Veterinary Internal Medicine Congress. October, 11-13, 2019; Ankara-Türkiye.
- Kaynak tez ise;** Örnek: Kırbaş A. Elâzığ, Samsun, Sivas, Tokat ve Yozgat illerindeki sığır ve koyunlarda Kırım Kongo Kanamalı Ateş virüs enfeksiyonunun seroprevalansının araştırılması, Doktora tezi, Fırat Üniv Sağ Bil Ens, Elâzığ 2009; s.1-2. (thesis in Turkish with an English abstract).

Web tabanlı erişimler kaynak olarak gösterilmemelidir.

f. Tablolar; kaynaklar kısmından sonra, her bir tablo ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir. Tablo başlıklarının yalnızca ilk harfleri büyük olmalıdır. Tablo başlıkları tablonun üzerinde bulunmalı ve **Tablo 1. (Table 1.)** şeklinde numaralandırılmalıdır. Tablolarda iç ve yan kılavuz çizgiler kullanılmamalıdır. Tanımlayıcı bilgi ve açıklamalar tabloların altına yerleştirilmelidir.

Örnek:**Table 1.** Determination of elements in Dogfish Liver certified reference material

Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
	Certified ^a	Found ^b	R(%)
A I ^c	200	215 \pm 10	108
V c	0.6	0.56 \pm 0.01	93
Cr ^c	1.4	1.52 \pm 0.02	109
Co ^c	0.25	0.28 \pm 0.02	112
As	9.66 \pm 0.62	9.55 \pm 0.16	99
Cd	24.3 \pm 0.8	24.2 \pm 0.3	100
Cu	31.2 \pm 1.1	31.7 \pm 0.4	102
Fe	1833 \pm 75	1914 \pm 65	104
Pb	0.16 \pm 0.04	0.16 \pm 0.02	100
Hg	2.58 \pm 0.22	2.31 \pm 0.02	90
Ni	0.97 \pm 0.11	0.94 \pm 0.03	97
Se	8.3 \pm 1.3	8.3 \pm 0.2	100
Ag	0.93 \pm 0.07	0.86 \pm 0.01	92
Zn	116 \pm 6	113 \pm 1	97

^a At 95 % confidence level

^b $\bar{x} \pm SD$, n=3, ^cInformation value

g. Her resim, grafik ve çizim; şekil olarak kabul edilip **Şekil 1. (Figure 1.)** gibi yazılmalı, her biri ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir. Tanımlayıcı bilgi ve açıklamalar şekil ismi ile birlikte şeklin altına yerleştirilmelidir. Resimler 300dpi çözünürlükte olmalıdır.

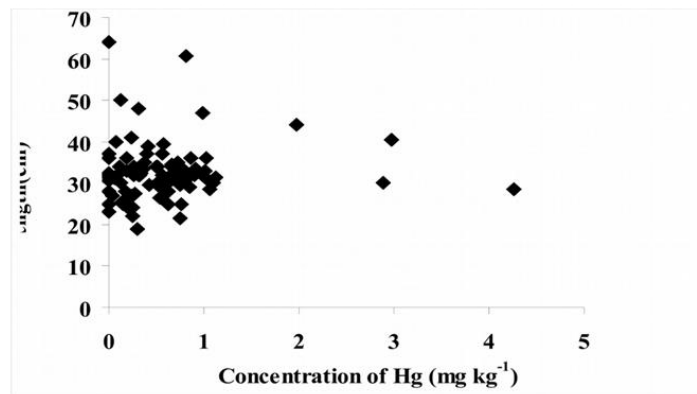
Örnek:

Figure 1. Concentration of Hg (mg kg⁻¹)

Yayının baskı öncesi matbaa provasý yazýþmadan sorumlu yazara gönderilir ve üç gün içerisinde kontrol edilerek dergiye geri gönderilmesi istenir.

Her yayın için Bozok Veteriner Bilimleri'nin ilgili sayısı yazýþmadan sorumlu yazara gönderilir. Makalelerin PDF türü tam metin dosyalarına derginin web sayfasından erişilebilir.

BOZOK VETERINARY SCIENCES (BOZOK VET SCI)

WRITING RULES

Purpose

In Bozok Veterinary Sciences, by publishing original research articles, case reports, reviews, short papers and letters to the editor with current and original value prepared in the fields of Veterinary Clinical Sciences, Veterinary Preclinical Sciences, Veterinary Basic Sciences, Food Hygiene and Technology, Animal Science and Animal Nutrition. It is aimed to contribute to national and universal science.

Scope

Bozok Veterinary Sciences is the scientific publication of Yozgat Bozok University and is published twice a year, in June and December. The abbreviated name of the journal is Bozok Vet Sci. Bozok Veterinary Sciences, which will start its publication life in 2020, will be published as a peer-reviewed and scientific periodical.

In our journal, an original research article, case report, prepared in the fields of Veterinary Clinical Sciences, Veterinary Preclinical Sciences, Veterinary Basic Sciences, Food Hygiene and Technology, Animal Science and Animal Nutrition, which was prepared in one of the Turkish and English languages and was not presented simultaneously to another journal, Invited and editor-approved reviews, short papers and letters to the editor are published.

WRITING RULES (PREPARATION OF THE ARTICLE)

1. Responsibilities of the articles belong to their authors. In order for the submitted manuscript to be published, it must be approved by the advisors appointed by the editorial board. No fee or compensation is paid for the articles published in the journal. Unaccepted manuscripts and their appendices will not be returned unless otherwise stated.
2. The publication languages of the journal are Turkish and English. At the beginning of the publication, the Turkish "Abstract" and the English "Abstract" sections should be included. The abstract section should not exceed 200 words.
3. A plain and understandable writing language should be used in the text, scientific writing style should be adopted, unnecessary repetitions should be avoided and abbreviations should be defined where they are first used.
4. If accepted for publication in Bozok Veterinary Sciences, the "Copyright Form - Copyright Transfer Agreement", which includes the declarations regarding the transfer of all kinds of publication rights, must be signed by the responsible author and sent in pdf format.
5. Responsibility for the "ethics committee approval" of the studies submitted to the journal belongs to the authors. However, the Editor reserves the right to request an ethics committee document from the authors when necessary.
6. All authors in the article are required to upload the ORCID ID (Open Researcher and Contributor Identifier) registration number information, which is a scientific researcher identification system, to the system at the time of submitting the article. ORCID ID registration can be done free of charge at <http://orcid.org>.
7. The author specified in the correspondence address; He is responsible for all correspondence, changes on the article (including the number and order of the author) and correction of the printing proof of the articles accepted for publication.
8. Electronic submission: Manuscripts should be submitted fully electronically in order to speed up the publication review process.
9. Studies to be published; It should be written in Microsoft Word 6.0 or higher, in Times Roman font, 12 points, double-spaced, with 3 cm margins on all sides of the page, and with line numbers starting from the first page. Information about the authors in the study should be presented separately from the

- "Title Page" and "Main Document". It should be preferred that the original research and review articles should not exceed 16 pages, the literature list should not exceed 30 if possible, and the number of figures and tables should not exceed 8. Short papers and case reports should not exceed 10 pages.
10. Manuscripts sent to Bozok Veterinary Sciences should be arranged in the following order (Title, Abstract, Text, References, Tables and Figures), Tables and Figures should be indicated on separate pages.
 11. Studies submitted to the journal should consist of Abstract, Introduction, Material and Method, Results, Discussion and Conclusion, References. Introduction, Material and Method, Results, Discussion and Conclusion sections should be numbered (1. Introduction, 2. Material and Method, 3. Findings, 4. Discussion and Conclusion). Sub-headings should be numbered sequentially as 1.1., 1.2.,... The references section should not be numbered.
 - a) **Title:** The title should be short, clear, all capital letters and appropriate for the text. Especially in the electronic submission, only the title of the article (without giving the author and institution address) should be written. This method is applied to ensure that the articles are evaluated impartially by experts
 - b) **Abstract:** In Turkish articles, there should be an abstract in Turkish and English. Turkish abstracts are also required for English articles. The abstract should not be longer than 250 words; should include the purpose, material and method, findings and conclusion. 4-6 keywords should be given under the abstracts. Turkish keywords should be given in accordance with "Turkish Science Terms (TBT)" (See <http://www.bilimterimleri.com>). English keywords should be given in accordance with "Medical Subject Headings (MESH)" (See <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>).
 - c) **Text:** In research articles; Introduction, Material and Method, Results and Discussion and Conclusion sections, in case reports; There should be Introduction, Case Report, Discussion and Conclusion sections. Chapter titles should be written in lowercase letters with the first letter capitalized. "Systeme International (SI)" units should be used in manuscripts. The summary prepared for the review articles should consist of information about the subject of the review and the purpose of the review. The review article should start with "Introduction", continue with subheadings to be determined by the author/s, and should be completed with "Conclusion" and "References".
 - d) **Symbols, units and abbreviations:** Our journal accepts the system specified by Scientific Style and Format, The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers, Council of Science Editors, Reston, VA, USA (7th ed.). Symbols such as \times , μ , η , or v should be selected from the MS Word symbol list and used. For degree ($^{\circ}$) symbol display; It should not be done by showing the letter "O" or the number "0" as superscript, it should be preferred to use from the symbol menu. Symbol menu (\times) should be used, not the product letter "x". Numbers, units, and mathematical symbols (+, -, \times , =, <, >) should be followed by a space (e.g. 3 kg), not a percent sign (e.g. 45%). Latin et al., in vitro or in situ terms should not be shown in italics.
 - e) **References:** References should be indicated in the text with numbers in parentheses. If more than one source is to be cited, it should be stated in the same parenthesis, eg (3,5,7-11). Reference should be made in the text for each of the sources in the literature list.
 12. In references with more than five authors, "et al." suffix should be used, and it should be written in the following systematic, paying attention to the punctuation marks and spelling rules.
 - a) **If the source is a periodical;** Durmuş İ, Demirtaş ŞE, Can M, Kalebaşı S. Determining egg consumption habits in Ankara. Tavukçuluk Araştırma Dergisi 2007; 7: 42-45 (article in Turkish with an English abstract).
 - b) Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. Infection and Drug Resistance 2018; 11: 1645-1658. doi: 10.2147/IDR.S173867.
 - c) **If the source is a chapter from the edited book;** Gay CC, Besser TE. Escherichia coli septicaemia in calves. Gyles CL. eds. In: Escherichia Coli in Domestic Animals and Humans. Wallingford: CAB International, 1994; pp.75-90.
 - d) **If the source book;** Varley H, Gowenlock AH, Bell M. Practical Clinical Biochemistry. Fifth Edition. London: William Heinemann Medical Books Ltd, 1984; p. 685.
 - e) **If the source is an edited book;** Constable PD, Hinckliff KW, Done SH, Grunberg W. Veterinary Medicine. Eleventh Edition. London: W.B. Saunders Company, 2017; p.57.
 - f) **If the source is the congress notice;** Kirbas A, Degirmencay S., Kilinc AA, Eroglu MS. Increased cardiac troponin-I concentration and cardiac enzyme activities in neonatal calves

with sepsis. Second International Veterinary Internal Medicine Congress. October, 11-13, 2019; Ankara-Türkiye

- g) **If the source is thesis**; : Kırbaş A. Elâzığ, Samsun, Sivas, Tokat ve Yozgat illerindeki sığır ve koyunlarda Kırım Kongo Kanamalı Ateş virüs enfeksiyonunun seroprevalansının araştırılması, Doktora tezi, Fırat Üniv Sağ Bil Ens, Elâzığ 2009; s.1-2. (thesis in Turkish with an English abstract).

Web-based access should not be cited as a source.

- f) **Tables**; After the references part, each table should be given on a separate page. Only the first letters of table titles should be capitalized. Table headings should be above the table and numbered as Table 1. (Table 1.). Inside and side guide lines should not be used in tables. Descriptive information and explanations should be placed below the tables.

Sample :

Table 1. Determination of elements in Dogfish Liver certified reference material

	Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	Certified ^a	Found ^b	R(%)
Al ^c	200	215 \pm 10	108
V ^c	0.6	0.56 \pm 0.01	93
Cr ^c	1.4	1.52 \pm 0.02	109
Co ^c	0.25	0.28 \pm 0.02	112
As	9.66 \pm 0.62	9.55 \pm 0.16	99
Cd	24.3 \pm 0.8	24.2 \pm 0.3	100
Cu	31.2 \pm 1.1	31.7 \pm 0.4	102
Fe	1833 \pm 75	1914 \pm 65	104
Pb	0.16 \pm 0.04	0.16 \pm 0.02	100
Hg	2.58 \pm 0.22	2.31 \pm 0.02	90
Ni	0.97 \pm 0.11	0.94 \pm 0.03	97
Se	8.3 \pm 1.3	8.3 \pm 0.2	100
Ag	0.93 \pm 0.07	0.86 \pm 0.01	92
Zn	116 \pm 6	113 \pm 1	97

^a At 95 % confidence level

^b $\bar{x} \pm SD$, n=3, ^cInformation value

Every picture, graphic and drawing; should be accepted as figures and written like Figure 1. (Figure 1.), each one should be given on a separate page. Descriptive information and explanations should be placed under the figure along with the figure name. Pictures must be at 300dpi resolution.

Sample:

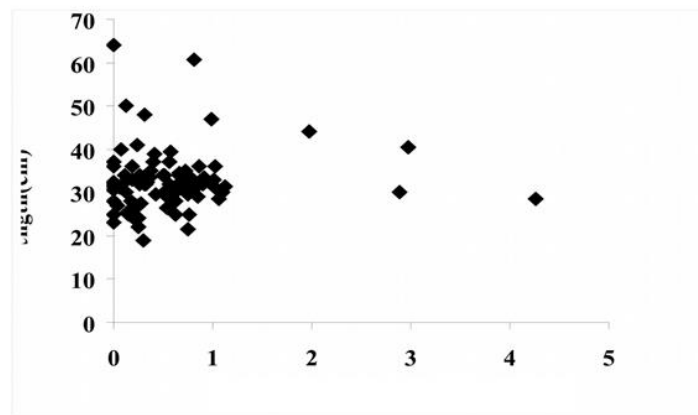


Figure 1. Concentration of Hg (mg kg⁻¹)

The prepress proof of the publication is sent to the corresponding author and it is requested to be checked and returned to the journal within three days.

For each publication, the relevant issue of Bozok Veterinary Sciences is sent to the corresponding author. PDF-type full-text files of the articles can be accessed from the journal's web page.

BOZOK VETERİNER BİLİMLERİ
Yayın Hakları Devri Sözleşmesi

Makale Türü: () Araştırma () Olgu Sunumu () Derleme () Kısa bildiri () Editöre mektup

Makale Başlığı:.....

Biz türü ve başlığı yukarıda belirtilmiş makalenin yazarları olarak; Bozok Veteriner Bilimleri'nin yazım ve yayın şartlarını bilerek ve kabul ederek hazırlayıp yayımlanması dileğiyle Bozok Veteriner Bilimleri Editörlüğüne gönderdiğimiz makalenin orijinal olduğunu, kısmen veya tamamen daha önce yayımlanmadığını veya eşzamanlı olarak başka bir yayın kuruluşuna gönderilmediğini, makale yayımlandıktan sonra ortaya çıkabilecek her türlü bilimsel ve etik sorumluluğun bize ait olduğunu ve Bozok Veteriner Bilimleri'nin hiçbir sorumluluk taşımayacağını, danışman ve dergi editörü tarafından gerekli görülen düzeltmelerle birlikte her türlü yayın hakkını, yazının yayımlandığı tarihten itibaren Bozok Veteriner Bilimleri'ne devrettiğimizi taahhüt ederiz.

Bununla birlikte yazarların telif hakkı dışında kalan patent vb. tescil edilmiş hakları, yazarların kitap ve dersler gibi çalışmalarında makalenin tümü ya da bir bölümünü ücret ödemeksizin kullanım hakkı, ticari amaçla kullanmamak üzere makaleyi çoğaltma hakkı saklıdır.

Sorumlu Yazar

Adı ve Soyadı:

Adres:

Tel/Fax:

E-posta:

Tarih:.....İmza:.....

Not: Lütfen formu doldurduktan sonra pdf formatında, başlangıç sayfası ve esas doküman ile birlikte e-posta adresimize gönderiniz.

Elektronik posta:

bvs@bozok.edu.tr

bvs@yobu.edu.tr

Adres:

Yozgat Bozok Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Sorgun Meslek Yüksekokulu Binası, Ahmet Efendi Mah. Toki konutları
Yanı 3500.Cad. No:4 66700 SORGUN/YOZGAT

**BOZOK VETERINARY SCIENCES
COPYRIGHT RELEASE FORM**

Article Type: Research Case Report Review Short Paper Letter to Editor

Manuscript Title:

.....

As the authors of the article whose type and title are mentioned above; We wish to prepare and publish Bozok Veterinary Sciences with the knowledge and acceptance of the editorial and publication terms, and the article that we sent to Bozok Veterinary Sciences Editor is original, partially or completely not published before or not sent to another publication institution simultaneously, any scientific and ethical issues that may arise after the article is published. We undertake that we are responsible and that Bozok Veterinary Sciences will not bear any responsibility, and that we have transferred all rights of publication to Bozok Veterinary Sciences as of the date of publication, together with the corrections required by the consultant and journal editor.

However, patents, other than the copyright of the authors, etc. registered rights, authors' right to use all or part of the article free of charge in their works such as books and lessons, and the right to reproduce the article for non-commercial use.

Corresponding Author

Name and Surname:

Address:

Phone/Fax:

E-mail:

Date:..... Signature:.....

Notes: Please fill the form and send it to our e-mail address in pdf format with the start page and the main document.

E-mail: bvs@bozok.edu.tr

bvs@yobu.edu.tr

Adress: Yozgat Bozok University, Faculty of Veterinary Medicine, Sorgun Vocational School Building, Ahmet Efendi Mah. Toki konutları Yanı 3500.Cad. No:4 66700 SORGUN/YOZGAT



İçindekiler / Contents

Araştırma Makaleleri / Research Articles

- Büyükörük S, Çalışkan M, Şahiner C.** *Mavi Yengeçlerde Vibrio parahaemolyticus'un İzolasyonu ve Bazı Antibiyotiklere Karşı Direnç Profillerinin Belirlenmesi*1-4

Derleme / Review Articles

- Tandogan Ü, Tarhan D, Dokuzeylül B, Ercan AM, Or ME.** *Elektrokemoterapi ve Veteriner Hekimlikte Kullanımı*..... 5-11
- Süleymanoglu AA, Aksu H, Aydın A.** *Enterobacteriaceae Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz ile Karbapenem ve Kolistin Direnci*.....12-19
- Tüfekçi E, Ekinci G, Keleş i.** *Köpeklerde Lösemi*.....20-27

Düzeltilme Makalesi / Re-entired Article

- Kandır S.** *Nörogenetik Hastalıklarda Alternatif Model Organizma: Köpekler*.....28-32