



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni

Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association

e-ISSN: 2667-8381



Cilt (Volume): 14 - Sayı (Issue): 2 - 2023
<https://dergipark.org.tr/vetfarmatoksbulten>



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association

Baş Editör / Editor-in-Chief

Prof.Dr. Ender YARSAN (Ankara Üniversitesi, Türkiye)



Editörler Kurulu / Editorial Board

Prof. Dr. Levent ALTINTAŞ (Ankara Üniversitesi, Türkiye)
Prof.Dr. Füsün TEMAMOĞULLARI (Harran Üniversitesi, Türkiye)
Prof.Dr.Begüm YURDAKÖK DİKMEN (Ankara Üniversitesi, Türkiye)
Doç.Dr. Hüsamettin EKİCİ (Kırıkkale Üniversitesi, Türkiye)
Doç.Dr. Mustafa YİPEL (Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Türkiye)
Dr. Sedat SEVİN (Ankara Üniversitesi, Türkiye)

Danışma Kurulu / Advisory Board

Prof.Dr. Abdurrahman AKSOY (Ondokuzmayıs Üniversitesi)	Prof.Dr. Cavit KUM (Adnan Menderes Üniversitesi)
Prof.Dr. Arif ALTINTAŞ (Ankara Üniversitesi)	Prof.Dr. Aneliya MILANOVA (Trakya Üniversitesi, Bulgaristan)
Prof.Dr. Nuri ALTUĞ (Namık Kemal Üniversitesi)	Prof.Dr. Songül SONAL (Uludağ Üniversitesi)
Prof.Dr. Yavuz Osman BİRDANE (Afyon Kocatepe Üniversitesi)	Prof.Dr. İbrahim TAŞAL (Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi)
Prof.Dr. Mehmet ÇALICIOĞLU (Fırat Üniversitesi)	Prof.Dr. Bünyamin TRAŞ (Selçuk Üniversitesi)
Prof.Dr. Gürdal DAĞOĞLU (Fırat Üniversitesi)	Prof.Dr.Murat YILDIRIM (İstanbul Cerrahpaşa Üniversitesi)
Prof.Dr. İbrahim DEMİRKAN (Afyon Kocatepe Üniversitesi)	Prof.Dr. Ali Cesur ONMAZ (Erciyes Üniversitesi)
Prof.Dr. Ahmet DOĞANAY (Ankara Üniversitesi)	Dr. Ishraga G. IBRAHİM (Central Veterinary Res Lab, Sudan)
Prof.Dr. Gökhan ERASLAN (Erciyes Üniversitesi)	Dr. Shahram SAGHAEI (Orumieh Azad Üniversitesi, İran)
Prof.Dr. İzzet KARAHAN (Balıkesir Üniversitesi)	Dr. Tomaž SNOJ (Ljubljana Üniversitesi, Slovenya)





Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association



İmtiyaz Sahibi : Prof.Dr. Ender YARSAN

Yazı İşleri Müdürü : Prof.Dr. Levent ALTINTAŞ

Dernek Yazışma Adresi : Atmaca Sokak No: 8/3 06110, Dışkapı- Ankara

Kapak Tasarım : Makromedya Halkla İlişkiler Ltd. Şti.

Dizgi : Doç.Dr. Hüsamettin EKİCİ

Bültenin amacı, bilimsel etik kuralları çerçevesinde, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji ile ilgili ulusal - uluslararası literatüre katkıda bulunacak derleme türünde çalışmalarını yayınlamaktır. Yılda üç kez yayınlanan kör hakemli bir açık erişim bültenidir. Bültenin yayın dili Türkçe ve İngilizce'dir. Alınan tüm yazılar intihal yazılımları (iThenticate veya Turnitin programı) ile kontrol edilmektedir.

Bültenimiz 2019 yılı Cilt 10, Sayı 1'den itibaren ResearchBib (Academic Research Index), ESJI (Eurasian Scientific Journal Index), ROOTINDEXING, Google Scholar, Sindex (Scientific Indexing Services), 2020 yılı Cilt 11, Sayı 1'den itibaren de ASOS İndeks, Türkiye Atıf Dizini, Index Copernicus, TR Dizin ve ve 2023 yılından itibaren ise SOBİAD indeksleri tarafından taranmaktadır. Bültenimizde yayınlanacak makalelere Cilt: 11, Sayı: 1'den itibaren DOI numarası verilmektedir.

Her Hakkı Saklıdır. Bülteinde yer alan yazılar kaynak gösterilerek alıntı yapılabilir. Yazıların her türlü sorumluluğu yazarlara aittir.

İletişim: vftdbulten@vetfarmatoks.org.tr





Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

Cilt: 14 - Sayı: 2- 2023

01.09.2023

-
1. ANALİZ ÖNCESİ NUMUNE HAZIRLAMA YÖNTEMİ OLARAK: QUECHERS
AS A PRE-ANALYSIS SAMPLE PREPARATION METHOD: QUECHERS
Hikmet Özgün İŞCAN, Abdurrahman AKSOY.....59
 2. SALMONELLA CRISPR-Cas SİSTEMİ'NİN TEMEL ÖZELLİKLERİ
KEY FEATURES OF SALMONELLA CRISPR-Cas SYSTEM
Özge ERDOĞAN.....72
 3. METABOLİK SENDROM
METABOLIC SYNDROME
Buse TURAN, Seyfullah HALİLOĞLU.....79
 4. KÖPEK VE KEDİDE PARAZİT HASTALIKLARININ TEDAVİSİNDE MAKROSİKLİK LAKTONLAR
MACROCYCLIC LACTONES IN THE TREATMENT OF PARASITIC DISEASES IN DOGS AND CATS
Beyza AVCI, Kader YILDIZ.....88
 5. KANATLI HAYVANLARDA KULLANILAN VEKTÖR AŞILAR
VECTOR VACCINES FOR POULTRY
Gazel Ayça KURTBEOĞLU, Mehmet AKAN.....98



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni

Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association

e-ISSN: 2667-8381

Hikmet Özgün İŞCAN^{a*}
Abdurrahman AKSOY^b

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalı, Samsun

ORCID^a: 0000-0002-5786-9247

ORCID^b: 0000-0001-9486-312X

*Sorumlu Yazar: Hikmet Özgün İŞCAN
E-Posta: hikmetozgun.iscan@omu.edu.tr

Geliş Tarihi: 03.04.2023

Kabul Tarihi: 02.05.2023

14 (2): 59-71, 2023

DOI: 10.38137/vftd.1312964

Makale atfı

İşcan, H.Ö. ve Aksoy, A. (2023). Analiz öncesi numune hazırlama yöntemi olarak: Quechers, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni, 14 (2), 59-71. DOI: 10.38137/vftd.1312964.

ANALİZ ÖNCESİ NUMUNE HAZIRLAMA YÖNTEMİ OLARAK: QUECHERS

ÖZET. Karmaşık yapıdaki matrislerden, numune hazırlaması ve analizi çok sayıda işlem gerektirmesinin yanında çok miktarda masrafa neden olmaktadır. Hem numune hazırlama aşamalarını hızlandırmak ve kolaylaştırmak, hem de ortaya çıkan masrafı azaltmak için çok sayıda örnek hazırlama yöntemi ortaya konmuştur. Birçok çoklu kalıntı tarama yöntemi (MRM'ler) karmaşık, zahmetli, zaman alıcı, yüksek miktarda solvent gerektiren ve bu nedenle pahalı yöntemlerdir. Pek çok geleneksel numune hazırlama yöntemi hala kullanımda olsa da ideal olarak, çok sayıda kalıntının tarandığı yöntemlerden istenen temel özellikler; hızlı ve uygulaması kolay olması, minimum miktarda kimyasal gerektirmesi, kabul edilebilir bir seçicilik derecesi sağlaması ve tüm bunların yanında yeterince geniş bir analit spektrumunu kapsamasıdır. QuEChERS, açılımında da belirtildiği gibi gerçekleştirilmesi kolay, hızlı ve düşük maliyetli, minimum hacimde çözücü gerektiren ve geniş bir analit yelpazesinin analizini sağlayan, güvenilir sonuçlar ortaya koyan bir yöntemdir. QuEChERS ile tek bir analist, 1-3 € değerinde tek kullanımlık malzemeler kullanarak 45 dakikada 8 numune hazırlayabilir. Bu sayede laboratuvar verimliliği; işgücünün azaltılması, sarf malzeme tasarrufu, daha yüksek numune verimi ve azaltılmış atık üretimi açısından artırılmış olur. Geliştirilmesinden itibaren 12 Haziran 2023'e kadar, Web of Science'a göre QuEChERS yöntemlerinin kullanımına ilişkin 4971 makale yayınlanmıştır. Bu araştırmalar neticesinde, çok sayıda araştırma grubu tarafından farklı matris tiplerine sahip çeşitli gıda ürünlerinde pestisitler, antibiyotikler, mikotoksinler, PAH'lar, PCB'ler gibi çeşitli kimyasal bileşiklerin analizi öncesi numune ekstraksiyonu amacıyla QuEChERS yönteminin aktif olarak kullanıldığı görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: dSPE, ekstraksiyon, mikotoksin, QuEChERS, PAH, pestisit, veteriner ilaçları.

AS A PRE-ANALYSIS SAMPLE PREPARATION METHOD: QUECHERS

ABSTRACT. The analysis of complex matrices requires numerous operations and incurs significant expenses due to the need for extensive sample preparation and analysis. In order to expedite and simplify the sample preparation stages while reducing costs, numerous methods for sample preparation have been developed. Many multi-residue screening methods (MRMs) are complex, labor-intensive, time-consuming, and require large amounts of solvents, making them expensive. Although many traditional sample preparation methods are still in use, the desired characteristics of methods that scan numerous residues include being fast and easy to implement, requiring minimal amounts of chemicals, providing an acceptable degree of selectivity, and encompassing a wide spectrum of analytes. QuEChERS, as indicated by its acronym, is a method that is easy, fast, low-cost, requires minimal solvent volume, and enables the analysis of a wide range of analytes, yielding reliable results. With QuEChERS, a single analyst can prepare 8 samples in 45 minutes using disposable materials costing 1-3 €. This increases laboratory efficiency in terms of reduced workforce, savings in consumables, higher sample throughput, and reduced waste production. From its development until 12 June 2023, 4971 articles related to the use of QuEChERS methods were published in the Web of Science. The outcomes of these investigations have revealed that a multitude of research collectives actively employ the QuEChERS technique to analyze a diverse array of chemical categories, including pesticides, antibiotics, mycotoxins, PAHs, and PCBs, across an extensive spectrum of food commodities characterized by varying matrix compositions.

Keywords: dSPE, extraction, mycotoxin, QuEChERS, PAH, pesticide, veterinary drugs.

GİRİŞ

Karmaşık yapılı matrislerden, numune hazırlaması ve analizi çok sayıda işlem gerektirmekte ve bu sebeple de yüksek masraflara neden olmaktadır (Lehotay ve ark., 2010; Santana-Mayor, 2019).

Plazma, serum, idrar gibi biyolojik; su, toprak, hava gibi çevresel; gıda ve farmasötik ürünler gibi diğer numuneler, aranan maddenin yanında çok sayıda bileşeni içeren karmaşık matrislerdir. Bu nedenle, örnek hazırlama aşaması, özellikle yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS), radyoimmün assay (RIA), atomik absorpsiyon (AA) gibi cihazlar yardımıyla yapılan analizler öncesinde önemli bir adımdır (Yavuz ve Aksoy, 2006).

Örnek hazırlama işleminin aşamaları, analit ve matrisin geri kalan kısmı arasındaki fizikokimyasal farklılıklara göre belirlenir. Bu özelliklerin iyi anlaşılması, farklı numune hazırlama tekniklerinin ve analitik yöntemlerin uygulanabilirliği, etkinliği ve tekrarlanabilirliği için çok önemlidir (Pavlović ve ark., 2007). Numune hazırlama aşamalarını hızlandırmak, kolaylaştırmak ve ortaya çıkan masrafi azaltmak için çok sayıda örnek hazırlama yöntemi ortaya konmuştur.

Örnek hazırlama amacıyla kullanılan çok sayıda yöntem mevcuttur. Bunların başlıcaları; LLE: Sıvı-sıvı Ekstraksiyon, SPE: Katı Faz Ekstraksiyon, SPME: Katı Faz Mikro Ekstraksiyon, MSPE: Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon, SFE: Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon ve QuEChERS'dır.

Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon (LLE)

LLE (sıvı-sıvı ekstraksiyonu), köklü bir uygulama olup uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bu ekstraksiyon yöntemi, nadir toprak elementlerinin ayrıştırılması, karboksilik asitlerin geri kazanımı, yenilebilir yağların rafine edilmesi ve asit giderme gibi alanlarda halihazırda yoğun olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, petrol, ilaç, biyokimya ve endüstriyel atık arıtımı gibi birçok alanda rağbet görmektedir. LLE'de, fiziksel çözücüler, reaktif çözücüler ve iyonik sıvılar (IL'ler) gibi birçok çözücü türü kullanılmaktadır. Bu çözücülerin fizikokimyasal özelliklerindeki değişiklikler, ekstrakte edilen maddelerin seçiciliğinde önemli farklılıklara neden olabilmektedir (Bokhary ve ark., 2021).

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, örnek hazırlama için

sıklıkla kullanılan tekniklerden biridir. Bu ekstraksiyon yönteminde, çözültide bulunan bir veya daha fazla bileşenin uygun bir çözücü kullanılarak ayrıştırılması sağlanır. Ekstraksiyon, bileşenlerin çözünürlüklerine bağlı olarak iki karışmayan sıvı çözücü arasında bölünmesi yoluyla gerçekleştirilir (Ali ve ark., 2019; Alampanos ve Samanidou, 2021). Bununla birlikte, bu teknik, artan çözücü tüketimi, seçiciliğin azalması, analit kaybı, iki faz arasında emülsiyon oluşumu ve çok adımlı prosedürler gibi ciddi dezavantajlara sahiptir (Alampanos ve Samanidou, 2021).

Katı Faz Ekstraksiyon (SPE)

SPE, örneklerde bulunan analitlerin SPE sorbenti tarafından adsorpsiyonu ve daha sonra elüsyon yoluyla kontaminantlardan ayrılması işlemine verilen isimdir.

Katı faz ekstraksiyonu (SPE), çok çeşitli matrislerden analit elde etmek için yaygın olarak kullanılan kapsamlı ve karlı bir örnek hazırlama tekniğidir. SPE, LLE ile karşılaştırıldığında birçok avantaja sahiptir;

- Seçiciliği daha yüksektir,
- Organik çözücülerin kullanımını daha azdır,
- SPE işlemi için farklı materyallerden üretilmiş birçok sorbent mevcuttur. Bu nedenle, hedeflenen analit için uygun bir sorbentin bulunma olasılığı daha yüksektir (Alampanos ve Samanidou, 2021).

Geleneksel olarak SPE; normal faz, ters faz ve iyon değiştirme adı verilen 3 farklı metodu içerir; ancak bunlardan en çok tercih edileni ters faz metodudur. İlgili analitlerin değişen fiziko-kimyasal özelliklerine göre (asitler/bazlar/amfoterik, düşük/yüksek logP ve tek veya çoklu pKa değerleri), bu metodlardan herhangi biri tercih edilebilir. Malzeme bilimindeki gelişmeyle, SPE için farklı sabit faz seçeneklerini kullanıma sunulmuştur (C8, C18 kartuşları gibi) (Kole ve ark., 2011).

Katı Faz Mikroekstraksiyon (SPME)

Katı faz mikro ekstraksiyon (SPME), numune işleme, zenginleştirme ve ekstraksiyon aşamalarını tek bir adımda birleştirerek elde edilen analitlerin kromatografik cihazlara doğrudan enjeksiyonunu sağlayan modern, ayrıntısız bir numune hazırlama tekniğidir. Tekniğin temel avantajları; basitlik, hızlılık, iyileştirilmiş numune ayrıştırma, doğru analiz ve düşük organik solvent tüketimi (solventsiz veya

solvent miktarı minimuma indirilmiş) sağlamasıdır. Bu teknik, tarımsal ürünlerden ilaç numunelerine kadar çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Yamini ve ark., 2019; Jalili ve ark., 2020).

Manyetik Katı Faz Ekstraksiyonu (MSPE)

Manyetik katı faz ekstraksiyonu (MSPE), manyetik özellikteki maddelerin numune çözeltisine ilave edilmesiyle oluşturulan karışıma manyetik alan uygulanması sonucu hızlı ve kolay bir şekilde ayırım sağlayan bir yöntemdir. MSPE, geleneksel SPE'de sıkça karşılaşılan sorunların (sorbent hazırlama zorlukları, yüksek geri basınç veya tıkanma gibi) elimine edildiği bir yöntemdir.

MSPE protokolünde ilk adım, hedeflenen analitlerin manyetik nanoparçacıklara (NP'ler) bağlanması için sıvı formdaki numuneyle (işlenmemiş numune, seyreltilmiş sıvı numune veya ekstrakt) birkaç dakika ila birkaç saat boyunca inkübe edilmesidir (Šafaříková ve Šafařík, 1999; Capriotti ve ark., 2019).

Manyetik katı faz ekstraksiyonu (MSPE) yönteminde, manyetik nanoparçacıklar (NP'ler) hedef analite bağlandıktan sonra, bir mıknatıs yardımıyla çözeltiden ayrıştırılır. Manyetik materyal geri kazanıldıktan sonra, analitler uygun bir çözücü ile yıkanarak ayrıştırılır. Bu yöntemin avantajları, organik çözücü kullanımının azaltılması ve yüksek geri kazanım değeri iken, dezavantajı özel manyetik nanoparçacıkların gerekliliğidir. Numunenin analizi için HPLC, UV-Vis spektroskopisi veya Kütle Spektroskopisi (MS) kullanılabilir. MSPE yöntemi tarımsal ürünlerin analizinden ilaç numunelerinin analizine kadar geniş bir yelpazede kullanılabilir (Capriotti ve ark., 2019; Li ve Shi, 2019).

Superkritik Akışkan Ekstraksiyon (SFE)

Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SFE), belirli bir bileşik, karışım veya elementin kritik noktasının üzerinde basınç ve sıcaklık uygulanarak elde edilen süperkritik sıvının (SF) çözücü özelliklerinden yararlanan bir yöntemdir. Örneğin, Süperkritik Karbon Dioksit Teknolojisi (SC-CO₂ teknolojisi), gıda ve ilaç gibi bileşiklerin geleneksel termal yöntemlerle pastörizasyonu yerine geçen, karbondioksit vasıtasıyla basınç uygulayarak mikroorganizmaların ortadan

kaldırılmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntem, besin içeriğini bozmadan işlem yapılmasına olanak sağladığı için diğer termal uygulamalara önemli bir alternatif olarak değerlendirilmektedir (Vigano ve ark., 2015; Ahmad ve ark., 2019).

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SFE), doğal ürünlerden biyoaktif bileşiklerin eliminasyonunu sağlayan bir tekniktir. Bu teknik, ucuz olması, ekstraksiyon süresinin kısa olması, daha az organik çözücü kullanımı, çevresel açıdan zararsız çözücülerin kullanımı ve ısıya duyarlı maddelerin ekstraksiyonu için uygun olması gibi avantajlara sahiptir. SFE'de kullanılan CO₂ dışındaki diğer potansiyel solventler; N₂O, ksenon, C₂H₆, C₃H₈, n-C₅H₁₂, NH₃, CHF₃, SF₆'dır (Pavlović ve ark., 2007; Ahmad ve ark., 2019).

Geleneksel numune hazırlama yöntemleri hala kullanımda olsa da kalıntı tarama için tercih edilecek yöntemlerin ideal olarak sahip olması gereken özellikler; hızlı ve uygulanması kolay olması, minimum kimyasal kullanımı gerektirmesi, kabul edilebilir bir seçicilik derecesi sağlaması ve yeterince geniş bir analitik spektrumunu kapsamasıdır. Geleneksel karmaşık analitik prosedürlere alışkın olan analistler, daha basit ve hızlı bir analitik prosedürün yeterince doğru sonuç veremeyeceğini ve mümkünse yalnızca tarama prosedürleri için kullanılması gerektiğini savunarak daha basit tarama yöntemlerine tereddütle yaklaşırlar. Ancak gerçekte, bir prosedür ne kadar çok analitik adım içeriyorsa ve ne kadar karmaşıkta, sistematik ve rastgele hataların ortaya çıkma ihtimali o kadar artar (Rejczak ve Tuzimski, 2015; Quechers, 2023).

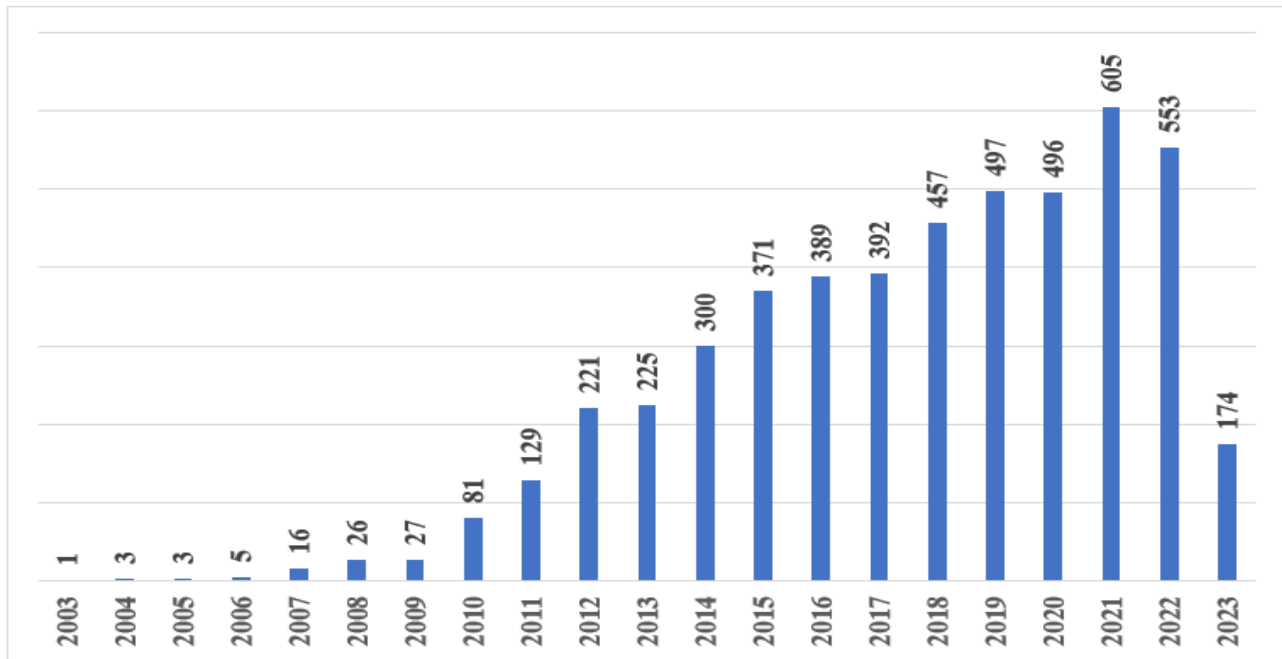
QuEChERS Nedir?

QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe), Hızlı, Kolay, Ucuz, Etkili, Dayanıklı, Güvenli kelimelerinin İngilizce kısaltmasıdır. Bu yöntem, aynı anda birden fazla analitin analizine olanak sağlayan bir örnek hazırlama yöntemidir. QuEChERS ilk olarak veteriner ilaçları için geliştirilmiş olmasına rağmen, resmi olarak ilk kez pestisitler için yayınlanmıştır. Günümüzde, QuEChERS yöntemi antibiyotikler, mikotoksinler, PAH'lar, PCB'ler gibi birçok kimyasal grubun analizi için numune ekstraktında aktif olarak kullanılmaktadır. Bu kimyasal gruplarla ilgili örneklerden ilerleyen bölümlerde bahsedilecektir.

Tablo 1. Ekstraksiyon metodlarının karşılaştırılması (Pawliszyn, 1997; Simpson, 2000; Lehotay, 2010; Zang ve Hu, 2013; Ötles, 2016; Ahmad, 2019; Capriotti 2019).

	Kullanılan Solvent Miktarı	Geri Kazanım/ Tekrarlanabilirlik	Maliyet	Analiz Süresi	Uygulama Kolaylığı
QuEChERS	+	+++	+	++	+++
SPE	++	++	+	++	+
SPME	-	+++	+++	+	+++
LLE	+++	+	+++	+++	+
MSPE	++	++	++	+	++
SFE	+	++	+++	++	++

SPE: Katı Faz Ekstraksiyon, SPME: Katı Faz Mikro Ekstraksiyon, LLE: Sıvı-sıvı Ekstraksiyon, MSPE: Manyetik Katı Faz Ekstraksiyon, SFE: Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon (+ düşük, ++ orta, +++yüksek).



Şekil 1. QuEChERS Metodu Temel Alan Yayınların Yıllara Göre Dağılımı (2003-2023) (Web of Science Arama Sonuçları) (Web of Science, 2023).

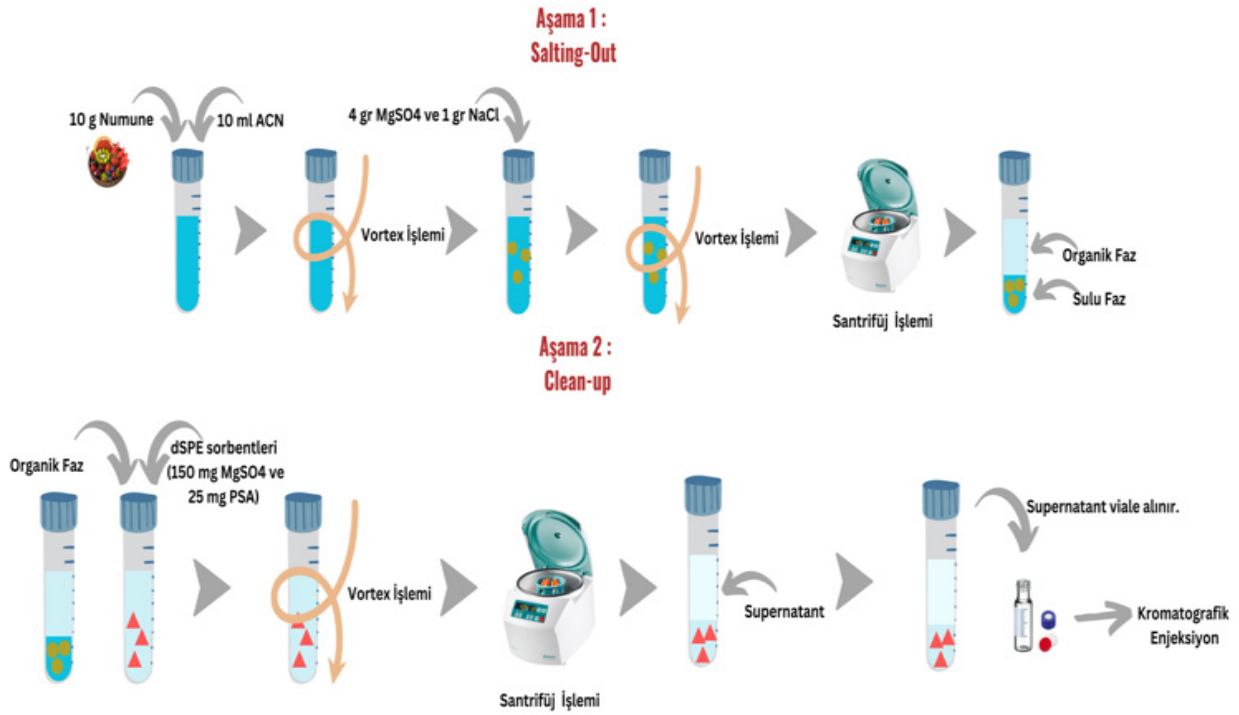
Neden QuEChERS?

QuEChERS yönteminin avantajları;

- Daha az organik solvent kullanımı ve klorlu atık oluşturmaması sebebiyle kullanıcı ve çevre dostu bir yöntem olduğu söylenebilir.
- Kabul edilebilir geri kazanım (recovery) değerleri sağlar.
- Daha az işlem basamağı ile hızlı analiz imkânı sağlar.

- Düşük maliyetlidir.
- Aynı anda birden fazla analitin analizine imkân tanır.

QuEChERS yöntemi, Michelangelo Anastassiades tarafından Wyndmoor/Pennsylvania/ABD' de bulunan USDA/ARS-ERRC'de Steven Lehotay'ın postdoktora ziyareti sırasında 2001 ve 2002 yıllarında geliştirilmiştir. İlk olarak, veteriner ilaçları olan anthelmintikler ve tireostatların hayvan dokularından analizi için



Şekil 2. QuEChERS Aşamaları (Casado ve ark., 2022 temel alınarak oluşturulmuştur).

kullanılmıştır. Ancak, daha sonra polar ve özellikle bazik bileşiklerin ekstraksiyonundaki yüksek potansiyeli fark edilmiş ve çeşitli modifikasyonlarla bitkisel materyallerin pestisit kalıntı analizlerinde yüksek geri kazanım değerleri elde edilebildiği ortaya konulmuştur. Bitki materyalindeki pestisit kalıntılarının analizine yönelik bu yeni yöntem, ilk olarak 2002 yılında Roma’da düzenlenen EPRW 2002’de sunulmuştur (Anastassiades ve ark., 2002; Anastassiades ve ark., 2003; Quechers, 2023).

QuEChERS yöntemini kullanan bir analist, tek başına 1–3 € değerinde tek kullanımlık malzemelerle 45 dakikada 8 numune hazırlayabilmektedir. Bu sayede laboratuvar verimliliği; işgücünün azaltılması, sarf malzeme tasarrufu, daha yüksek numune verimi ve azaltılmış atık üretimi açısından artırılmış olur (Quechers, 2023).

Web of Science’da yapılan araştırmalara göre QuEChERS yönteminin geliştirilmesinden itibaren 12 Haziran 2023’e kadar 4971 makale yayımlandığı ortaya konmuştur. Son yıllarda, farklı matris türlerine sahip çok sayıda gıda ürününde çeşitli kimyasal bileşiklerin analizi için birçok araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalar sayesinde, pestisitler, veteriner ilaçları, mikotoksinler ve diğer kalıntı oluşturan kimyasallar için yöntemin kapsamı

olabildiğince genişletilmiştir (Rejczak ve Tuzimski, 2015; Web of Science, 2023) (Şekil 1).

QuEChERS yöntemi, adından da anlaşılacağı gibi uygulanması kolay, hızlı, düşük maliyetli, az çözücü kullanımı gerektiren ve geniş bir analit yelpazesinin analizini mümkün kılan, güvenilir sonuçlar veren bir yöntemdir (Rejczak ve Tuzimski, 2015). QuEChERS yöntemi ile elde edilen analitler, kromatografik (GC ve/veya LC) yöntemler ve kütle spektrometrisi (MS) kullanılarak analiz edilebilmektedir (Bioneks, 2023).

Metod Aşamaları:

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE), farklı çözünürlüklere sahip bileşikleri ayırmak için uzun süredir kullanılan etkili bir yöntemdir ve bu yöntemde birbirine karışmayan iki sıvı kullanılır (Majors, 2013). QuEChERS, asetonitril (ACN, MeCN) kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyonunu, MgSO₄ gibi tuzlarla salting-out işlemi uygulanmasını ve dispersif katı faz ekstraksiyonu (d-SPE) kullanılarak ekstraktın saflaştırılmasını içerir (Rejczak ve Tuzimski, 2015).

Matris (Örnek) ilk olarak sıvı sıvı ekstraksiyon metoduna tabi tutulur. Örnek santrifüj tüpü içinde çözücü (tipik olarak asetonitril) ile çalkalanarak homojen bir form elde edilir. Su ve suyla karışabilen bir organik çözücü

karişımına inorganik bir tuzun eklenmesi, çözücünün karişımından ayrılmasına ve iki fazlı bir sistemin oluşmasına ile sonuçlanır (ve bazen üçüncü bir faz ortaya koyar). (Salting-Out) Devamında kalan matris bileşenlerinin sorbent (ler) tarafından tutulduğu ve analitlerin ekstraktta kaldığı “dispersif katı-faz ekstraksiyonu” (dSPE) ile QuEChERS süreci tamamlanmış olur (Bioküre, 2011; Majors, 2013; Rejczak ve Tuzimski, 2015; Ibanez ve Cifuentes, 2017; Varela-Martinez ve ark., 2020; Bioneks, 2023; Quechers, 2023) (Şekil 2 ve 3).

QuEChERS yönteminin ilk adımında asetonitril, aseton ve etil asetat gibi çözücüler tercih edilebilir (Majors, 2013). Asetonitrilin daha çok tercih edilmesinin nedeni, seçiciliğinin diğerlerine göre daha yüksek olmasından ileri gelir. Birçok çalışmada, asetonitrilin diğer çözücülere kıyasla suyun uzaklaştırılması konusunda daha etkili olduğu belirtilmektedir. Asetonitril, lipofilik madde miktarını azaltırken, polar olmayan ve nispeten polar bileşikleri etkili bir şekilde ayırabilen bir organik çözücüdür. Bu nedenle, diğer çözücülerden daha çok tercih edilir. (Örneğin; aseton ve etil asetat) Asetonitril, suda çözünebildiğinden, numunelerin sulu fazına iyi bir şekilde nüfuz eder ve bu özelliğiyle dikkat çeker (Rejczak ve Tuzimski, 2015; Varela-Martinez ve ark., 2020).

Asetonitrilin birçok avantajı vardır, gaz kromatografisi (GC) analizlerinde buharlaşma sırasında yüksek oranda genleşme hacmi verme eğilimindedir ve diğer organik çözücülere göre daha az uçucudur. Bu nedenle, örnek buharlaştırıldığında asetonitril gaz fazına geçmez, bu da kromatografik uygulamalar için istenen bir sonuçtur. Ancak lipitlerin asetonitrildeki çözünürlüğü sınırlıdır. Bu durum, lipitlerde çözünen pestisitlerin analizini zorlaştırabilir ve polar olmayan pestisitlerin kaybına neden olabilir. Geri kazanım oranı, lipid/çözücü bölünme katsayısıyla orantılı olarak düşer. Bu da önemli bir dezavantaj olarak değerlendirilir (Anastassiades ve ark., 2002; Anastassiades ve ark., 2003; Anastassiades ve ark., 2006; Rejczak ve Tuzimski, 2015; Ibanez ve Cifuentes, 2017).

İnorganik bir tuzun suyla karışabilen bir organik çözücü karişımına eklenmesi, çözücünün karişımından ayrılmasına ve iki farklı fazın (bazen de üç farklı fazın) oluşmasına neden olur. Bu konuda Majors ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda; aseton, etil asetat, metanol, etanol ve asetonitril gibi suyla karışabilen organik maddeler için salting-out sistemleri oluşturulmuş

olup, geleneksel sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile ayrıştırılamayan birçok analit başarıyla ayrıştırılmıştır. Bu çalışmalarda, yüksek polariteye sahip çözücülerin kullanıldığı deneyler sayesinde, farklı kimyasal yapıdaki tuzların, farklı konsantrasyonlarının değişen derecelerde faz ayırmasına yol açtığını ortaya konulmuştur (Majors, 2013; Ibanez ve Cifuentes, 2017).

Ekstraksiyonun ilk aşamasında dikkat edilmesi gereken ana hususlar şunlardır:

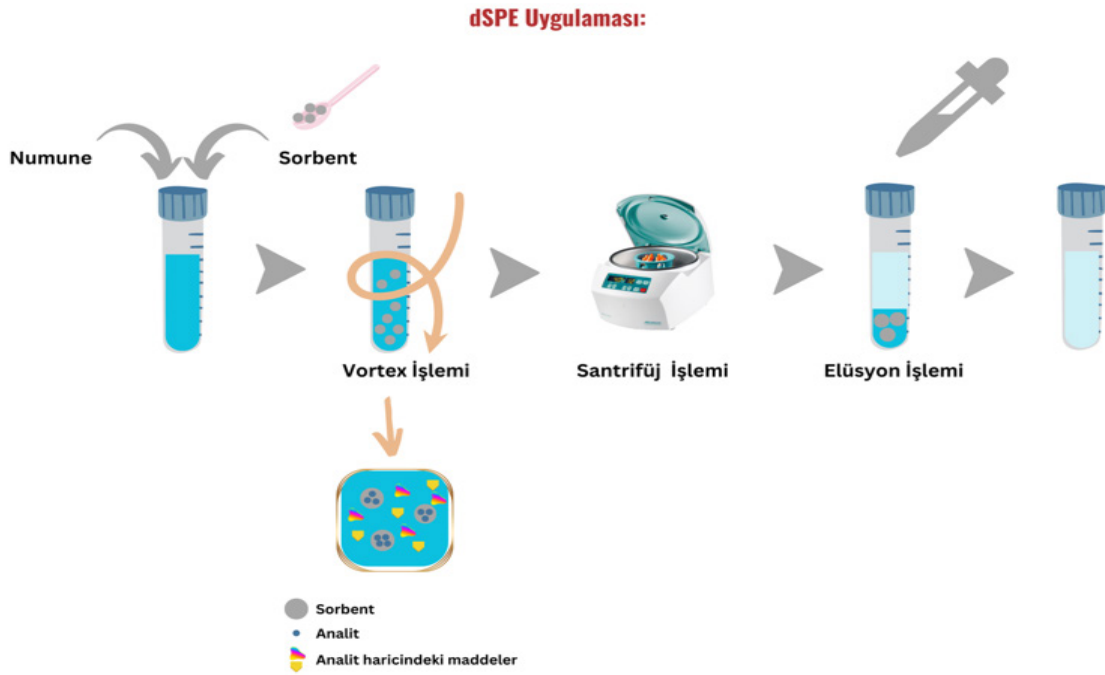
- Ekstraksiyon solventi seçimi ve numune/solvent oranı,
- Numune miktarı,
- Numune pH'sının geri kazanım değerleri üzerindeki etkisi;
- Faz ayırma için kullanılan tuzların türü ve miktarı (Anastassiades ve ark., 2002; Schenck ve ark., 2002; Anastassiades ve ark., 2003).

Ekstraksiyonun ikinci aşaması olarak kabul edilebilecek d-SPE aşamasında hangi sorbentin kullanılacağına matris tipine göre karar verilir;

- MgSO₄: Kalan suyu uzaklaştırmak için,
- PSA (Primer-Sekonder Amin): organik asitlerin uzaklaştırılması için,
- C18: uzun zincirli yağ asitleri ve polar olmayan bileşiklerin uzaklaştırılması için,
- GCB (Grafiteli Karbon): pigment, polifenol ve karbonların uzaklaştırılması için kullanılır (Anastassiades ve ark., 2002; Anastassiades ve ark., 2003; Anastassiades ve ark., 2006; Majors, 2007; Lehotay ve ark., 2010).

Dispersif katı faz ekstraksiyonu (dSPE), çeşitli bileşiklerin analizi için yaygın olarak kullanılan bir numune işleme tekniğidir. Bu yöntem, sıvı numunelere katı bir sorbentin eklenmesi ve sorbent ile analit arasında kurulan bağ sayesinde farklı analitlerin karmaşık matrislerden ayrıştırılmasına dayanır (Lehotay, 2011; Anumol ve ark., 2017). dSPE, geniş bir uygulama yelpazesi bulan ve seçici, sağlam ve çok yönlü bir teknik olarak kabul edilmektedir (Islas ve ark., 2017).

dSPE, geleneksel SPE yöntemiyle karşılaştırıldığında, analitlerin veya matris bileşenlerinin toplu çözeltilde ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği bir yöntemdir. Bu nedenle, dSPE yöntemi, vakum manifoldları, kolonlar, ön şartlandırma adımları ve çözücü



Şekil 3. dSPE uygulaması (Islas ve ark., 2017 temel alınarak oluşturulmuştur).

fraksiyonlarının toplanması, çözücülerin buharlaştırılması gibi aşamalar gerektirmez. Bu avantajlar, dSPE'yi geleneksel SPE yönteminden daha çok tercih edilen bir yöntem haline getirmektedir (Majors, 2013).

Dispersiyon işlemi tamamlandıktan sonra yüzeyinde analit tutulan sorbent, santrifüjleme veya filtrasyon gibi mekanik bir işlemle ayrılır. Kullanılan dSPE tekniğine göre sorbent, analiti veya matriste bulunan analit harici diğer maddeleri bağlayabilir (Şekil 2 ve 3). Bu durum temel alınarak santrifüj sonrasında supernatant (Şekil 2 ve 3) veya çökelti kısmı vialer alınacaktır. dSPE'nin öne çıkan özellikleri, geleneksel tekniklere göre daha basit ve kolay uygulanabilir olması, daha fazla numunenin daha kısa sürede analiz edilebilmesine olanak tanınması ve böylece numune işleme süresinin kısaltılmasıdır (Han, 2014).

Geleneksel dSPE'de kullanılan sorbent tür ve miktarları

- 50 mg PSA, 50 mg C18, 7,5 mg GCB, 150 mg MgSO₄ (2mL)
- 400 mg PSA, 400 mg C18, 60mg GCB, 1200 mg MgSO₄ (15mL)

QuEChERS yöntemiyle ilgili en büyük zorluk, aynı zamanda en büyük gücü olarak belirtilen son

derece esnek bir metodolojiye sahip olmasıdır. Bu, analiz edilecek materyale/materyallere göre çok sayıda farklı modifikasyonun kullanımı anlamına gelmektedir. Bu modifikasyonlar küçük veya büyük olabilir. Ancak, yöntemin uygulandığı yüzlerce üründe birçok pestisit için yüksek geri kazanım ve sağlam sonuçlar sağlanması, bu dezavantajı ortadan kaldırmaktadır (Perestrelo ve ark., 2019).

“Analitik yöntemler diş fırçası gibidir ve herkes kendi fırçasını kullanmayı tercih eder” benzetmesinde belirtildiği gibi, literatürde orijinal yöntem veya QuEChERS'in iki resmi versiyonunda sadece kişisel tercihlere veya sınırlı deneylere dayanan birçok değişiklik mevcuttur. Bazı durumlarda, yöntemi belirli bir uygulamaya daha uygun hale getirmek için değişiklikler gerekebilir, ancak çoğu çalışmada yapılan değişikliklerin sadece projeleri veya yayınları daha iyi gerekçelendirmek için farklı bir şey yapma ihtiyacından kaynaklandığı söylenebilir (Lehotay ve ark., 2010).

Quechers Metodları

Temelde üç QuEChERS metodundan bahsedilebilir. Bunlardan ikisi halihazırda resmi olarak valide metodlardır (AOAC method 2007.01, EN method 15662).

Orjinal QuEChERS metodu (tamponsuz)

- 4 veya 6 g MgSO₄, 1 veya 1.5 g NaCl

AOAC metod 2007.01 (AOAC) (Resmi Metod)

- 6 g MgSO₄, 1.5 g Na Asetat (Tampon)

EN metod 15662 (CEN) (Resmi Metod)

- 4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g Na Sitrat, 0.5 g disodyum sitrat seskihidrat (Tampon) (Lehotay, 2007; CEN, 2008; Agilent, 2010; González-Curbelo ve ark., 2015).

QuEChERS Modifikasyonları

Örnek matrisinden elde edilecek analitin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre QuEChERS metodunda çeşitli modifikasyonlara ihtiyaç duyulabilmektedir.

Tahıl numuneleri, su içeriği düşük (%25'in altında) matrislere sahip oldukları için, analitlerin numune matrisiyle olası etkileşimlerini azaltmak ve sonuç olarak numune matrisini kolayca ayrıştırılabilir hale getirmek için asetonitril eklenirken belirli bir miktar da su ilave edilmesi gerekmektedir (Mastovska ve ark., 2010).

Bazı analitler (örneğin pestisitler), MgSO₄ ekleme işlemi sırasında hidrasyon reaksiyonuna girerek numune sıcaklığını 45°C'nin üzerine çıkaran ekzotermik bir reaksiyon meydana getirebilirler. Bu reaksiyon analitlerin geri kazanımını olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu nedenle, MgSO₄ ve NaCl eklenmeden önce numunenin buzdolabında 30 dakika saklanması veya ekstraksiyon işlemi sırasında soğuk su (<4°C) eklenmesi, bu olumsuz etkiyi azaltabilir. pH'sı değişken olan analitlerde, pH'sı 5-5.5 aralığında tutarak bu analitlerin bozulmasını önlemek için, MgSO₄ ile birlikte trisodyum sitrat dihidrat, disodyum hidrojen sitrat seskihidrat veya asetik asit/sodyum asetat tamponlarından birinin başlangıç aşamasında eklenmesi, genellikle kullanılan bir yöntemdir (González-Curbelo ve ark., 2012).

QuEChERS Uygulama Alanları

Günümüzde dünya genelinde sürekli artan nüfusu beslemek için gıda üretimini artırma davranışı, pestisit kullanımının yaygınlaşmasına yol açmıştır. Bu nedenle, çok sınıflı pestisit kalıntı analizine yönelik yöntemler büyük ilgi görmeye başlamıştır (Lehotay ve ark., 2010; Santana-Mayor, 2019).

Çoklu pestisit kalıntı taraması için kullanılan birçok yöntem (MRM'ler), karmaşık, zahmetli, zaman alıcı ve yüksek miktarda çözücü gerektiren pahalı yöntemlerdir. Bu nedenle laboratuvarlar, analizler için harcanan süre göz önüne alındığında istedikleri sayıda numuneyi analiz edemezler (Varela-Martinez, 2020). Ayrıca, yaygın olarak kullanılan bu tarama yöntemleri ile bazik, asidik ve çok polar bileşikler gibi birçok önemli analit aynı anda tatmin edici bir şekilde elde edilemez. Bu tür analitleri elde etmek için laboratuvarların, tek bir analit elde etmeyi hedefleyen yöntemleri uygulaması gerekebilir, ancak bu da genellikle mümkün değildir. Bu yöntemlerin zorlukları ve yüksek maliyetleri, çoğu laboratuvar tarafından rutin olarak kullanılmamasına ve bu nedenle birçok pestisidin tespit edilememesine yol açar (Rejczak ve Tuzimski, 2015; Varela-Martinez, 2020).

QuEChERS, 2003 yılında piyasaya sürüldükten sonra, dünya çapında pestisit kalıntıları taraması için kabul gören bir yöntem haline gelmiştir. Geleneksel olarak sıvı-katı ekstraksiyonu, ardından sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve daha yakın zamanda katı faz ekstraksiyonu kullanılarak numune hazırlığı yapılmaktadır. Birçok araştırma makalesinde, QuEChERS analitik yaklaşımı kullanılarak çok çeşitli gıda maddelerinde çoklu pestisit kalıntıları taraması yapılmıştır. Pestisit kalıntılarının ekstraksiyonunda QuEChERS yönteminin kullanılmasına dair örnekler Tablo 2'de özetlenmiştir.

QuEChERS yöntemi resmi olarak ilk kez pestisit analizleri için yayınlanmış olmasına rağmen geliştirme aşamasında veteriner ilaçlarının analizinde kullanılmıştır. (Anastassiades ve ark., 2006). Gıdalarda bulunan veteriner ilaçları, alerjik reaksiyonlara neden olabileceği veya insanlarda kullanılan antibiyotiklere karşı direnç oluşturabileceği için toplum açısından potansiyel bir risk oluşturur. QuEChERS yaklaşımı, pestisit analizi dışındaki potansiyelini fark edilir şekilde ortaya koymuştur ve halihazırda farklı veteriner ilaçlarının analizlerinde aktif olarak kullanılmaktadır (Tablo 3).

Tahıllar, konsantre yemler, silajlar gibi hayvan yemlerinin yanı sıra sebze, meyve, baharat gibi insanlar tarafından tüketilen diğer tarım ürünleri, mikotoksinlerle kontamine olabilir. Kontamine gıda ve yemlerin kronik tüketimi, insanlarda ve hayvanlarda immünsüpresyon, karsinogenesisite, hepatotoksitesite, nefrotoksitesite ve üreme bozuklukları gibi sağlık sorunlarına neden olabilir (González-Jartín, 2021). Mikotoksin toksisitesi çok düşük

Tablo 2. Pestisit Analizi için Örnek Hazırlama Aşamasında QuEChERS Yöntemini Kullanan Çalışmalar.

Analit Sayısı	Matris tipi	QuEChERS Modifikasyonu	Geri Kazanım ve Tekrarlanabilirlik	LOQ (mg/kg)	Analiz Yöntemi	Referans
204 Pestisit	Midye, İstiridye	QuEChERS metodunda ekstraksiyon kısmı ACN, MgSO ₄ /NaCl ile, clean-up kısmı ise MgSO ₄ /PSA/C18, non-dilüsyon ile gerçekleştirilmiştir.	66-87%; RSD% <20%	0,01-0,1	UHPLC-QTOF-MS	Diallo ve ark., 2022
346 Pestisit	Bal	European Union SANTE/2019/12682	76-112%; RSD% <20%	0,002-0,008	GS-MSMS LC-MSMS	Oymen ve ark.,2022
107 Pestisit	Tereyağ, Koyun Don yağı, Domuz Yağı, Tavuk Yağı	Çeşitli dSPE uygulamaları	70%-120% (%RSD <20%)	0,01-0,05	LC-MSMS	Zhao ve ark., 2022

Tablo 3. Veteriner İlaçlarının Analizi için Örnek Hazırlama Aşamasında QuEChERS Yöntemini Kullanan Çalışmalar.

Analit Sayısı	Matris tipi	QuEChERS Modifikasyonu	Geri Kazanım ve Tekrarlanabilirlik	LOQ (mg/kg)	Analiz Yöntemi	Referans
48 Analit	Yumurta	Adsorbent olarak Fe ₃ O ₄ -MWCNT'ler kullanılan modifiye bir QuEChERS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.	60,5%-114,6% RSDs <20%	0,01-0,001	UHPLC-MSMS	Xu ve ark., 2019
9 Analit (Betalaktam Antibiyotikler)	Su Ürünleri	EN Metod, SANTE/12682/2019	85,4-113,3% %RSD: <15%	0,002-0,005	UHPLC-MSMS	Li ve ark., 2022
17 Analit (Klorpromazin ve Metabolitleri)	Hayvansal Gıda	EN15662	72-117%	0,001-0,002	UHPLC-Q-Orbitrap MS	Dai ve ark., 2023

konsantrasyonlarda ortaya çıkar, bu nedenle karmaşık ve zorlu matrislerde bu toksinlerin tespiti ve miktarının belirlenmesi için hassas ve güvenilir analitik yöntemlere ihtiyaç duyulur (Rahmani ve ark., 2009). Mikotoksin kalıntılarının ekstraksiyonu amacıyla QuEChERS yöntemi uygulanmasının seçilmiş örnekleri Tablo 4'te özetlenmiştir.

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar), iki veya daha fazla aromatik halka içeren organik bileşikler sınıfını temsil eder. Birçok farklı PAH, çeşitli yanma ve piroliz süreçleri sırasında açığa çıkabilir ve bu nedenle

PAH'lar, potansiyel toksisite ve karsinojenite kaynakları olarak kabul edilir (El Azab, 2022). Gıda matrisleri, özellikle karmaşık yapıları nedeniyle, izole edilmesi ve analizi zor olan düşük seviyelerde PAH'lar içerebilir (Efsa, 2008).

PAH'ların geleneksel ekstraksiyon yöntemleri genellikle;

- hekzan veya metilen klorür gibi polar olmayan veya düşük polar çözücülerle
- veya Soxhlet yöntemiyle ekstraksiyon ve ardından suda çözünen istenmeyen maddeleri

Tablo 4. Mikotoksinlerin Analizi için Örnek Hazırlama Aşamasında QuEChERS Yöntemini Kullanan Çalışmalar.

Analit Sayısı	Matris tipi	QuEChERS Modifikasyonu	Geri Kazanım ve Tekrarlanabilirlik	LOQ (mg/kg)	Analiz Yöntemi	Referans
9 Mikotoksin, Akrilamid, 5-Hidroksimetilfurfural	Bisküvi	d-SPE: clean-up (Aşama-2) Sorbent: EMR-lipid	7,11–115,59%, %RSD <15%	0,00002–0,005	UHPLC-MS/MS	Long ve ark., 2023
32 Mikotoksin	Peynir	EN15662 QuEChERS	>70%, %RSD <15%	0,02-0,282 (µg/kg)	UHPLC-MS/MS	Rodríguez-Cañás ve ark., 2023

Tablo 5. PAH Analizinde Kullanılmış QuEChERS Yöntemlerine Örnekler.

Analit Sayısı	Matris tipi	QuEChERS Modifikasyonu	Geri Kazanım ve Tekrarlanabilirlik	LOQ (mg/kg)	Analiz Yöntemi	Referans
13 PAH	Rat Plasma	7 mL ACN, yarım gram NaCl ve 2 g MgSO ₄ , clean-up aşamasında ise 0,6g susuz MgSO ₄ ve 0.07g PSA	85,57–109,64%; %RSD <10%,	0,045-1,128 (ng/kg)	GS-MS	El-Azab, 2022
20 PAH	Balık Eti	EN Metod 15662: 4 g MgSO ₄ ; 1 g NaCl; 1 g Trisodyum sitrat dihidrat; 0,5 g disodyum hidrojen-sitrat seskhidrat	83,87-98,10%; %RSD <1%	2	GS-MSMS	Tidiane Dione ve ark., 2022

gidermek için sabunlaştırma

- veya sıvı-sıvı ekstraksiyon ve SPE kullanılarak saflaştırmaya dayanmaktadır.

Bununla birlikte, bu yöntemler zahmetli ve zaman alıcıdır. Genellikle yetersiz saflaştırma ve kullanılan kromatografik analiz yöntemi kaynaklı düşük geri kazanımla sonuçlanır (Kao ve ark., 2012) (Tablo 5).

KAYNAKLAR

Agilent (2010). QuEChERS 101: The Basics and Beyond. Erişim Adresi: https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/Public/QuEChERS_101_10_11_01.pdf. Erişim Tarihi: 15.03.2023.

Ahmad, T., Masoodi, F. A., Rather, S. A., Wani, S. M. & Gull, A. (2019). Supercritical fluid extraction: A review. *J Biol Chem Chron*, 5 (1), 114-122.

Alampanos, V. & Samanidou, V. (2021). An overview of sample preparation approaches prior to liquid chromatography methods for the determination of parabens in biological matrices. *Microchemical Journal*, 164, 105995.

Ali, I., Suhail, M., Alharbi, O. M. & Hussain, I. (2019). Advances in sample preparation in chromatography for organic environmental pollutants analyses. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 42 (5-6), 137-160.

- Anastassiades, M. (2006). CRL-SRM 1st Joint CRL Workshop, Stuttgart. Erişim Adresi: http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/srm/1stws2006_lecture_anastassiades_quechers.pdf. Erişim Tarihi: 15.03.2023.
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J. & Štajnbaher, D. (2002). Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) approach for the determination of pesticide residues. WTQA 18th Annual Waste Testing & Quality Assurance Symposium.
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D. & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86 (2), 412-431.
- Anumol, T., Lehotay, S. J., Stevens, J. & Zweigenbaum, J. (2017). Comparison of veterinary drug residue results in animal tissues by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole or quadrupole–time-of-flight tandem mass spectrometry after different sample preparation methods, including use of a commercial lipid removal product. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409, 2639-2653.
- Bioküre, (2011). Protein Saflaştırmada Çöktürme Yöntemi. Erişim Adresi: <http://biyokure.org/2011/04/29/protein-saflastirmada-cokturme-yontemleri/>. Erişim Tarihi: 24.02.2023.
- Bioneks, (2023). QuEChERS. Erişim Adresi: <http://www.bioneks.com/quechers.html>. Erişim Tarihi: 24.02.2023.
- Bokhary, A., Leitch, M. & Liao, B. Q. (2021). Liquid–liquid extraction technology for resource recovery: Applications, potential, and perspectives. *Journal of Water Process Engineering*, 40, 101762.
- Capriotti, A. L., Cavaliere, C., La Barbera, G., Montone, C. M., Piovesana, S. & Laganà, A. (2019). Recent applications of magnetic solid-phase extraction for sample preparation. *Chromatographia*, 82, 1251-1274.
- Casado, N., Morante-Zarcelo, S. & Sierra, I. (2022). Application of the QuEChERS strategy as a useful sample preparation tool for the multiresidue determination of pyrrolizidine alkaloids in food and feed samples: A critical overview. *Applied Sciences*, 12 (9), 4325.
- CEN (2008). Foods of plant origin–Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE. QuEChERS-method. EN 15662, November 2008.
- Dai, J., Lin, H., Pan, Y., Sun, Y., Wang, Y., Qiao, J. Q., Lian, H. Z. & Xu, C. X. (2023). Determination of chlorpromazine and its metabolites in animal-derived foods using QuEChERS-based extraction, EMR-Lipid cleanup, and UHPLC-Q-Orbitrap MS analysis. *Food Chemistry*, 403, 134298.
- Diallo, T., Makni, Y., Lerebours, A., Thomas, H., Guérin, T. & Parinet, J. (2022). Development and validation according to the SANTE guidelines of a QuEChERS-UHPLC-QTOF-MS method for the screening of 204 pesticides in bivalves. *Food Chemistry*, 386, 132871.
- Efsa, E. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons in food. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *The EFSA Journal*, 724 (1), 1-114.
- El Azab, N. F., Hotar, S. F. & Trabik, Y. A. (2022). Investigation of a QuEChERS-based method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in rat plasma by GC–MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 46 (4), 432-442.
- González-Curbelo, M. Á., Herrera-Herrera, A. V., Ravelo-Pérez, L. M. & Hernández-Borges, J. (2012). Sample-preparation methods for pesticide-residue analysis in cereals and derivatives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 38, 32-51.
- González-Curbelo, M. Á., Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A. V., González-Sálamo, J., Hernández-Borges, J. & Rodríguez-Delgado, M. Á. (2015). Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 169-185.
- González-Jartín, J. M., Rodríguez-Canas, I., Alfonso, A., Sainz, M. J., Vieytes, M. R., Gomes, A., Ramos, I. & Botana, L. M. (2021). Multianalyte method for the determination of regulated, emerging and modified mycotoxins in milk: QuEChERS extraction followed by UHPLC–MS/MS analysis. *Food Chemistry*, 356, 129647.

- Han, L., Sapozhnikova, Y. & Lehotay, S. J. (2014). Streamlined sample cleanup using combined dispersive solid-phase extraction and in-vial filtration for analysis of pesticides and environmental pollutants in shrimp. *Analytica Chimica Acta*, 827, 40-46.
- Islas, G., Ibarra, I. S., Hernandez, P., Miranda, J. M. & Cepeda, A. (2017). Dispersive solid phase extraction for the analysis of veterinary drugs applied to food samples: a review. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2017.
- Ibanez, E. & Cifuentes, A. (2017). Green extraction techniques: principles, advances and applications. 1st Edition.
- Jalili, V., Barkhordari, A. & Ghiasvand, A. (2020). A comprehensive look at solid-phase microextraction technique: A review of reviews. *Microchemical Journal*, 152, 104319.
- Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., Walker, S. & Widmer, M. (2022). Improving the QuEChERS Liquid/Liquid Extraction of Analytes With Widely Varying Physicochemical Properties: Example of 201 Veterinary Drugs in Milk. *Journal of AOAC International*, 105 (4), 1030-1042.
- Kinsella B., Whelan M., Cantwell H., McCormack M., Furey A., Lehotay S. J. & Danaher, M. (2010). A dual validation approach to detect anthelmintic residues in bovine liver over an extended concentration range, *Talanta*, 83 (1), 14-24.
- Kole, P. L., Venkatesh, G., Kotecha, J. & Sheshala, R. (2011). Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomedical Chromatography*, 25 (1-2), 199-217.
- Lehotay, S. (2007). AOAC official method 2007.01 pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with Magnesium Sulfate. *Journal of AOAC International*, 90 (2), 485-520.
- Lehotay, S. J., Anastassiades, M. & Majors, R. E. (2010). The QuEChERS Revolution. *Lc Gc Europe*, 23 (9), 418-428.
- Lehotay, S. J. (2011). QuEChERS sample preparation approach for mass spectrometric analysis of pesticide residues in foods. *Mass Spectrometry in Food Safety: Methods and Protocols*, 65-91.
- Li, W. K. & Shi, Y. P. (2019). Recent advances and applications of carbon nanotubes based composites in magnetic solid-phase extraction. *TrAc Trends in Analytical Chemistry*, 118, 652-665.
- Long, Y., Huang, Y., Zhu, M., Ma, Y., Gan, B., Wang, Y., Yu, Q., Xie, J. & Chen, Y. (2023). Development of QuEChERS clean-up based on EMR-lipid for simultaneous analysis of 9 mycotoxins, acaylamide and 5-Hydroxymethylfurfural in biscuit by UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 409, 135265.
- Majors R. E. (2007). Modern techniques for the extraction of solid materials - an update. *Lc Gc Europe*, 20 (2), 574-576.
- Majors R. E. (2013). Sample preparation fundamentals for chromatography, Agilent Technologies, Mississauga, Canada.
- Mastovska, K., Dorweiler, K. J., Lehotay, S. J., Wegscheid, J. S. & Szpylka, K. A. (2010). Pesticide multiresidue analysis in cereal grains using modified QuEChERS method combined with automated direct sample introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (10), 5959-5972.
- Oymen, B., Aşır, S., Türkmen, D. & Denizli, A. (2022). Determination of multi-pesticide residues in honey with a modified QuEChERS procedure followed by LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Journal of Apicultural Research*, 61 (4), 530-542.
- Ötles, S. & Kartal, C. (2016). Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and applications in food samples. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 15 (1), 5-15.
- Quechers, (2023). QuEChERS: About the Method. Erişim Adresi: <https://www.quechers.eu/method>. Erişim Tarihi: 24.02.2023.
- Pavlović, D. M., Babić, S., Horvat, A. J. & Kaštelan-Macan, M. (2007). Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *TrAc Trends in Analytical Chemistry*, 26 (11), 1062-1075.
- Pawliszyn, J., Pawliszyn, B. & Pawliszyn, M. (1997). Solid phase microextraction (SPME). *The Chemical Educator*, 2 (4), 1-7.

- Perestrelo, R., Silva, P., Porto-Figueira, P., Pereira, J. A., Silva, C., Medina, S. & Câmara, J. S. (2019). QuEChERS-Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. *Anal Chim Acta*, 1070, 1–28.
- Rahmani, A., Jinap, S. & Soleimany, F. (2009). Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8 (3), 202-251.
- Rejczak, T. & Tuzimski, T. (2015). A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chemistry*, 13 (1).
- Rodríguez-Cañás, I., González-Jartín, J. M., Alvarino, R., Alfonso, A., Vieytes, M. R. & Botana, L. M. (2023). Detection of mycotoxins in cheese using an optimized analytical method based on a QuEChERS extraction and UHPLC-MS/MS quantification. *Food Chemistry*, 408, 135182.
- Šafaříková M. & Šafařík I. (1999). Magnetic solid-phase extraction. *J Magn Magn Mater*, 194, 108–112.
- Santana-Mayor, Á., Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A. V. & Rodríguez-Delgado, M. Á. (2019). Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116, 214-235.
- Schenck F. J., Callery P., Gannett P. M., Daft J. R. & Lehotay S. J. (2002). Comparison of magnesium sulfate and sodium sulfate for removal of water from pesticide extracts of foods. *JAOAC Int*, 85 (5), 1177-1180.
- Simpson, N. J. (2000). Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications. CRC Press.
- Tidiane Dione, C., Delhomme, O., Diagne, I., Diebakate, C., Ndiaye, B., Cisse, D., Hane, M., Mor Dione, M., Diouf, S., Diop, A., Ndiaye, M. & Millet, M. (2022). Application of the QuEChERS method for the determination of pesticides, PAHs and PCBs in fish in Senegal. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 57 (10), 869-879.
- Web of Science, 2023. QuEChERS. Erişim Adresi: <https://www.webofscience.com/wos/alldb/citation-report/dfc0e143-900a-411b-b6ae-eea30db980a3-90d5baab>. Erişim Tarihi: 12.06.2023.
- Yamini, Y., Rezazadeh, M. & Seidi, S. (2019). Liquid-phase microextraction–The different principles and configurations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 112, 264-272.
- Yavuz, O. & Aksoy, A. (2006). Örnek Hazırlamada Katı Faz Ekstraksiyonu Metodu. *FÜ Sağlık Bil Dergisi*, 20 (3), 259-269.
- Varela-Martinez, D. A., Gonzalez-Salamo, J., Gonzalez-Curbelo, M. Á. & Hernandez-Borges, J. (2020). Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) extraction. In: *Liquid-Phase Extraction* (pp. 399-437). Elsevier.
- Vigano, J., Machado, A. P. F. & Martínez, J. (2015). Sub- and supercritical fluid technology applied to food waste processing. *The Journal of Supercritical Fluids*, 96, 272-286.
- Xu, X., Xu, X., Han, M., Qiu, S. & Hou, X. (2019). Development of a modified QuEChERS method based on magnetic multiwalled carbon nanotubes for the simultaneous determination of veterinary drugs, pesticides and mycotoxins in eggs by UPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 276, 419-426.
- Zhang, J. & Hu, B. (2013). Liquid-Liquid Extraction (LLE). *Separation and Purification Technologies in Biorefineries*, 61-78.
- Zhao, H., Zhao, Z., Li, X., Di, S., Qi, P., Wang, Z., Wang, J., Tian, P., Xu, H. & Wang, X. (2022). Development of rapid low temperature assistant modified QuEChERS method for simultaneous determination of 107 pesticides and relevant metabolites in animal lipid. *Food Chemistry*, 395, 133606.



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association
e-ISSN: 2667-8381

Özge ERDOĞAN

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü Veterinerlik Mikrobiyolojisi
Anabilim Dalı, Ankara

ORCID: 0000-0003-1721-1579

***Sorumlu Yazar:** Özge ERDOĞAN
E-Posta: ozgeerdogan21@gmail.com

Geliş Tarihi: 23.11.2022

Kabul Tarihi: 11.08.2023

14 (2): 72-78, 2023

DOI: 10.38137/vftd.1208878

**SALMONELLA CRISPR-Cas SİSTEMİ'NİN TEMEL
ÖZELLİKLERİ**

ÖZET. Son yıllarda keşfedilen CRISPR-Cas sistemi, CRISPR dizileri (düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri) ve Cas (CRISPR ilişkili proteinler) genlerinden oluşmaktadır. 1987 yılında bu tekrar kümeleri ilk olarak *Escherichia coli*'de keşfedilmiş ancak fonksiyonları tanımlanamamıştır. Günümüzde *Salmonella* da dahil olmak üzere bakteri genomlarının yaklaşık % 45'inde bulunan CRISPR-Cas sisteminin bakterilerin nükleik asit tabanlı adaptif bağışıklık sisteminin temel bileşenleri olduğu bilinmektedir. CRISPR-Cas bölgelerinin analizine dayalı çalışmaların son yıllarda oldukça artması, CRISPR tabanlı teknolojilerin ve uygulamaların çoğalması bu alanda yapılan çalışmaların etkinliğini de giderek artırmaktadır. Bu derlemede CRISPR-Cas sistemi ve *Salmonella*'da mevcut olan CRISPR bölge özellikleri ile kullanım alanları hakkında bilgi verilecektir

Anahtar Kelimeler: CRISPR, Moleküler tiplendirme, *Salmonella*.

**KEY FEATURES OF SALMONELLA CRISPR-Cas
SYSTEM**

ABSTRACT. The CRISPR-Cas system, discovered in recent years, consists of CRISPR sequences (clusters of regularly spaced palindromic repeats) and Cas (CRISPR-associated proteins) genes. These repeat clusters were first discovered in *Escherichia coli* in 1987, but their function has not been defined. It is known that the CRISPR-Cas system, which is present in approximately 45% of bacterial genomes, including *Salmonella*, is the essential component of the nucleic acid-based adaptive immune system of bacteria. The increase in studies based on the analysis of CRISPR-Cas regions and the proliferation of CRISPR-based technologies and applications increase the effectiveness of studies in this field. In this review, information will be given about the CRISPR-Cas system and the CRISPR region features and usage areas in *Salmonella*.

Keywords: CRISPR, Molecular typing, *Salmonella*.

Makale atfı

Erdoğan, Ö. (2023). *Salmonella* CRISPR-Cas Sistemi'nin Temel Özellikleri, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni, 14 (2), 72-78. DOI: 10.38137/vftd.1208878.

GİRİŞ

CRISPR-Cas sistemi son yıllarda keşfedilen, bakteri ve arkeaların kendilerini koruyarak yabancı genetik materyale karşı kazanılmış bağışıklığı sağladığı adaptif immün sistem olarak tanımlanmaktadır.

CRISPR-Cas sistemi; CRISPR dizileri (düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri) ve Cas (CRISPR ilişkili proteinler) genlerinden oluşmaktadır (Grissa ve ark., 2007a). CRISPR dizileri ilk olarak 1987 yılında *Escherichia coli*'de belirlenmiştir ancak o zamanlar ne olduğu anlaşılamamıştır. 2005 yılında üç bağımsız araştırma grubu tarafından bu tekrar kümelerinin arasında kalan DNA dizilerinin bazılarının o canlıyı enfekte eden virüslerin ve plazmidlerin DNA'sının bir kısmı ile benzerlik gösterdiği ortaya konmuştur. Virüs DNA'sı ile aynı diziyeye sahip olmanın da o virüse karşı bir direnç geliştirdiği gözlenmiştir (Mojica ve ark., 2009). Böylece CRISPR'lerin bakteri ve arkeaların yeni bir savunma sistem biçimi olarak görev yaptığı anlaşılmıştır (Grissa ve ark., 2007a).

Hayvansal orijinli patojenler arasında ilk sıralarda *Salmonella*'lar yer almaktadır. Son yıllarda *Salmonella* da dahil olmak üzere bakteri genomlarının analizine dayalı yenilikçi ve güçlü tiplendirme yöntemleri geliştirilmiştir (Barrangou ve Dudley, 2016). PCR temelli teşhis yöntemlerinin zaman, hassaslık ve kolay uygulanabilirlik açısından avantajlı olması, CRISPR-Cas

bölgelerinin *Salmonella* identifikasyonunda kullanımını artırmıştır (Oliveira ve ark., 2002).

Günümüze kadar birçok *Salmonella* CRISPR lokusu, alt tip protokollerinin geliştirilmesi (Liu ve ark., 2011a; Fabre ve ark., 2012; DiMarzio ve ark., 2013; Shariat ve ark., 2013a) veya *Salmonella* filogenisinin daha iyi anlaşılması (Fricke ve ark., 2011; Pettengill ve ark., 2014) amacıyla analiz edilmiştir.

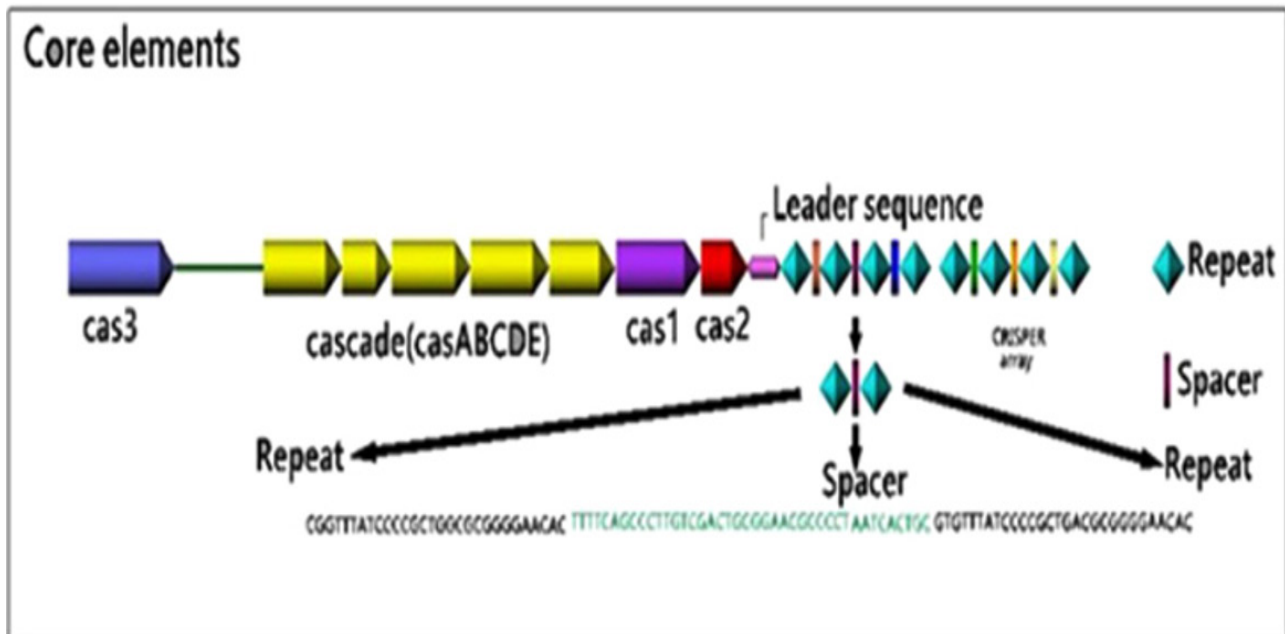
Bu derlemede CRISPR-Cas sistemi hakkında genel bilgiler ile birlikte *Salmonella*'larda ki CRISPR bölge özellikleri ve bu bölgelerin değişkenliği değerlendirilerek moleküler tiplendirmede kullanımıyla ilgili bilgiler verilecektir.

CRISPR-Cas SİSTEMİ

CRISPR-Cas sistemi, bakteri ve arkeaların yabancı genetik materyale karşı kendilerini koruyarak adaptif bağışıklığı sağladığı bir sistemdir (Barrangou ve Marraffini, 2014). Bu sistem Cas gen dizisi, bir lider dizi ve CRISPR dizi genlerinden oluşmaktadır (Shariat ve ark., 2015). Şekil 1'de bir CRISPR lokus örneği gösterilmiştir.

CRISPR dizisi

Bir CRISPR dizisi tekrar (repeat) ve aralık (spacer) bölgelerinden oluşmaktadır. Tekrar bölgeleri 21-48 baz çifti (bp) uzunluğunda iyi korumuş bölgeler olup CRISPR lokuslarında farklı uzunlukta ve sekansta bulunabilmektedir. CRISPR lokuslarında genellikle 2-100



Şekil 1. CRISPR lokusu (Karimi ve ark., 2018).

tekrar bölgesi olduğu gözlenmiştir (Barrangou ve Oost, 2013). Tekrar bölgelerindeki bu farklılıklara rağmen çoğu 3' sonunda, Cas proteinlerinin bağlanma alanı olan korunmuş GAAA(C/G) motifi içermektedir (Kunin ve ark., 2007).

CRISPR bölgesindeki aralık bölgeleri ise 26-72 bp arasında olup kendine özgü nükleotid dizisine sahiptir. CRISPR savunma sisteminin önemli parçalarından olan aralık bölgeleri virüs veya plazmidlerin genetik elementleri olup CRISPR savunma sistemine eklenerek katkıda buldukları saptanmıştır (Fabre ve ark., 2012). Bu aralıklar CRISPR'in genellikte tek tarafından eklenerek bakteriyi enfekte eden virüslerin kronolojik sırasını oluşturmaktadır (Rath ve ark., 2015).

CRISPR lokus sayısı ve her bir lokusun uzunluğu farklılık gösterebildiği gibi genomda bir veya çoklu CRISPR bölgesi de mevcut olabilmektedir (Horvath ve Barrangou, 2010). CRISPR sayısı ve uzunluğu genomun uzunluğu ile ilişkili olmayıp en küçük genoma sahip bakterilerin çoklu CRISPR bölgesi içerebildiği gözlenmiştir (Sorek ve ark., 2013).

Lider Sekans

CRISPR lokuslarında AT (adenin, timin) nükleotitleri yönünden zengin olan, korunmuş sekansların bulunduğu bu bölge genlerin ekspresyonunun kontrolünde görevlidir. Lider sekanslar 100-500 bp uzunluğunda olup tekrar bölgelerinin bitişiğinde bulunmaktadır. CRISPR lokusunun transkripsiyonu için ana promotör bölgelerini taşıyıp ilk tekrarın yakınında veya etrafında bulunan aralık bölgesine yeni aralıkların eklenmesini sağlamaktadır. Genel olarak, lider diziler sadece CRISPR dizisinin yakınında bulunup, genomun başka bir yerinde mevcut değildir (Jansen ve ark., 2002).

Cas genleri

Birbirinden farklı genlerin bir araya gelmesiyle oluşan, CRISPR dizisinin yanına yerleşim gösteren bu bölge Cas gen bölgesi olarak adlandırılmaktadır (Horvath ve Barrangou, 2010). Cas genleri nükleik asitlerle etkileşmektedir. CRISPR I ilişkili csn1-like geninin inaktive edilip faj kökenli aralıkların bulunmasına rağmen faja karşı geliştirilmiş olan direncin kaybedilmiş olmasıyla Cas proteinlerinin CRISPR savunma mekanizmasında görevli oldukları anlaşılmıştır (Barrangou ve ark., 2007). CRISPR içeren genomlarda öncelikle 4 çeşit Cas geni

belirlenmiş ancak yapılan çalışmalar arttıkça 45 civarı farklı gen ailesi varlığı saptanmıştır (Haft ve ark., 2005). Cas genlerinin farklılık göstermesi, CRISPR bölgelerinin çoklu mevcudiyeti ve canlılar arasında geçişlerin oluşu CRISPR-Cas sisteminin sınıflandırılmasını güçleştirmektedir (Rath ve ark., 2015).

CRISPR bölgesinin özelliğine ve Cas protein çeşitliliğine göre CRISPR-Cas sistemleri I, II ve III olmak üzere 3 ana tipe ve IA-F, IIA-C ve IIIA-B olmak üzere 11 alt tipe sınıflandırılmaktadır (Jiang ve Doudna, 2015). CRISPR-Cas sisteminin tek bir organizmada aynı anda farklı tipte bulunması da mümkündür (Rath ve ark., 2015). Tip II sistemi ise en çok kullanılan CRISPR-Cas sistemidir.

CRISPR-Cas bağışıklık sistemi hücre içerisinde immüniteyi; Yabancı DNA'nın adaptasyonu, CRISPR RNA (crRNA) biyosentezi ve hedefleme olmak üzere 3 adımda gerçekleştirilmektedir. İlk aşama olan adaptasyonda, yabancı nükleik asitten gelen aralık kısımlarının CRISPR bölgesine yerleştirildiği gözlenmiştir (Barrangou ve Marraffini, 2014). Bazı CRISPR-Cas sistemlerinde adaptasyon yalnızca istilacı genomdaki protoaralık bitişik motifi (PAM) olarak adlandırılan bölgenin tanınmasıyla ve sonrasında CRISPR lokusuna yerleştirilmesiyle meydana gelmektedir (Deveau ve ark., 2008; Horvath ve ark., 2008). Bu PAM'ların 2-5 nükleotitten oluşan iyi korunmuş bölgeler olduğu belirtilmiştir (Barrangou ve Marraffini, 2014). Plazmid ve fajların genomlarında bulunan PAM sekansına sahip olanların aralık kısmı tekrar genleriyle birlikte CRISPR bölgesine yerleştirilmektedir. PAM dizilerinde meydana gelen değişimler fajın CRISPR bağışıklığından kaçmasına sebep olmaktadır (Jiang ve Doudna, 2015). Sonraki aşama CRISPR lokuslarının crRNA'lara kopyalanıp işlendiği aşama olup bu amaçla istilacı genom'daki hedef sekans öncül CRISPR RNA'lara (pre-crRNA) transkribe edilmektedir. Pre-crRNA'lar daha sonra Cas proteinleri tarafından küçük crRNA'lara dönüştürülmektedir (Barrangou ve Marraffini, 2014; Nishimasu ve ark., 2014; Savic ve Schwank, 2016). Üçüncü ve son aşama hedefleme aşaması olup hedef nükleik asit, crRNA ve Cas proteinlerinin birlikte göreviyle tanınıp yok edilmektedir (Rath ve ark., 2015).

Salmonella' da CRISPR-Cas SİSTEMİ

Salmonella CRISPR I ve CRISPR II olmak üzere 2 adet CRISPR lokusuna sahiptir (Jansen ve ark., 2002; Fricke

ve ark., 2011; Touchon ve Rocha, 2010). Şekil 2'de *Salmonella* CRISPR-Cas lokusu örneği gösterilmektedir.

Tip 1-E CRISPR-Cas sistemini içeren *Salmonella*'da cas3, cse1, cse2, cas7, cas5, cas6, cas1 ile cas2 genleri olmak üzere toplam 8 gen bulunmaktadır (Makarova ve ark., 2006). CRISPR I'deki 8 adet gen gri oklar ile gösterilmiştir. Koyu gri ile de Tip 1 sisteminin belirgin geni olan cas3 belirtilmiştir. Cas1 ve cas2 genleri ise tüm CRISPR-Cas tiplerinde bulunmaktadır (Shairat ve ark., 2015).

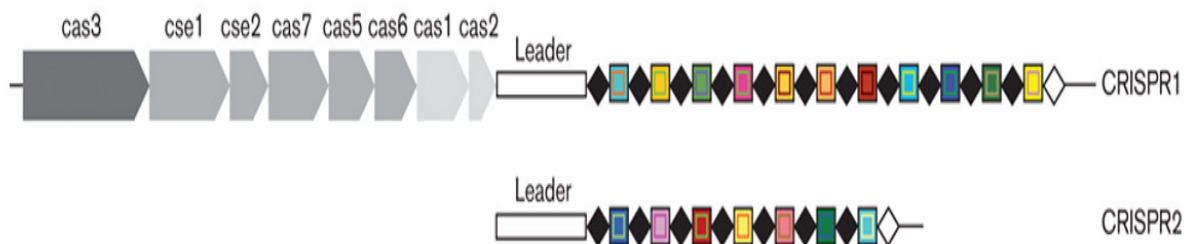
CRISPR I lokusu CRISPR II'ye göre daha iyi korunmakta olup tekrar bölgeleri 24-47 nükleotitten oluşurken, aralık kısımları 21-72 nükleotit uzunluğundadır (Grissa ve ark., 2007; Horvath ve Barrangou, 2010).

Şimdiye kadar analiz edilen 38 *Salmonella* genomunun 35'inde Tip 1-E CRISPR-Cas sistemi mevcut iken *S. Pullorum* S06004, *Javiana* ve *Paratyphi B*'de Cas geni saptanamamıştır (Medina-Aparicio ve ark., 2018).

Fabre ve ark. (2012) tarafından insanlarda *Salmonella* enfeksiyonuna sebep olan toplam 130 serotipin CRISPR dizileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda yaygın serotipler olan *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* gibi suşların CRISPR dizilerinin mikroevrimi sonucu alt tiplerine ayırt edilmesinin kolaylaştığı belirtilmiştir. *S. enterica* ve *S. bongori*'den toplam 39 genomda ise 2 CRISPR lokusunda toplam 705 aralık tespit edilmiş olup CRISPR I'deki aralık sayısı 1 ile 55, CRISPR II'deki aralık sayısını ise 0 ile 52 arasında olduğu gözlenmiştir. CRISPR I ve CRISPR II'nin basit bir PCR uygulaması sonrası agaroz gel elektroforez ve PCR ürünlerinin boyutlandırılmasıyla salgın ile salgın olmayanların ayırımında faydalı bir tarama aracı olduğu belirtilmektedir.

Serovar Enteritidis, Typhimurium, Newport, Heidelberg'den sırasıyla 141, 84, 86 ve 89 olmak üzere toplam 400 *Salmonella* izolatının CRISPR I ve CRISPR II analizi sonucunda 4 serovar arasında sırasıyla CRISPR I ve CRISPR II için 61 ve 68 farklı array bulunmuştur (Shariat ve ark., 2013a; Shariat ve ark., 2013b; Shariat ve ark., 2013c). Serovar Typhimurium'un her iki lokus için en fazla sayıda farklı diziyeye sahip olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada ve diğerlerinde gösterildiği gibi (Liu ve ark., 2011a; Fabre ve ark., 2012; Shariat ve ark., 2013a) *Salmonella* CRISPR dizilerindeki polimorfizmlerin çoğu aralayıcı-tekrar birimlerinin silinmesinin bir sonucu olarak mevcut olsa da çoğunlukla buna aralık kayıplarının sebep olduğu belirtilmiştir.

Xie ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada 1962 ile 2015 yılları arasında farklı bölgelerden toplanan 655 adet *S. Pullorum* suşunun CRISPR sekanslarını analiz etmiştir. WGST ile birlikte CRISPR tiplendirme metodunu kombine ederek yaptıkları çalışma sonucu gösterdi ki CRISPR lokusları alt tiplene ve suşların karşılaştırmalı analizlerini değerlendirmek için faydalı olmaktadır. Bunlara ek olarak, CRISPR'in, WGST analizi tarafından tanımlanan ana soyları tanımlayabildiği belirtilmiştir. Örneğin sekans tipi 10 sadece Çin'in Anhui'dan toplanan 6 suшта saptanırken ve CRISPR I aralıkları yokken, Avrupa ve Güney Amerika'dan toplanan 26 izolatta 8 farklı dizi mevcut olup bunlar Çin'den izole suşlarda bulunmamaktadır. Böylelikle aralıkların farklı bölgeleri karakterize eden DNA parmak izi görevi görebileceği belirtilmiştir. Bu çalışma ile CRISPR lokuslarının sadece izolatlar arasındaki ilişkiyi yansıtmakla kalmayıp suşlar ve çevreleri arasındaki ilişkiyi de yansıttığı saptanmıştır.



Şekil 2. *Salmonella* CRISPR-Cas lokusu (Shairat ve ark., 2015).

Üstelik, WGST ile karşılaştırıldığında, CRISPR ile tiplendirmenin çok daha basit ve daha uygun maliyetli olduğu belirtilmiştir. Tüm bunların sonucunda CRISPR'a dayanan yöntemlerin ümit verici olduğu görülmektedir.

138 *S. Infantis* suşu kullanarak yapılan diğer bir çalışmada 2 adet CRISPR I ile 5 adet CRISPR II alleli tespit edildiği, CRISPR I de olan farklılığın tek bir aralıktan, CRISPR II de olan farklılığın ise kayıp ya da duplike olmuş aralıklardan kaynaklandığı belirtilmiştir. *S. Infantis*'in CRISPR lokuslarındaki allel farklılığının daha önce başka serovarlar ile yapılan çalışmalarda tespit edilene göre az olduğu belirtilmektedir (Richards ve ark., 2020). Örneğin 161 *S. Enteritidis* izolatında yaptıkları çalışmada CRISPR I ve CRISPR II'de 7 allel bulunduğu (Shariat ve ark., 2013a) ve yine başka bir çalışmada 40 *S. Kentucky* izolatında 13 adet CRISPR I ve 7 adet CRISPR II alleli mevcudiyeti belirlenmiştir (Vosik ve ark., 2018).

CRISPR lokusunda değişkenliği değerlendirmek için çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Türler göre farklı CRISPR temelli genotiplendirmeler yapılabilmektedir. Farklı suşlardaki CRISPR lokusları aralık dizi kayıpları, tek nükleotid polimorfizmi, bakteriyofaj varlığı, plazmid replikasyonu gibi sebeplerle değişebilmektedir (Barrangou ve ark., 2007).

Sonuç olarak, bakteri suşlarında CRISPR lokuslarının analizi genotiplendirme ve epidemiyolojik çalışmalarda oldukça potansiyele sahiptir (Barrangou ve Marraffini, 2014). Günümüze kadar 64 *Salmonella* serovarının CRISPR-Cas sisteminin değerlendirilmesiyle her iki CRISPR dizisinin uzunluğunda yüksek bir çeşitlilik gösterilmiştir (Pettengill ve ark., 2014). Bu yüksek çeşitlilikteki CRISPR verilerinin değerlendirilmesi için yeni biyoinformatik araçların kullanılması ve bu dizilerin görselleştirilmesi, epidemiyolojik araştırmalara katkı sağlayacaktır. Ayrıca farklı popülasyonlarda CRISPR lokuslarının aralık bölge analizleri epidemiyolojik çalışmalar için kronolojik ve coğrafi olarak bilgi vermekte ve çeşitliliği göstermektedir. CRISPR'lerin *Salmonella* izolatlarının moleküler tiplendirilmesinde ve alt tiplendirilmesinde kullanıma uygun güçlü bir yöntem olduğu yapılan çalışmalar ve ortaya konulan sonuçlarda görülmektedir. Avantajları dikkate alındığında, CRISPR analizlerinin, mevcut altın standart yöntemlere alternatif olduğu anlaşılmıştır. CRISPR ile tiplendirmenin hızı da dikkate alındığında salgın hastalıkların incelenmesine de büyük bir katkısı olduğu görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Barrangou, R. & Dudley, E. G. (2016). CRISPR-based typing and next-generation tracking technologies. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7, 395–411.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315, 1709–1712.
- Barrangou, R. & Marraffini, L. A. (2014). CRISPR-Cas Systems: Prokaryotes Upgrade to Adaptive Immunity. *Molecular Cell*, 54, 234- 244.
- Barrangou, R. & van der Oost, J. (2013). CRISPR-Cas systems: RNA-mediated adaptive immunity in bacteria and archaea. Heidelberg, Germany: Springer; 2013. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-34657-6>.
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J. E., Labonté, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Romeo, D. A., Horvath, P. & Moineau, S. (2008). Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, 190 (4), 1390–1400.
- DiMarzio, M. J., Shariat, N., Kariyawasam, S., Barrangou, R. & Dudley, E. G. (2013). Antibiotic resistance in *Salmonella* Typhimurium associates with CRISPR sequence type. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 4282–4289.
- Fabre, L., Zhang, J., Guigon, G., Le Hello, S., Guibert, V., Accou-Demartin, M., de Romans, S., Lim, C., Roux, C., Passet, V., Diancourt, L., Guibourdenche, M., Issenhuth-Jeanjean, S., Achtman, M., Brisse, S., Sola, C. & Weill, F. X. (2012). CRISPR typing and subtyping for Improved Laboratory Surveillance of *Salmonella* Infections. *PLoS One*, 7 (5), e36995.
- Fricke, W. F., Mammel, M. K., McDermott, P. F., Tartera, C., White, D. G., Leclerc, J. E., Ravel, J. & Cebula, T. A. (2011). Comparative genomics of 28 *Salmonella enterica* isolates: evidence for CRISPR-mediated adaptive sublineage evolution. *Journal of Bacteriology*, 193, 3556–3568.
- Grissa, I., Vergnaud, G. & Pourcel, C. (2007). The CRISPRdb database and tools to display

- CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, 8, 172.
- Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F. & Nelson, K. E. (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Computational Biology*, 1, e60.
- Horvath, P. & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 327, 167–170.
- Horvath, P., Romero, D. A., Coûté-Monvoisin, A. C., Richards, M., Deveau, H., Moineau, S., Boyaval, P., Fremaux, C. & Barrangou, R. (2008). Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, 190 (4), 1401–1412.
- Jansen, R., Embden, J. D., Gaastra, W. & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43, 1565–1575.
- Jiang, F. & Doudna, J. A. (2015). The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Structural Biology*, 30, 100-111.
- Karimi, Z., Ahmadi, A., Najafi, A. & Ranjbar, R. (2018). Bacterial CRISPR Regions: General Features and their Potential for Epidemiological Molecular Typing Studies. *The Open Microbiology Journal*, 12, 59-70.
- Kunin, V., Sorek, R. & Hugenholtz, P. (2007). Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biology*, 8 (4), R61.
- Liu, F., Barrangou, R., Gerner-Smidt, P., Ribot, E. M., Knabel, S. J. & Dudley, E. G. (2011a). Novel virulence gene and clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) multilocus sequence typing scheme for subtyping of the major serovars of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 1946–1956.
- Makarova K. S., Grishin N. V., Shabalala S. A., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of shahypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*, 1, 7.
- Medina-Aparicio, L., Dávila, S., Rebollar-Flores, J. E., Calva, E. & Hernández-Lucas, I. (2018). The CRISPR-Cas system in Enterobacteriaceae. *Pathogens and Disease*, 76.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 155, 733-740.
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu P. D., Konermann, S., Dohmae, N., Shehata, S. I., Ishitani, R., Zhang, F. & Nureki, O. (2014). Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*, 156, 935-949.
- Oliveira, S. D., Santos, L. R., Schuch, D. M., Silva, A. B., Salle, C. T. & Canal, C. W. (2002). Detection and identification of *Salmonellas* from poultry related samples by PCR. *Veterinary Microbiology*, 87, 25-35.
- Pettengill, J. B., Timme, R. E., Barrangou, R., Toro, M., Allard, M. W., Strain, E., Musser, S. M. & Brown, E. W. (2014). The evolutionary history and diagnostic utility of the CRISPR-Cas system within *Salmonella enterica* ssp. *enterica*. *Peer J*, 2, e340.
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A. & Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117, 119-128.
- Richards, A. K., Hopkins, B. A. & Shariat, N. W. (2020). Conserved CRISPR arrays in *Salmonella enterica* serovar *Infantis* can serve as qPCR targets to detect *Infantis* in mixed serovar populations. *Letters in Applied Microbiology*, 71 (2), 138-145.
- Savic, N. & Schwank, G. (2016). Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Translational Research*, 168, 15-21.
- Shariat, N., DiMarzio, M. J., Yin, S., Dettinger, L., Sandt, C. H., Lute, J. R., Barrangou, R. & Dudley, E. G. (2013a). The combination of CRISPR-MVLST and PFGE provides increased discriminatory power for differentiating human clinical isolates of *Salmonella* 173. *entericasubsp. enterica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 1946–1956.
- Shariat, N., Kirchner, M. K., Sandt, C. H., Trees, E., Barrangou, R. & Dudley, E. G. (2013b).

- Subtyping of *Salmonella enterica* serovar Newport outbreak isolates by CRISPR-MVLST and determination of the relationship between CRISPR-MVLST and PFGE results. *Journal of Clinical Microbiology*, 51, 2328-2336.
- Shariat, N., Sandt, C. H., DiMarzio, M. J., Barrangou, R. & Dudley, E. G. (2013c). CRISPR-MVLST subtyping of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovars Typhimurium and Heidelberg and application in identifying outbreak isolates. *BMC Microbiology*, 13, 254.
- Shariat, N., Timme, R. E., Pettengill, J. B., Barrangou, R. & Dudley, E. G. (2015). Characterization and evolution of *Salmonella* CRISPR-Cas systems. *Microbiology*, 161, 374-386.
- Sorek, R., Lawrence, C. M. & Wiedenheft, B. (2013). CRISPR mediated adaptive immune systems in Bacteria and Archaea. *Annual Review of Biochemistry*, 82, 237-66.
- Touchon, M. & Rocha, E. P. (2010). The small, slow and specialized CRISPR and anti-CRISPR of *Escherichia* and *Salmonella*. *PLoS One*, 5, e11126.
- Xie, X., Hu, Y., Xu, Y., Yin, K., Li, Y., Chen, Y., Xia, J., Xu, L., Liu, Z., Geng, S., Li, Q., Jiao, X., Chen, X. & Pan, Z. (2017). Genetic analysis of *Salmonella enterica* Molecular typing and subtyping of *Salmonella* by identification of the variable nucleotide sequences of the CRISPR loci serovar Gallinarum biovar Pullorum based on characterization and evolution of CRISPR sequence. *Veterinary Microbiology*, 203, 81-87.
- Vosik, D., Tewari, D., Dettinger, L., M'ikanatha, N. M. & Shariat, N. W. (2018). CRISPR Typing and Antibiotic Resistance Correlates with Polyphyletic Distribution in Human Isolates of *Salmonella* Kentucky. *Foodborne Pathogenes and Disease*, 15 (2), 101-108.



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni

Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association

e-ISSN: 2667-8381

Buse TURAN^{1a*}
Seyfullah HALİLOĞLU^{2b}

¹Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya

²Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı, Konya

ORCID^a: 0009-0002-2185-274X

ORCID^b: 0000-0001-8269-9668

*Sorumlu Yazar: Buse TURAN
E-Posta: avci.buse@icloud.com

Geliş Tarihi: 10.05.2023

Kabul Tarihi: 20.08.2023

14 (2): 79-87, 2023

DOI: 110.38137/vftd.1295473

Makale atfı

Turan, B. ve Haliloğlu, S. (2023). Metabolik Sendrom, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni, 14 (2), 79-87. DOI: 110.38137/vftd.1295473.

METABOLİK SENDROM

ÖZET. Dünyada sıkça görülen sağlık problemlerinden biri olan metabolik sendrom önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Metabolik sendrom obezite ve insülin direnci, tip2 diyabetes mellitus, hipertrigliseremi, hiperglisemi, hipertansiyon, dislipidemi, non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, HDL düşüklüğü, inflamasyon, adiposit türevli aldosteron salgılayıcı faktörler, stres, uyku apnesi vb. klinik belirtilerinin bir arada gelişmesiyle ortaya çıkmaktadır. Hayvanlarda benzer tanı kriterleri gözlemlenmiş ve metabolik sendrom tanımlanmıştır. Son yıllarda, insan hekimliğinde olduğu gibi veteriner hekimliğinde de metabolik sendroma, nedenlerine ve sonuçlarına ilgi artmıştır. Hastalığın oluşmasında sanayinin ve teknolojinin gelişmesiyle birlikte kentleşme, hareketsiz yaşam, hızlı ve kalorisi yüksek gıda tüketimi, sigara ve alkol kullanımı gibi pek çok çevresel etmenlerin yanında, kalıtsal nedenler de rol oynamaktadır. Hayvanlarda buna ek olarak cins, kısırlaştırma, sahibiyile olan ilişkisi, rasyon içeriği, günümüz koşullarına asimile olarak avcı, yakalayıcı vb. özelliklerini yitirmesi gibi pek çok durum gösterilmektedir. Metabolik sendrom için Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF), Ulusal Kolesterol Eğitim Programı (NCEP) ATPIII, Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği gibi çok sayıda uluslararası geçerliliği olan kurumlar tanımlamalarda bulunmuştur. Bu derlemede amaç insan ve hayvan yaşamı üzerinde kritik etkisi olan metabolik sendromu genel hatlarıyla anlatmak ve önemini vurgulamaktır.

Anahtar Kelimeler: Klinik bulgular, metabolik sendrom, prevalans, tedavi yaklaşımları.

METABOLIC SYNDROME

ABSTRACT. Metabolic syndrome is a common health problem, is an important cause of mortality and morbidity. Metabolic syndrome is a type of disorder that occurs as a result of the coexistence of insulin resistance and obesity-like findings, hypertriglyceridemia, hypertension, Type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia and non-alcoholic fatty liver disease, stress, low HDL, hyperglycemia, inflammation, adipocyte-derived aldosterone-releasing factors, sleep apnea, etc. The same criteria and symptoms are valid for the disease in animals, and similar definitions are made for animals. In recent years, interest in metabolic syndrome, its causes and consequences has increased in veterinary medicine as well as in human medicine. In the formation of the disease, with the development of industry and technology, besides genetic factors urbanization, sedentary life, fast and high-calorie food consumption and many environmental factors such as smoking and alcohol use play role. In addition to this, many situations are shown in animals such as breed, neutralism, relationship with the owner, ration content, loss of hunter, catcher, etc. characteristics by assimilating to today's conditions. Many internationally recognized institutions such as the National Cholesterol Education Program (NCEP) ATPIII, the International Diabetes Federation (IDF), the World Health Organization (WHO), the Turkish Society of Endocrinology and Metabolism have made definitions for metabolic syndrome. In this article, metabolic syndrome, which has a significant impact on human and animal life, is examined in general terms.

Keywords: Clinical findings, metabolic syndrome, prevalence, treatment approaches.

INTRODUCTION

Metabolic syndrome (MetS) emerges as a term that reflects the instability between energy intake and spending, sedentary lifestyle and resulting excessive adiposity, which increase the risk of developing diabetes and cardiovascular diseases (Turkish Society of Endocrinology, 2018). Metabolic syndrome in animals differs from humans in many ways. The most important pathological factor in metabolic syndrome is cardiovascular system disease in humans, laminitis and fatty liver in cattle (Daradics et al., 2021). Many factors are involved in the etiology of MetS. Genetics, smoking and alcohol use, lifestyle, psychological reasons, living environment, eating habits, etc. factors cause the formation and development of MetS. In 1998, Reaven used the phrase “Syndrome X” to describe the symptoms that trigger cardiovascular diseases (CVD), such as insulin resistance, type 2 diabetes mellitus (T2DM), hypertension, low HDL (Akyol, 2006). In the following years, explanations were made indicating the grouping of cardiovascular and metabolic risk factors such as “plurimetabolic syndrome”, “visceral fat syndrome”, “insulin resistance syndrome”, “fatal quadruple”. (Cornier et al., 2008). Since the clinical signs of metabolic syndrome in animals are different from those in humans, a clear explanation cannot be made. However, equine “Equine Metabolic Syndrome” (EMS) was first described and put forward by Johnson in 2002 as a coexistence of obesity, insulin resistance and laminitis (Johnson, 2002).

DEFINITIONS MADE FOR METABOLIC SYNDROME

It is understood from the definition made by the World Health Organization in 1998 that the organism has metabolic syndrome if at least two of the criteria of abdominal obesity, dyslipidemia, hypertension and microalbuminuria are present together with insulin resistance (Saklayen, 2018). National Cholesterol Education Program ATP III 2001 (NCEP-ATP III) advocated having three or more of the risk factors which are hyperglycemia, abdominal obesity, hypertension, hypertriglyceridemia, low HDL for the diagnosis of MetS. In 2005, the International Diabetes Federation (IDF) evaluated the NCEP-ATP III criteria and suggested that changes should be made. The IDF has mandated abdominal obesity for diagnosis. In 2009, the Turkish Society of Endocrinology and Metabolism MetS Working Group published the “Metabolic Syndrome

Guide” and reported that insulin resistance should be among the diagnostic criteria (Akan, 2012).

Prevalence of Metabolic Syndrome

The prevalence of MetS varies by country and ethnicity. This is due to the fact that the lifestyle, socio-economic status and genetic factors among people are different. Physical activity, age, post-menopausal status, body mass index, carbohydrates, smoking, saturated fats, alcohol use, education, etc. factors increase or decrease the likelihood of MetS. According to the ATP III distinctive features, the prevalence of MetS was found to be 31.3-45.0% in women and 21.7-32.2% in men. According to these data, women are more likely to have metabolic syndrome. In addition, As can be understood from the research, the likelihood of metabolic syndrome increases with increasing age. The occurrence of MetS is highest in the 61-65 age group, but it has been determined that it tends to decrease after the age of 70 (Gündoğan et al., 2013). In their study, Elitok and colleagues found that the frequency of MetS is 7 times higher in obese children compared to the general population. The frequency of metabolic syndrome was found to be 0.85% in all children and 6% in obese children (Elitok et al., 2019).

DIAGNOSTIC CRITERIA OF METABOLIC SYNDROME

Obesity and Insulin Resistance

Body mass index (BMI); It is calculated by dividing the weight by the square of the height. Here, weight is taken in kilograms and height in meters. In humans, a BMI value of 25 and above is considered fat, and 30 and above are considered obese (Guyton et al., 2007). There is still no universally accepted definition of obesity in cats and dogs. There are many different body condition scoring systems to determine the adiposity in cats and dogs. In veterinary medicine, it is necessary to determine a universal system in order to better interpret scientific research, evaluate the body condition more objectively and more accurately, and communicate more clearly with patient owners and veterinarians. For this purpose, the “Body Condition Score” scoring on an integer scale from one to nine (1-9) recommended by the WSAVA Global Nutrition Panel is accepted as a fast, simple and most convenient system. The concept of obesity in animals is defined as 30% more

than the ideal body weight (Ward et al., 2019). Obesity is expressed as less energy consumed than energy intake, resulting in less fat burning and more fat accumulation than normal in the body. Obesity; is a multifaceted disease that depends on factors such as nutritional, endocrine, socioeconomic, neurological, psychological factors, gender, physical activity, metabolic age and speed, etc. The amount of fat in the body is important in the formation of obesity risk, but more important is the amount of abdominal fat (Guyton et al., 2007). As in humans, obesity-related diseases, obesity and metabolic abnormalities are frequently seen in animals (Okada et al., 2017). As a result of scientific researches, it is thought that more than 85% of people and 70-80% of horses and cows will be affected by obesity by 2030 (Daradics et al., 2021). There are studies suggesting that up to 59% of cats and dogs are overweight (Ward et al., 2019). Fat distribution in the bodies of living things is very important for the side effects of obesity. If the localization of the amount of fat is excessive in the pelvic region, the term gynecoid (pear type obesity, female type) is used, and if it is excessive in the abdominal region, the term android (male type, apple type, central type obesity) is used (Blouin et al., 2008). If the fat is localized in the pelvic region, it is considered metabolically extremely inactive, and in the abdominal region it is considered metabolically quite active. Therefore, the risky one of weight gain and related obesity is abdominal obesity (Akan, 2012).

Insulin resistance is considered the most important clinical symptom or diagnostic criterion in MetS pathophysiology. Most of the researchers put insulin resistance at the forefront instead of obesity, which is extremely essential among the MetS diagnostic criteria, and state that insulin resistance directly affects other diagnostic criteria (Akan, 2012). The term "insulin resistance" is defined as the inability of insulin to show its effects on protein, fat, carbohydrate intake, metabolism or storage, despite its presence in circulation. Almost all obese animals have insulin resistance. However, each animal has a different effect on it. While diabetes develops as a result of insulin resistance in cats, it rarely results in diabetes in dogs and horses. Insulin resistance does not affect fat metabolism in cattle, and glucose concentrations remain in the reference range due to milk production (Tumpa and Baric, 2019). Insulin resistance in horses is

one of the most important diagnostic criteria for EMS. Insulin resistance usually results in hyperinsulinemia. Studies show that insulin resistance and resulting hyperinsulinemia induce laminitis (Johnson et al., 2012). In short, it is a biological unresponsiveness to endogenous or exogenous insulin. Insulin resistance in obesity can be determined by impaired or suppressed insulin-stimulated glucose transport, metabolism, and hepatic glucose output in adipocytes, skeletal muscle, and cardiac muscle.

Type 2 Diabetes Mellitus

4 clinical types are found in Diabetes Mellitus (DM). It can be counted as Type I DM, Type II DM, Pregnancy DM (Gestational) and other specific types of diabetes (due to another disease, due to that disease) (Diabetes Diagnosis and Treatment Guide, 2019). The classification of diabetes in humans is very similar to the classification of diabetes in cats and dogs. Although there are differences in etiopathogenic mechanisms, the information obtained from the human mechanism has an important place in the determination of the disease by using it in cats and dogs. In dogs, DM is similar to type 1 diabetes, whereas in most cats, DM is similar to type 2 diabetes (Nelson and Reusch, 2014). Type 2 diabetes mellitus (T2DM) occurs as a metabolic defect caused by insulin resistance or insulin secretion above normal in the determined tissues. Although T2DM is related to many reasons such as obesity, sleep, stress, nutrition and sedentary life in animals and humans, hereditary factors are also an important cause. Although T2DM is associated with many causes such as obesity, sleep disorder, stress, irregular diet and the adoption of a sedentary lifestyle, hereditary factors are also an important cause. In the genes that code T2dm insulin receptor, mitochondrial components, glycogen synthetase, glucokinase, etc. it has been determined that the formation of various mutations and that the genetic transition is polygenic have been determined (Şenol, 2009).

Hypertriglyceridemia

Hypertriglyceridemia refers to an increase in serum triglyceride (TG) concentration, which causes the serum or plasma to appear milky. This condition, which is not common in cats, is quite common in dogs. Hypertriglyceridemia is grouped as primary or secondary, depending on its source. While genetic or familial

disorders of lipid metabolism are shown as primary causes, other factors such as protein-losing nephropathy, hypothyroidism, hyperadrenocorticism, diabetes mellitus, pancreatitis, obesity, cholestasis and hepatic lipidosis are the sources of secondary causes. There are very few reports of primary hypertriglyceridemia in cats, and existing reports are mostly the result of genetic mutations (Miceli et al., 2022). Hypertriglyceridemia is a vital factor in horses, ponies and donkeys. If adequate treatment is not provided, it can lead to hepatic lipidosis and critical conditions such as liver failure. Diagnosis of hypertriglyceridemia is difficult. Because although the onset of the disease is insidious, clinical symptoms are not encountered except for general weakness. Factors such as pregnancy, lactation and colitis in horses increase the risk of occurrence (Waitt and Cebra, 2009). High plasma triglyceride concentrations directly contribute to METS and therefore to an increased risk of CVD, since HDL is accompanied by risk factors that can impair cardiovascular health, such as obesity, T2DM (Yuan et al., 2007).

Hyperglycemia

A normal plasma glucose concentration depends on endogenous glucose uptake, glucose utilization, and glucose transmission in the body (Giugliano et al., 2008). According to NCEP ATP III, fasting blood glucose level should be 100 mg/dl and above in order to be considered as a diagnostic criterion for hyperglycemia. DM appears as a diagnostic criterion used in the diagnosis of the widespread and leading metabolic syndrome observed in cats and dogs after humans. It is rarely observed in horses, cattle, buffalo, pigs and other small animals. As in many cases, humans and animals are very similar in the mechanism of DM, based on this situation, laboratory animals are preferred for DM mechanism research (Niaz et al., 2018). In animals and humans, risk factors such as pregnancy, obesity, genetics, T2DM, hyperlipidemia, hypertension, polycystic ovaries, etc. are involved in the formation of hyperglycemia.

Hypertension

Blood pressure (BP) should be measured using the appropriate type of measuring instrument and to ensure accurate measurement under the conditions in which the patient is being tried. Standards are well established for accurate measurement of BP measuring devices in humans,

but the same cannot be said for cats and dogs. Factors such as measurement method, breed, temperament, anesthesia-wake status, veterinary experience, patient position affect blood pressure results in animals. Therefore, it is not possible to determine specific values and ranges in animals (Acierno et al., 2020). The risk of cardiovascular morbidity and mortality increases as systolic and diastolic blood pressure increases (Aronov, 2012). It is the most common preventable risk factor among the causes of cardiovascular diseases (Ayinapudi et al., 2018). There are medical treatment protocols for hypertension in both animals and humans, but it is necessary to eliminate the underlying secondary causes, make dietary changes, increase movement, and reduce stress (Acierno et al., 2020).

Dyslipidemia

In METS, the table consisting of high triglyceride (TG), low HDL and high LDL, is called dyslipidemia. Limited studies are available for dogs with naturally occurring obesity. Most information has been obtained from empirical studies. Published studies suggest that changes in the lipid profile may occur with increases in cholesterol, triglycerides, and phospholipids in obese dogs, but studies have shown that parameters often do not exceed the upper limit of the reference range (German, 2006). Classical hyperlipidemia in horses is characterized by plasma TG concentration reaching 500 mg/dL and higher. Many predisposing factors such as some pony and mule breeds, obesity, advanced age, gender, lactation period, secondary diseases, pregnancy, metabolic syndrome, pituitary pars intermedia dysfunction have been encountered (Ribeiro et al., 2023). Dyslipidemia may have the potential to increase the risk of CVD, as metabolic syndrome is accompanied by waist circumference adiposity and hypertension risk factors (Onat et al., 2001).

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

It is a liver problem that resembles fatty liver caused by alcohol in terms of histological and pathological findings, but is defined as a liver problem that develops without the use of alcohol. Liver disease is an important health problem not only in the field of human health, but also in the field of veterinary medicine. Obesity and fatty liver disease are frequently observed in cats and dogs (Yang et al., 2018). Fatty acids in the liver participate

in the synthesis of triacylglycerol, lipoprotein and phospholipid and are used for energy generation by the heart and skeletal muscle. In case of fatty acids continue to enter the body, the liver will not be able to use it and accumulation will occur. As well as this accumulation is due to lipoprotein etc it may also be due to a defect in its synthesis or from fat degeneration (Nizamlioğlu, 1998). Hepatic lipidosis with histological morphologies similar to Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), mostly occurs in old animals not eating for a long time, intense lactation, advanced pregnancy status, high-energy feeding, inadequate care, lack of hygiene, stress, etc. (Yang et al., 2018). Non-Alcoholic Fatty Fatty Diseases (NAFLD) constitute the hepatic manifestations of MetS. It is thought that approximately 60% of ectopic hepatic triglycerides in obese NAFLD patients are caused by free fatty acids released from adipose tissue (Chait et al., 2020).

Low HDL

HDL is a type of lipoprotein synthesized in the small intestine and liver that contains a high concentration of protein, a much lower proportion of cholesterol and phospholipids. HDL shows antioxidant, antiaggregant, anti-inflammatory, fibrinolytic and anticoagulant effects. It performs these effects with the help of various components, enzymes and specific phospholipids (Ata et al., 2007).

Inflammation

MetS and in cases of visceral obesity which is in the front row of MetS' the clinical symptoms, low or high inflammation is mentioned. The cause of inflammation in METS is adipokines, chemokines, cytokines synthesized and secreted from adipose tissue and other factors (Akan, 2012).

CRP (C-reactive protein): Although it is an indicator of inflammation, it is an important factor, especially in the assessment of cardiovascular risk (Akan, 2012). Because CRP is one of the acute phase reactants synthesized from the liver in response to inflammation, and high CRP indicates inflammation in the heart vessels. This elevation means an increased risk of heart attack. In the studies conducted, it has been determined that CRP is high in individuals who have at least three of the MetS diagnostic criteria.

ADIPOCYTE-DERIVED ALDOSTERONE-RELEASING FACTORS

Obesity, especially visceral obesity, plays an important role in the pathophysiology of the metabolic syndrome. Adipose tissue is considered an endocrine organ and secretes adipokines such as tumor necrosis factor (TNF- α), non-esterified fatty acids and interleukin-6 (IL-6). Adipokine imbalance in the metabolic syndrome is the result of both adipose cell expansion and macrophage-associated infiltration. Cytokines such as TNF- α and IL-6, which are produced in excess by the infiltration of macrophages into the adipose tissue, impair the effect of insulin, signal with different structures and cause insulin resistance. Due to the increasing importance of adipokines in health and disease, there is an increasing need to know their biological structures in veterinary medicine. As obesity rates increase in animals, it is expected that the effect of changing adipokine balance on animal health will increase (Radin et al., 2009). Components of the reninangiotensin-aldosterone (RA-aldosterone) system are also in adipose tissue, and their presence not only induces insulin resistance and hypertension, but also triggers aldosterone secretion. Known for a long time to be a hormone that balances electrolytes, fluid volume and homeostasis in the organism, aldosterone has recently been determined to be an important finding of target organ damage. Aldosterone directly affects the brain, heart and kidneys, and an excess of aldosterone leads to proteinuria and chronic kidney disease (Fujita, 2010). Although several studies have documented RA-aldosterone activation in diet-induced obesity in dogs, the effect of RA-aldosterone changes on obesity-related disorders in dogs, cats, and horses has not been fully defined (Radin et al., 2009).

Stres

The number of pets is increasing day by day. However, problems regarding the welfare of pets are increasing. Stress factors such as shipping problems, exposure to new environments, and inappropriate maintenance procedures occur. Stress can cause behavioral problems, illness, and death in animals. On the other hand, stress can lead to undesirable consequences such as deterioration of animal welfare, harming the pet-owner relationship, and abandonment of pets (Fan et al., 2023).

The main factors of stress are locus ceruleus-norepinephrine/autonomic structures (LC/NE), corticotropin-releasing hormone (CRH), and their peripheral effectors, hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and components of the autonomic system (Vgontzas et al., 2000).

These effectors include logic-cognitive, fear-reward, immune, metabolic etc. systems. Glucocorticoids (GC), which are among the steroid hormones that act as the end product of the HPA axis, are found in almost every organ and tissue of the human organism (Nader et al., 2010).

Glucocorticoids stimulate hepatic gluconeogenesis and promote visceral adiposity and metabolic syndrome, inhibits and potentiates insulin status respectively on adipose tissue and skeletal muscle (Ata et al., 2007). Glucocorticoids play a decisive factor in determining the distribution of body fat. The autocrine production of cortisol from inactive cortisone by 11 β HSD1, which is expressed from adipose tissue, may be a very important factor in the pathogenesis of central obesity (visceral obesity). However, it has been reported that not every fat patient has a high circulating cortisol concentration (Stewart et al., 1999).

Sleep Apnea

It is a symptom that occurs with the closure of the upper airways, especially the hypopharynx, during breathing during sleep. Due to sleep apnea some symptoms such as sleep disorder, right heart failure and hypertension due to recurrent hypoxic events, etc. can occur. The pathophysiology of sleep apnea is unclear, and most of the available treatments for this disease are mechanical. As a result of the studies, it has been observed that TNF- α and IL-6, among the cytokines that cause fatigue or sleepiness, are increased in sleep apnea and obesity, and that these findings are a determining factor in the pathogenesis are found. TNF- α is also strongly associated with lipolysis, and this cytokine causes significant insulin resistance (Vgontzas et al., 2000). Current evidence has shown that the causal relationship between sleep apnea and metabolic syndrome may be due to biochemical markers such as oxidative stress, increased sympathetic activity, insulin resistance, dyslipidemia, and endothelial dysfunction (Barros and Garcia-Rio, 2019).

TREATMENT APPROACHES IN METABOLIC SYNDROME

Although there are genetic factors involved in the formation of MetS, the underlying lifestyle decreasing physical activity due to the advancement of technology, the hustle and bustle of life in crowded cities, etc. lead people to consume easy-to-prepare calorie foods. The first thing to do in the treatment of MetS is to eliminate these causes. There are up-to-date and reliable pharmacological agents for the control of each of the clinical manifestations of metabolic syndrome separately. Many drugs are currently used for blood pressure to be brought to the desired level in the the Seventh Report of the National United Committee, to reduce HbA1c in patients with diabetes to the level specified in the American Diabetes Association (ADA) guidelines and to adapt the criteria affecting lipid and lipid profile to NCEP ATP III. But it is not enough to use only these drugs. What is more necessary and difficult than the use of medication is to convince the patient to exercise regularly and follow the appropriate diet (Işıldak et al., 2004).

The basic rule of weight management in cats and dogs is to follow a diet. Exercise and behavior management are important but considered as auxiliary elements. The diet protocol should be arranged according to the patient. If weight loss is done only with energy restriction, it will cause simultaneous protein loss. For this reason, while the diet protocol is supported with protein, it should be prepared with a reduced fat ratio and suitable for the purpose. Increasing physical activity provides support to diet therapy. It supports fat loss and helps to protect lean tissue. Exercises such as walking with lead, hydrotherapy and swimming, walking on a treadmill are considered appropriate for dogs. In cats, weight loss can be achieved by increasing play activities with cat toys (German, 2006). In the diet protocol of ponies or horses with EMS, it is necessary to reduce the non-structural carbohydrate (NSC) content in order to reduce the amount of energy and reduce the glycemic and insulinemic index. In obese horses, the total amount of energy should be reduced and weight loss should be supported by increasing the level of physical activity. Approximately 200 minutes of moderate-intensity exercise per week is desirable. This exercise will provide improvements in insulin sensitivity, structural damage in the lipid profile of the foot, and foot pain (Frank et al., 2010).

CONCLUSION

Metabolic syndrome has become a problem of great importance globally (Saklayen, 2018). In a study conducted by the Metabolic Syndrome Research (METSAR) throughout Turkey in 2007, it was observed that more than a third of the population over the age of 20 participating in the study met the diagnostic criteria that constitute METS defined in ATP III. The participants of the study were randomly selected from seven geographical regions of Turkey. The incidence of MetS has been found to be lower in men than in women (Kozan et al., 2007).

Although the prevalence of EMS diagnostic criteria for animals, especially equines, has been evaluated by some studies, there are few and unclear epidemiological data on this subject (Durham et al., 2019).

MetS, which is defined as a clinical picture with high morbidity and mortality, with different and multiple diagnostic criteria developing due to hereditary and environmental factors, and accepted as one of the ten most risky diseases according to recent studies, appears as a fatal endocrinopathy case that manifests itself with insulin resistance that has been known since 1998 and glucose intolerance or diabetes mellitus, abdominal obesity, dyslipidemia, hypertension and related cardiovascular diseases (Akan, 2012). Internationally accepted definitions that best explain metabolic syndrome have been made by the World Health Organization (WHO), the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III), and the International Diabetes Federation (IDF) (Saklayen, 2018).

When treating metabolic syndrome, it is aimed to reduce or eliminate the clinical symptoms that cause the development of cardiovascular diseases. For this purpose, it is necessary to create an awareness of healthy living that includes such criteria as to make exercise a way of life, an adequate and balanced eating habit, regular sleep etc. and to conduct necessary studies and enlightenment for its placement in the entire society seem to be the most appropriate solution.

In animals, pathophysiological pathways and diagnostic criteria are observed similar to the occurrence of MS in humans. Insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, obesity in cats; Symptoms such as obesity, hyperglycemia and hyperlipidemia are quite common in dogs (Okada et al., 2017). In horses, on the other hand, equine metabolic syndrome, characterized by insulin

resistance and laminitis resulting from increased adipose tissue in the dorsal region, occurs (Walsh et al., 2009). As in humans, obesity can cause problems such as reproductive disorders, diabetes mellitus, abnormalities in circulating lipid profile, heart-respiratory diseases, orthopedic diseases, neoplasia, dermatological diseases and urinary tract disorders (Okada et al., 2017).

The goal in the treatment of metabolic syndrome is to reduce or eliminate the clinical manifestations that cause the development of cardiovascular diseases for animals and especially humans, laminitis for horses, and fatty liver disease for cows. For this, increasing physical activity, arranging a diet protocol suitable for the person and the animal, raising the awareness of healthy life in humans and animal owners, including criteria such as sleep patterns and removing stress factors, and doing the necessary information and studies for this seems to be the most appropriate solution.

REFERENCES

- Acierno, M. J., Brown, S., Coleman, A. E., Jepson, R. E., Papich, M., Stepien, R. L. & Syme, H. M. (2020). ACVIM consensus statement: guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *Journal of the Japanese Veterinary Nephrology and Urology Society*, 12 (1), 30-49.
- Akan, G. (2012). Investigation of 11 β HSD-1 and PAI-1 gene expressions in liver and visceral adipose tissues of rats with metabolic syndrome. Master's thesis, Istanbul Bilim University, Istanbul.
- Akyol, A. D. (2006). Metabolic syndrome. *Journal of Ege University Faculty of Nursing*, 23 (2), 173-182.
- Aronov, D. M. (2012). Statins—the basic medicine for a real decline in mortality from CHD. *Russkij medicinskij zhurnal—Russian Medical Journal*, 4, 1-7.
- Ata, A. Y. & Ergün, A. T. D. (2007). The role of cytokines in obesity and metabolic syndrome (Doctoral dissertation, Ankara University Institute of Health Sciences, Department of Physiology).
- Ayinapudi, K., Singh, T., Motwani, A., Le Jemtel, T. H. & Oparil, S. (2018). Obesity and pulmonary hypertension. *Current Reports of Hypertension*, 20 (12), 1-8.
- Barros, D. & García-Río, F. (2019). Obstructive sleep

- apnea and dyslipidemia: from animal models to clinical evidence. *Sleep*, 42 (3), 236.
- Blouin, K., Boivin, A. & Tcherno, A. (2008). Androgens and body fat distribution. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 108 (3-5), 272-280.
- Chait, A. & Den Hartigh, L. J. (2020). Adipose tissue distribution, inflammation and metabolic consequences including diabetes and cardiovascular disease. *Boundaries in Cardiovascular Medicine*, 7, 22.
- Cornier, M. A., Dabelea, D., Hernandez, T. L., Lindstrom, R. C., Steig, A. J., Stob, N. R. & Eckel, R. H. (2008). The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*, 29 (7), 777-822.
- Daradics, Z., Crecan, C. M., Russian, M. A., Morar, I. A., Mircean, M. V., Cătoi, A. F & Cătoi, C. (2021). Obesity-related metabolic dysfunction in dairy cows and horses: comparison with human metabolic syndrome. *Life*, 11 (12), 1406.
- Durham, A. E., Frank, N., McGowan, C. M., Menzies-Gow, N. J., Roelfsema, E., Vervuert, I. & Fey, K. (2019). ECEIM consensus statement on equine metabolic syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33 (2), 335-349.
- Elitok, G. K., Duru, N. S., Eleveli, M., Aydan, Z. & Karşıdağ, K. (2019). Evaluation of metabolic syndrome prevalence and components of metabolic syndrome in secondary school children. *Şişli Etfal Hospital Type Bulletin*, 53 (4), 403-408.
- Fan, Z., Bian, Z., Huang, H., Liu, T., Ren, R., Chen, X. & Zhang, L. (2023). Nutritional Strategies for Reducing Stress in Pet Dogs and Cats. *Antioxidants*, 12 (3), 545.
- Frank, N., Geor, R. J., Bailey, S. R., Durham, A. E. & Johnson, P. J. (2010). Equine metabolic syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24 (3), 467-475.
- Fujita, T. (2010). Mineralocorticoid receptors, salt-sensitive hypertension, and metabolic syndrome. *Hypertension*, 55 (4), 813-818.
- German, A. J. (2006). Increasing obesity problem in dogs and cats. *Journal of Nutrition*, 136 (7), 1940S-1946S.
- Giugliano, D., Ceriello, A. & Esposito, K. (2008). Glucose metabolism and hyperglycemia. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87 (1), 217S-222S.
- Guyton, A. C. & Hall, J. E. (2007). *Medical physiology textbook*. EGC.
- Gündoğan, K., Bayram, F., Gedik, V., Kaya, A., Karaman, A., Demir, O. & Coşkun, R. (2013). Prevalence of metabolic syndrome according to ATP III and IDF criteria and related factors in Turkish adults. *Medical science archives: AMS*, 9 (2), 243.
- Hiding, M. G. (2018). The Global Outbreak of Metabolic Syndrome. *Current Hypertension Reports*, 20 (2), 12.
- İşıldak, M., Güven, G.S. & Gürlek, A. (2004). Metabolic Syndrome and Insulin Resistance. *Hacettepe Medical Journal*, 35, 96-99.
- Johnson, P. J. (2002). Equine metabolic syndrome: Peripheral Cushing's syndrome. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 18 (2), 271-293.
- Johnson, P. J., Wiedmeyer, C. E., LaCarrubba, A., Ganjam, V. S. & Messer, N. T. (2012). Diabetes, insulin resistance, and metabolic syndrome in equines. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 6 (3), 534-540.
- Kozan, O., Oğuz, A., Abacı, A., Erol, C., Öngen, Z., Temizhan, A. & Çelik, S. (2007). Prevalence of metabolic syndrome in Turkish adults. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61 (4), 548-553.
- Miceli, D. D., Guevara, J. M., Ferraris, S., Pignataro, O. P. & Gallelli, M. F. (2022). Treatment of feline secondary hypertriglyceridemia with fenofibrate. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 24 (8), e251-e257.
- Nader, N., Chrousos, G. P. & Kino, T. (2010). Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Endocrinology and Metabolism Trends*, 21 (5), 277-286.
- National Diabetes Consensus Group (2019). *Diabetes Diagnosis and Treatment Guidelines*. Diabetes Foundation of Turkey. Erişim Adresi: https://www.turkdiab.org/admin/PICS/files/Diyabet_Tani_ve_Tedavi_Rehberi_2019.pdf.
- Nelson, R. W. & Reusch, C. E. (2014). Animal disease models: classification and etiology of diabetes in dogs and cats. *Journal of Endocrinology*, 222 (3), T1-T9.
- Niaz, K., Maqbool, F., Khan, F., Hassan, F. I., Momtaz, S.

- & Abdollahi, M. (2018). Comparative occurrence of diabetes in dogs, cats and several wild animals and their association with pancreatic diseases and ketoacidosis with therapeutic approach. *Veterinary World*, 11 (4), 410.
- Nizamlioğlu, M. (1998). Lipids. Biochemistry Book, p: 174-212.
- Okada, Y., Kobayashi, M., Sawamura, M. & Arai, T. (2017). Comparison of visceral fat deposition and metabolome markers among cats with variable BCS and new classification of feline obesity and metabolic syndrome. *Boundaries in Veterinary Science*, 4, 17.
- Onat, A., Ceyhan, K., Sansoy, V., Keleş, I., Erer, B. & Uysal, Ö. (2001). Classification of Turkish Adults Based on Dyslipidemia and on Lipoprotein Phenotype. *Turkish Society of Cardiology Archive*, 29 (5), 274-285.
- Radin, M. J., Sharkey, L. C. & Holycross, B. J. (2009). Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats and horses. *Veterinary Clinical Pathology*, 38 (2), 136-156.
- Ribeiro, R. M., Ribeiro, D. D. S. F., Cota, L. O., Carvalho, A. M., de Oliveira Gobesso, A. A. & Faleiros, R. R. (2023). Comparison of Friedewald Formula with Direct Method for Determination of Low-Density Lipoprotein Cholesterol Serum Levels in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 122, 104230.
- Stewart, P. M., Boulton, A., Kumar, S., Clark, P. M. & Shackleton, C. H. (1999). Cortisol metabolism in human obesity: impaired cortisone, cortisol conversion in individuals with central adiposity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84 (3), 1022-1027.
- Şenol, E. (2009). The relationship between metabolic syndrome diagnostic criteria and hormone profile in postmenopausal women and cardiovascular risk. Specialization thesis, T.C. Ministry of Health Taksim Training and Research Hospital, Istanbul.
- Tumpa, A. & Barić, R. R. (2019). Metabolic disorders and inflammation in obese dogs, cats, horses and cattle. *Veterinarska Stanica*, 50 (5), 481-494.
- Turkish Society of Endocrinology and Metabolism (2018). Obesity Diagnosis and Treatment Guidelines. Erişim Adresi: https://temd.org.tr/admin/uploads/tbl_kilavuz/20190506163904-2019tbl_kilavuz5ccedcb9e5d.pdf.
- Vgontzas, A. N., Papanicolaou, D. A., Bixler, E. O., Hopper, K., Lotsikas, A., Lin, H. M. & Chrousos, G. P. (2000). Sleep apnea and daytime sleepiness and fatigue: association with visceral obesity, insulin resistance and hypertostocinemia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85 (3), 1151-1158.
- Waitt, L. H. & Cebra, C. K. (2009). Characterization of hypertriglyceridemia and response to insulin therapy in horses, ponies, and donkeys: 44 cases (1995–2005). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 234 (7), 915-919.
- Ward, E., German, A. J., Churchill, J. A. (2019). Global pet obesity initiative position statement. Pet Obesity Prevention Association.
- Yang, Y. M., Fukui, M., Wang, Z., Miao, F., Karriker, M. J. & Seki, E. (2018). Interventional potential of recombinant feline hepatocyte growth factor in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 378.
- Yuan, G., Al-Shali, K. Z. & Hegele, R. A. (2007). Hypertriglyceridemia: etiology, effects and treatment. *CMAJ*, 176 (8), 1113–1120.



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association
e-ISSN: 2667-8381

Beyza AVCI^{1a*}
Kader YILDIZ^{2b}

¹Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale

²Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale

ORCID^a: 0000-0002-0434-4471
ORCID^b: 0000-0001-5802-6156

***Sorumlu Yazar:** Beyza AVCI
E-Posta: bbeyzaozkann@gmail.com

Geliş Tarihi: 15.04.2023
Kabul Tarihi: 03.07.2023

14 (2): 88-97, 2023
DOI: 10.38137/vftd.1283923

Makale atıf

Avcı, B. ve Yıldız, K. (2023). Köpek Ve Kedide Parazit Hastalıklarının Tedavisinde Makrosiklik Laktonlar, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni, 14 (2), 88-97. DOI: 10.38137/vftd.1283923.

KÖPEK VE KEDİDE PARAZİT HASTALIKLARININ TEDAVİSİNDE MAKROSİKLİK LAKTONLAR

ÖZET. Makrosiklik laktonlar köpek ve kedide bazı parazitlerin tedavisinde ruhsatlıdır. Bu bileşikler zaman zaman parazit tedavisinde etiket dışı (off-label) da kullanılmaktadır. Bu derlemede makrosiklik laktonların köpek ve kedi parazitlerine kullanımı hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Etiket dışı, kedi, köpek, makrosiklik laktonlar, parazit.

MACROCYCLIC LACTONES IN THE TREATMENT OF PARASITIC DISEASES IN DOGS AND CATS

ABSTRACT. Macrocyclic lactones are licensed for the treatment of some parasites in dogs and cats. These compounds are also used off-label in the treatment of parasites. The aim of the review was to give information about the use of macrocyclic lactones in dogs and cats parasites.

Keywords: Macrocyclic lactons, dog, cat, parasite, off-label.

GİRİŞ

Hem nematodlara hem de dış parazitlere etkili olan makrosiklik laktonlar (ML), “endosid” ve “ektosid” kelimeleri birleştirilmesi ile oluşturulan “endektosid” olarak adlandırılmaktadır (McKellar ve Benchaoui, 1996). ML yapılarına göre avermektinler ve milbemisinerler olarak ikiye ayrılır. Etkili ve toksisitesi en düşük antiparaziter bileşikler olarak kabul edilen bu iki grup, insan ve hayvan parazitlerinin tedavi ve kontrolünde yaygın olarak kullanılmaktadır. ML ailesinin ilk üyesi olan ivermektinin keşfi, 1970 yılında mikrobiyolog Satoshi Omura tarafından Japonya'nın Honshu kentindeki ormandan aldığı toprak örneğinden Gram-pozitif bir bakterinin izolasyonu ile başlamıştır. Bu keşif 2015 yılında Nobel ödülü almıştır (Laing ve ark., 2017).

Avermektin ve milbemisinerler makrosiklik lakton halkası taşırlar, ancak farklı mikroorganizmaların fermente ürünüdürler. Bu iki bileşiğin temel farklılığı; avermektinlerdeki makrosiklik halka C13 kısmında şeker gruplarını ihtiva ederken milbemisinerlerde bu bölge protonlanmıştır (Prichard ve ark., 2012). Avermektinler arasında ivermektin, doramektin, abamektin, eprinomektin ve selamektin, milbemisinerler arasında ise moksidektin ve milbemycin bulunur (Vercruyssen, 2002). Genel olarak, ML oral yolla alındığında hızla absorbe edilirken deri altı enjeksiyonunda absorpsiyon daha yavaştır (Merola ve Eubic, 2012). Avermektinler, omurgasız canlıların nöron ve faringeal kas hücrelerinde bulunan glutamat kapılı klorür kanallarına bağlanarak antiparazitik aktivite gösterir. Ayrıca GABA, glisin ve nikotinik asetilkolin dahil olmak üzere diğer ligand-kapılı iyon kanalı reseptörleri üzerinde de bağlanma etkisine sahiptir. Omurgasızlarda ivermektinin glutamat kapılı klorür kanallarına bağlanması sonucunda hücre zarının klorür iyonlarına karşı geçirgenliğinin artması şekillenir, hücresel hiperpolarizasyon, felç ve ölüme neden olur (Laing ve ark., 2017; Johnson-Arbor, 2022).

Milbemisinerlerin etki şekli tam olarak bilinmemektedir. Diğer makrosiklik laktonlarda olduğu gibi, bu bileşikler de omurgasızlara özgü glutamat kapılı iyon kanallara afinite gösterir. Moksidektin, artropodların nöral kavşaklarına, nematodların ise nöronal membranına bağlanır. Postsinaptik hücrelerin hiperpolarizasyonu, hücre zarının direncini azaltan klorür iyonunun içeri girmesi sonucu oluşur. Bu, nörotransmisyonu bozarak ölüme ve parazitin ortadan kaldırılmasına neden olur (El-Saber Batihe ve ark., 2020).

İVERMEKTİN

Hayvanlarda kullanılmak için geliştirilen ilk ML'dur. Bu bileşik bazı parazitlerin tedavisi için ruhsatlandırılmıştır, bunların dışında hayvanlarda bazı parazitlerin tedavisinde etiket dışı (off-label) da kullanılmaktadır. Etiket dışı ilaç kullanımı hakkında Tarım ve Orman Bakanlığı'nın Veteriner Tıbbi Ürünler Hakkında Yönetmeliği'nde (24.12.2011 tarih ve 28152 sayılı) “bir ilacın prospektüsünde belirtildiğinden farklı şekilde kullanımı” olarak belirtilmiştir. “Veteriner hekim uygun izinli bir ürün bulunmaması durumunda, veteriner biyolojik ürünler dışındaki izinli ürünleri mesleki bilgisine dayanarak etiket dışı olarak kullanabilir veya kullanılmasını tavsiye edebilir. Bu durumda veteriner hekim etiket dışı uygulamanın muhtemel her türlü etkisi hakkında yetiştiriciye gerekli bilgiyi vermek, kayıtlarında ve reçetede bu durumu belirtmek zorundadır. Etiket dışı kullanım durumunda, kullanılan ürün için ilgili hayvan türlerine göre bir kalıntı arınma süresi belirlenmemişse Bakanlık asgari bir süre ve/veya kurallar tavsiye edebilir. Etiket dışı kullanımda sorumluluk uygulayana ve uygulatana aittir.” ifadeleri yer almaktadır (Yarsan ve Pehlivan, 2020).

İvermektin; presinaptik nöronlarda GABA salınımını attırır. GABA nematodlarda nöronlarda, artropodlarda ise kas iplikçiklerinde post-sinaptik uyarımı bloke eden nörotransmitterdir. GABA salınımının uyarılması sonucunda parazitte paraliz ve ölüm gelişir. Karaciğer kelebekleri ve sestodlar periferik sinir iletiminde GABA'yı kullanmadığından ivermektin bu parazitlere karşı etkili değildir (Plumb, 2011). Köpeğe oral yolla verilen ivermektin yaklaşık 4 saat içinde maksimum plazma düzeyine ulaşır, bu süre deri altı uygulamada daha yavaştır (32-36 saat). Kedide ise bu süre 28 saat civarındadır. İvermektinin yarı ömrü köpeklerde oral uygulamada 3.3 gün, deri altı uygulamada 3.2 gün, kedide ise 3.4 gündür (Merola ve Eubic, 2012). Dört mideye sahip ruminantlarda ise oral yolla uygulanan ivermektin inaktive olur. Kediye oral verildiğinde biyoyararlanım köpeğe göre daha düşük olduğundan kalp kurdundan korunmak amacıyla daha yüksek doza ihtiyaç duyulur. İvermektin karaciğerde metabolize olur ve çoğunlukla dışkı ile atılır (Plumb, 2011).

İvermektinin köpek ve kedi için ise geliştirilmiş çiğneme tableti mevcuttur. Çiftlik hayvanları için ise likit enjektabl formu, oral yolla uygulanan bolus formu, pour-on, paste ve feed premix formu bulunur.

Köpeğe ivermektin oral veya deri altı yolla kullanılır. Köpeğe iki farklı yolla uygulanan 200 µg/kg dozda ivermektinin farmakokinetiğinde farklılık tespit edilmediğinden bu iki yolla da tedavide kullanılabilmesi belirtilmiştir (Karademir, 2005). Ancak altı haftadan küçük köpek yavrularına kullanımı tavsiye edilmemektedir (Vercruyse, 2002).

İvermektin; köpekler için kalp kurduna (*Dirofilaria immitis*) korunma amacıyla ruhsatlandırılmıştır (Plumb, 2011). Bu amaçla ayda bir kez 6-12 µg/kg (0,006 – 0,012 mg/kg) dozda oral yolla kullanımı tavsiye edilmektedir (Vercruyse, 2002). İvermektin *D. immitis*'in üçüncü ve dördüncü dönem larvaları ile mikrofilere karşı etki gösterir, ancak erişkin kalp kurduna etkisi minimumdur. *Dirofilaria immitis*'in köpek vücudunda L4'ten L5'e dönüşümü için yaklaşık 4 ay civarında süre gerektiğinden enfeksiyonun ilk ayında ivermektin uygulanması parazit larvalarının erişkinliğe dönüşmesini engelleyebilir. Endemik bölgede kalp kurdu profilaksisinde ilk doz ivermektinin mevsimsel olarak köpeğin sivrisinekle ilk karşılaşacağı zaman uygulanması, sezon boyunca aylık uygulamaya devam edilmesi, son uygulamanın ise sivrisinek sezonunun bitiminden sonraki ay içinde yapılması önerilir (Vercruyse, 2002).

Erişkin kalp kurduna yönelik tedavi protokolü uygulanmasını takiben dört hafta sonra 0,05 mg/kg dozda uygulanan ivermektin köpeğindeki mikrofilere öldürmektedir. Ancak ivermektin mikrofilarisit olarak ruhsatlanmamıştır. Ancak kalp kurdu taşıyan köpekler için etkili bir mikrofilarisit olarak değerlendirilmektedir. ML grubu ilaçlar mikrofilere hızla öldürdüğünden, dolaşımında çok sayıda mikrofilere bulunan köpeklerde risk oluşturmaktadır, bu sebeple antihistaminik ve glukokortikosteroidler tedavi protokolüne eklenmelidir (Bowman, 2014; AHS Canine Guideline, 2020). Erişkin parazite yönelik tedavi yapılmadan kalp kurdu ile enfekte köpeklere ivermektin uygulanması "occult enfeksiyon" olarak adlandırılan bir tablonun gelişmesine sebep olur. Occult enfeksiyon esnasında köpek erişkin *D. immitis* taşımaya rağmen kan dolaşımında mikrofilere rastlanmamaktadır. İvermektinin endemik bölgelerde profilaktik amaçla aylık uygulandığı köpeklerde occult enfeksiyon gelişme riskinden dolayı köpekler erişkin *D. immitis* yönünden serolojik bir test ile kontrol edilmelidir (Bowman, 2014).

Farklı ilaçlarla kombine edilen ivermektinin

erişkin kalp kurduna tedavi etkinliği araştırılmış (melarsomin, doksisisiklin ve ivermektin kombinasyonu, doksisisiklin ve ivermektin, sadece doksisisiklin, sadece ivermektin ve sadece melarsomin), doksisisiklin ve ivermektin kombinasyonunun erişkin kalp kurtlarını daha az patojenik etki ile ortadan kaldırdığı tespit edilmiştir (Bowman, 2014).

İvermektinin köpeklerde bazı diğer parazitlere karşı da etiket dışı kullanımı bilinmektedir. Generalize demodikoz tedavisi için önerilen protokol; oral yolla birinci gün 0,1 mg/kg dozda verilmesi, 0,6 mg/kg'lık hedef doza ulaşıncaya kadar her üç günde bir ilacın 0,1 mg/kg arttırılmasıdır (4. günde 0,2 mg/kg'a ve 7. günde 0,3 mg/kg'a). Enfekte köpekte negatif iki deri kazıntısı izlendikten sonra, 0,6 mg/kg dozda 1-2 ay daha tedaviye devam edilmesi tavsiye edilir (Bowman, 2014). Köpekte toksisite belirtileri varsa ilaç hemen kesilmeli, bu tedavi MDR1 mutasyonu olma ihtimali olan köpek ırklarına uygulanmamalıdır (Plumb, 2011). Sarkoptik uyuz için 0,3-0,4 mg/kg dozda oral ya da subkutan haftada bir kez uygulama önerilir (Plumb, 2011).

İvermektin köpekte bazı iç parazitlerin tedavisinde de kullanılmaktadır. Akciğerdeki *Capillaria* spp. ve *Eucoleus boehmi* tedavisinde 0,2 mg/kg dozda oral yolla, *Pneumonyssoides caninum* tedavisi için 0,2 mg/kg dozda deri altı yolla, *Oslerus osleri* tedavisi için 0,4 mg/kg dozda deri altı yolla uygulanır. İvermektinin köpeklerde oral veya subkutan olarak 200 µg/kg dozda uygulanmasının erişkin ve larva dönemindeki *Toxocara canis*, kancalı kurtlara (*Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense* ve *Uncinaria stenocephala*) ve *Strongyloides stercoralis*'e etkili olduğu görülmüştür. Bu dozda *Toxascaris leonina* ve *Trichuris vulpis*'e karşı etkinliği tam bilinmemektedir (Plumb, 2011; Bowman, 2014).

Büyük hayvan için geliştirilmiş formülasyonları yüksek ivermektin konsantrasyonuna sahiptir (10–18,7 mg/ml), bu nedenle bu ürünlerin köpeklerde etiket dışı kullanımında dozun yanlış hesaplanması ve aşırı doz uygulamaları gibi riskler oluşturmaktadır. Atlara oral yolla uygulanması sonrasında dışkı yoluyla atılan ivermektin metabolitleri, bu dışkıyı yiyen köpekler için toksikasyon riski oluşturur.

İvermektinin bazı köpek ırklarında toksisiteye sebep olduğu görülmüştür. Bu köpeklerde MDR1 (multidrug resistance) gen bölgesinde mutasyon belirlenmiştir. ABCB1 geni olarak da bilinen MDR1

geni, P-glikoprotein (P-gp) adı verilen protein pompasını kodlar (Mealey, 2004). P-glikoprotein, antiparaziter ilaçlar (ivermektin), antikanser ajanlar (Vinca alkaloidleri, doksorubisin), immünoşpresanlar (siklosporin, takrolimus), antimikrobiyal bileşikler (eritromisin, rifampisin, ketokonazol, levofloksasin vb), kardiyak ilaçlar (digoksin, verapamil, diltiazem, losartan vb.), opioidler (morfin, loperamid, butorfanol, fentanil), steroid hormonları (kortizol, deksametazon vb) dahil olmak üzere çeşitli kimyasal yapılara sahip bir dizi ilacı taşıyan geniş substrat özgülüğüne sahiptir (Mealey, 2004; Geyer ve Janko, 2012). P-gp; bu ilaçların vücutta emilmesi, dağılımı, metabolize olması ve atımında önemli bir rol oynar (Mealey, 2004). P-gp, ivermektinin beyin dokusuna ulaşmasından sorumludur (Prichard ve ark., 2012).

P-gp ile taşınan ivermektin MDR1 mutasyonuna sahip olan köpek ırklarında kan-beyin bariyerini aşarak merkezi sinir sistemi toksisitesi oluşturur (Plumb, 2011). Başta Collie ırkı olmak üzere MDR1 mutasyonu saptanan köpek ırkları arasında; Avustralya Çoban köpeği, Minyatür Avustralya Çoban köpeği, İngiliz Çoban köpeği, Alman Çoban Köpekleri (beyaz), Uzun Tüylü Whippet, McNab Çoban köpeği, Shetland Çoban Köpekleri, Silken Windhound, Uzun Tüylü Tazı, Avustralya Sığır Köpekleri ve Bearded Collie bulunur (Prichard ve ark., 2012; Bowman, 2014).

İvermektine duyarlı olmayan köpek ırklarına 1 mg/kg dozda ilaç uygulanmasını takiben akut toksisite belirtileri nadiren izlenirken, 2,5 mg/kg dozda midriasis, 5 mg/kg dozda ise titreme şekillendirmektedir. İvermektin 10 mg/kg dozda uygulandığında köpeklerde ciddi titreme ve ataksi, 40 mg/kg'lık doz aşıldığında ise ölüm görülür. Beagle ırkı köpeklerde 14 hafta süreyle 0,5 mg/kg dozda oral yolla uygulanan ivermektin herhangi bir toksisite belirtisi oluşturmamış, ancak aynı süre boyunca 1-2 mg/kg dozda verildiğinde midriasis ve kilo kaybı gelişmiştir (Plumb, 2011). Köpekte ivermektin toksisitesinde kusma, ataksi, uyuşukluk, hipersalivasyon, midriasis, nöbet ve taşikardi şekillenebilir. Ayrıca körlük, titreme, dehidrasyon, ishal, hipertermi, bradikardi, koma ve ölüm de izlenebilir (Tranquilli ve ark., 1989; Merola ve ark., 2009, Plumb, 2011; Bowman, 2014). Körlük; retinal ödem ve elektro-retinogram anomalisine bağlı şekillenir ve geçicidir (Merola ve Eubig, 2018).

İvermektin toksisitesinin tedavisi için onaylanmış bir bileşik mevcut değildir. Toksikite gelişen köpeklere

semptomatik tedavi uygulanmaktadır (Paul ve Tranquilli, 1989). Etkilenen köpeği kusturmak, aktif kömür vermek, sıvı tedavisi sağlamak ve vücut ısısını korumak esastır (Plumb, 2011). Köpeğin oral yolla toksik dozda ivermektine maruziyetinin üzerinden çok zaman geçmemişse ve klinik belirtiler henüz şekillenmemişse veteriner hekim tarafından ilk olarak kusturma düşünülebilir. Ancak sinirsel belirtiler gelişmişse aspirasyon riskinden dolayı kusma indüklenmemelidir. Vakadan vakaya göre değişimle birlikte etken maddenin oral yolla alınmasının üzerinden 30-60 dakika geçmişse hayvanda kusma indüklenir. ML'ların sindirim kanalındaki emilim hızı göz önüne alındığında, oral yolla alındıktan sonraki dört saat içinde aktif kömür uygulaması faydalıdır. İvermektin toksikasyonu gelişmiş vakalarda iki gün boyunca her 8 saatte bir aktif kömür uygulanması tavsiye edilir. Aktif kömür uygulaması esnasında bağırsak kanalından osmotik yolla su kaybına bağlı hastada hipernatremi ve hipermağnezemi gelişebileceği unutulmamalıdır (Merola ve Eubig, 2012).

Toksisite belirtileri gösteren köpeğe, sinapslarda asetilkolin birikimi sağlayan kolinerjik bir ilaç olan fizostigminin intravenöz yolla uygulanmasının etkili olduğu bildirilmiştir (Tranquilli ve ark., 1987). Fizostigmin, 0,2 mg/kg dozda ivermektin uygulanan Collie'lerde şekillenen merkezi sinir sistemi belirtilerinin 30-90 dakika boyunca düzelmesini sağlamıştır. Bu süre etkilenen köpeğin birşeyler yeyip-içebilmesine olanak sağlamaktadır. Ancak bu klinik düzelmeye geçicidir, üstelik fizostigmin uygulanan köpekte salya artışı, işeme, ishal, titreme ve nöbet gibi klinik belirtiler de görülür (Merola ve Eubig, 2012).

Vücuttaki zehirli maddelerin toksik etkilerini azaltmada lipit emülsiyonları intravenöz yolla uygulanmaktadır (Bahçivan ve Oğuz, 2019). İvermektin toksisitesinin damar içi yolla lipit emülsiyonu verilerek tedavi edildiğine dair kayıtlar mevcuttur (Bates ve ark., 2013; Kidwell ve ark., 2014).

Kedide ivermektin kalp kurdu tedavisi ve korunması, kulak akarı tedavisi ve kancalı kurt tedavisi için ruhsatlandırılmıştır. Kalp kurdunu önlemek amacıyla kedilerde 0,024 mg/kg dozda kullanılmaktadır (Plumb, 2011). Kedilerde 0,024 mg/kg dozda bazı gastrointestinal nematodların tedavi ve kontrolünde kullanılabilir. Kancalı kurtların (*Ancylostoma tubaeforme* ve *A. braziliense*) tedavisi için de kullanımı onaylanmıştır (Bowman,

2014). Kulak akarı tedavisi için %1'lik otik süspansiyonu mevcuttur. Bu ilaç dört haftalıktan büyük kedilerde kulak akarı (*Otodectes cynotis*) tedavisi için onaylanmıştır. İlaç, akarın yumurtalara ve larva aşamalarına karşı etkindir (Bowman, 2014).

İvermektin kedilerde *Toxocara cati* gibi bazı nematodların tedavisinde etiket dışı kullanılmaktadır (Blagburn ve ark., 1987; Kirkpatrick ve Megella, 1987). Akciğer kurdu olan *Aelurostrongylus abstrusus*'u tedavi etmek için etiket dışı 0,4 mg/kg deri altı yolla tek dozda kullanılmaktadır (Kirkpatrick ve Megella, 1987).

Kediler için ivermektin daha güvenli kabul edilir. Ancak bazı kedilerde toksisite görüldüğü de kaydedilmektedir. Kedide akut zehirlenme belirtileri doz aşımı şekillendikten yaklaşık 10 saat sonra görülür. Bu belirtiler arasında anoreksi, midriasis, titreme, ataksi, arka bacaklarda felç gelişimi dikkati çeker (Plumb, 2011; Bowman, 2014). Sinirsel belirtilerin hafiflemesi uzun süre alır, iyileşme yaklaşık 2-4 hafta sonra izlenir. Kısa tüylü kediye sahibi tarafından ivermektinin spot-on uygulamasından 12 saat sonrasında tremor gelişmiş, propofol uygulaması klinik belirtilerde geçici bir düzelmeye sebep olmuştur. Takibinde intravenöz intralipit infüzyonu sonrasında klinik belirtiler düzelmiştir (Prichard, 2010). P-gp ile taşınan ilaçlara yan etki gösteren kedilerde, duyarlı köpeklerdekine benzer şekilde MDR1 geninde mutasyon varlığı araştırılmış olmakla birlikte net veriler elde edilememiştir (Mealey ve Burke, 2015).

MOKSİDEKTİN

Moksidektin *Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenus* adlı bakterinin fermentasyonu ile elde edilmiştir. Moksidektin ivermektine kıyasla yarı ömrü daha uzun (20 günden fazla), dokularda birikimi nispeten daha fazladır. Moksidektin ağızdan uygulandığında ivermektinden daha hızlı emilir. Yarı ömrü; köpeğin vücut kondüsyonuna bağlı olarak, 13,9-25,9 gündür. Obez köpeklerde vücuttan atılma süresi uzar (Merola ve Eubig, 2012).

Moksidektin, köpek ve kedi için topikal uygulama, subkutan enjeksiyon ve aylık uygulanan tabletler halinde piyasada bulunur. Ruminant ve atlar için geliştirilmiş enjektabl, pour-on ve oral drench şeklinde uygulanan formları da bulunur. İvermektin gibi bu bileşiğin de at ve ruminantlar için hazırlanmış olan formları yüksek konsantrasyonda (%0,5-2, 5-20 mg/ml) etken madde içerir bu sebeple pet hayvanlarına

uygulanması toksikasyon riski oluşturur. Ayrıca at dışkıyla atılan metabolitleri de bu dışkıyı yiyen köpekler için toksikasyon oluşturma riskine sahiptir.

Moksidektin aylık olarak kalp kurdu önleyici, pireler için adultisid, kancalıkurt, askarit ve kamçılıkurt tedavisinde ruhsatlıdır. Generalize demodikoz tedavisinde de kullanılır (Plumb, 2011). Moksidektin aylık 0,003 mg/kg dozda veya altı aylık ara ile 0,17 mg/kg dozda deri altı enjeksiyonu yapılır (Merola ve Eubig, 2018). Kalp kurdundan korunmada topikal olarak köpeğe 2,5 mg/kg dozda, kediye 1 mg/kg dozda aylık uygulanır (Merola ve Eubig, 2018).

Moksidektin, köpekte gebeliğin 40 ve 55. günlerinde 1 mg/kg dozda iki deri altı uygulaması fötusa *T. canis* larvasının (Kramer ve ark., 2006), gebeliğin 55. gününde 1 mg/kg dozda deri altı verilmesi ise *A. caninum* larvasının geçişini engellemiştir (Wiebe ve Howard, 2009).

Bu bileşik köpeklerde kalp kurdu hastalığının önlenmesi ile larva ve erişkin kancalı kurt enfeksiyonunun tedavisi için onaylanmıştır (McCall, 2001). Normal P-gp genotipine sahip köpeklerde 1,9-2,8 mg/kg dozda oral uygulanması yan etkiye sebep olmuştur (Merola ve Eubig, 2018). İvermektine duyarlı Collie ırkı köpeklere moksidektinin etiketinde belirlenen dozun 30 katı oranında enjeksiyonunun olumsuz reaksiyona yol açmadığı bildirilmiştir (Paul ve ark., 2000). Moksidektinin memeli P-gp ile etkileşimi ivermektine göre daha zayıftır (Prichard ve ark., 2012). Ancak kilo kaybı %10 dan fazla olan köpeklerde moksidektinin yan etki geliştirme oranı yüksektir. Enjeksiyonu takiben iki saat içinde alerjik yapıya sahip köpekte eritem ve kaşıntı izlenebilir. Nadiren kusma ve/veya ishal, uyuşukluk ve ateş görülür. Kusma ve ishal genellikle difenhidramin veya deksametazon ile tedavi edilebilir, tedaviye hemen yanıt alınır (Bowman, 2014).

MOKSİDEKTİN VE İMİDAKLOPRİD

Topikal yolla uygulanan bu ürün; dış parazitler için imidakloprid ve iç parazitler için moksidektin içerir. Moksidektin ve imidakloprid kombinasyonu, erişkin pireleri öldürmede, kalp kurtlarından korunmak, erişkin ve larva dönemindeki kancalı kurtların (*A. caninum* ve *U. stenocephala*), askaritlerin (*T. canis*'in erişkin ve larva dönemi, *T. leonina*'nın erişkini) ve kamçılı kurtların (*T. vulpis*'in erişkini) tedavisinde kullanılır (Arther ve

ark., 2005). Tavsiye edilen minimum doz 10 mg/kg imidacloprid/2,5 mg/kg moksidedtin'in ayda bir kez topikal uygulanmasıdır (Plumb, 2011; Bowman, 2014). Bu kombinasyon 13-4 kiloluk köpeklere 0,4 ml, 4-9 kg köpeklere 1 ml, 4-25 kg köpeklere 2,5 ml, 25-40 kg köpeklere 4 ml dozda uygulanır. Bileşiğin 1,36 kg'dan daha hafif veya yedi haftadan küçük yavrulara etkisi net değildir. Çiftleşme dönemindeki, gebe veya laktasyondaki köpeklerde etkisi bilinmemektedir.

Bu bileşiğin ağızdan alınması depresyon, tükürük salgılaması, gözbebeklerinde genişleme, koordinasyon eksikliği, nefes nefese kalma ve genel titreme gibi bazı ciddi reaksiyonlara neden olabilir. Bu nedenle köpeklerin uygulama alanından ürünü yalamalarını önlemek önemlidir. Saha çalışmaları, tedavi edilen köpeklerin yaklaşık %15'inde kaşıntı olduğunu ortaya koymuştur. Köpek sahipleri uygulama yerinde kalan kalıntılardan ve uygulama sırasındaki kokudan şikayet etmektedir. Köpek için satılan ürün kedilerde kullanılmamalıdır (Plumb, 2011; Bowman, 2014).

Kedi için üretilmiş ürün, yetişkin pireleri öldürmede, kulak akarı (*O. cynotis*) tedavisi ve kontrolü amacıyla, kalp kurtlarını önlemek, erişkin ve larva dönemindeki kancalı kurtları (*A. caninum*) ve *T. cati*'yi tedavi ve kontrol etmek için topikal kullanımı onaylanmıştır (Arther ve ark., 2005). Tavsiye edilen minimum doz 10 mg/kg imidacloprid/1 mg/kg moksidedtin dozunun aylık topikal yolla uygulanmasıdır (Plumb, 2011). Yaklaşık 0,9 kg'dan daha hafif veya dokuz haftalıktan küçük kedilerde kullanılmamalıdır.

Belirtilen dozun 10 katının bir sefer uygulandığı kedilerde hafif düzeyde, geçici hipersalivasyon görülmüştür. Yan etki olarak bir dizi davranış değişikliğini (ajitasyon, kendini aşırı tımar etme, saklanma ve dönme), kaşınma, kafa sallama, uyuşukluk, polidipsi, öksürük ve öğürme bildirilmiştir. Ürünün ağızdan yutulması hipersalivasyona, titremeye, kusmaya ve iştah azalmasına neden olabilir (Plumb, 2011; Bowman, 2014).

MİLBEMİSİN OKSİM

Streptomyces hygroscopicus subsp. aureolakrimozis adlı bakterinin fermentasyon ürünü olan bu bileşik, ivermektin ile yapısal benzerliklere sahip olmasının yanı sıra aynı etki mekanizması ile de çalışmaktadır. Milbemis'in içeren çığneme tableti köpek ve kedi için kalp kurdu koruyucu olarak, %0,1'lik otik solüsyonu ise kulak uyuzu için

geliştirilmiştir.

Milbemis'in oksim'in piyasada 0,5 mg/kg dozda etken madde içeren tabletleri mevcuttur. Bu tabletler kalp kurdundan korunmada ve *A. caninum* tedavisinde ruhsatlıdır. Köpeklere her 30 günde bir 0,5 mg/kg dozda verilmesi kalp kurtlarını önlemede etkilidir (Grieve ve ark., 1991). Aynı zamanda erişkin *T. canis*, *T. leonina* ve *Trichuris vulpis*'e etkilidir (Bowman ve ark., 1991; Blagburn ve ark., 1992). Milbemis'in oksim, *D. immitis* mikrofilerlerini öldürmesinin yanı sıra yeni mikrofiler oluşumunu da engellemektedir. Bu sebeple aylık rutin uygulama yapılan yerlerde köpeğin erişkin parazit taşıma ihtimaline karşın antijen testleri ile serolojik olarak kontrol edilmesi tavsiye edilir (Lok ve Knight, 1995; AHS Canine Guideline, 2020).

Milbemis'in oksim amitraza dirençli *Demodex canis* ile enfekte köpeklerin tedavisinde etiket dışı 60-90 gün boyunca 1-2 mg/kg dozda kullanıldığında başarılı sonuç alınmıştır (Mueller, 2012). Yaşlı köpekler, tedaviden önce uzun süreli hastalık geçirmiş olanlar ve pododemodikozlu köpeklerde milbemis'in tedavisinin başarı oranı düşüktür (Plumb, 2011).

Milbemis'in oksim'in etiket dışı kullanımdan birisi sarkoptik uyuz tedavisidir. Milbemis'in oksim, 3-4 hafta boyunca haftada iki kez 2 mg/kg dozda oral yoldan verildiğinde uyuz etkenlerine oldukça etkilidir (Mueller, 2007). Milbemis'in oksim, her 10 günde bir 1 mg/kg dozda oral yolla verildiğinde nazal akara (*P. caninum*) karşı etkilidir (Plumb, 2011).

Milbemis'in oksim, özellikle MDR1 mutasyonu olan köpekte P-glikoproteini inhibe eden herhangi bir ilaçla birlikte kullanılmaması tavsiye edilir (Plumb, 2011). Tedavi dozunun 20 katının, MDR1 mutasyonuna sahip köpek ırklarında toksik etki göstermediği bildirilmiş (Blagburn ve ark., 1989) olsa da nörotoksisite riski unutulmamalıdır (Plumb, 2011). Sekiz haftalık yavrulara 2,5 mg/kg dozda oral yolla verildiğinde ilk gün hiçbir belirti yokken daha sonra titreme ve ataksi gelişmiştir (Plumb, 2011).

Dolaşımda çok sayıda mikrofiler bulunan bazı köpeklere milbemis'in uygulanmasını takiben geçici bir şok gelişme ihtimali vardır. Milbemis'in dört haftalıktan küçük veya bir kg'dan daha hafif yavrularda kullanılmamalıdır (Plumb, 2011). Ivermektine duyarlı köpeklerde, milbemis'in oksim 5-10 mg/kg dozda ataksi, salya artışı, midriasis, titreme ve letarji geliştirmiştir

(Merola ve Eubig, 2012).

Kedi için milbemisin oksim'in tablet ve kulak akarının tedavisi için otik solüsyon mevcuttur. Milbemisin oksim tabletleri kediler için 2 mg/kg dozda formüle edilmiştir. Kalp kurdunun önlenmesi amacıyla, *A. tubaeforme* ve *T. cati* tedavisinde kullanılır. %0,1'lik milbemisin oksim solüsyonu sekiz haftalık veya daha büyük kedilerde *O. cynotis* tedavisi için onaylanmıştır. Kulak akarının tüm yaşam evrelerine karşı etkilidir (Bowman, 2014). Milbemisin oksim altı haftadan küçük kedilere ve 700 g'dan daha hafif yavrulara uygulanmamalıdır (Plumb, 2011).

SELAMEKTİN

Selamektin, doramektinin yarı sentetik modifikasyonu ile hazırlanan bir endektosittir (Bishop ve ark., 2000). Köpek ve kedide topikal yolla uygulanır. Deri yoluyla uygulandığında kanda köpekte 72, kedide 15 saatte pik yapar. Köpekte yarı ömrü; deri yoluyla uygulandığında 11,1 gün, oral yolla uygulandığında ise 1,9 gün, kedide deri yoluyla uygulandığında 8,25 gün, oral yolla uygulandığında ise 1,1 gündür. Selamektin deri yoluyla uygulandığında kedide biyoyararlanımı daha yüksektir (kedide %72, köpekte %4,4). Bu farklılığın sebebi kedinin tımar davranışı ve buna bağlı oral yolla alması olabileceği değerlendirilmektedir (Merola ve Eubig, 2018).

Selamektin topikal solüsyonu altı haftalıktan büyük köpek ve sekiz haftalıktan büyük kedi için kullanımı onaylanmıştır. Tavsiye edilen doz her 30 günde bir olacak şekilde minimum 6 mg/kg'dır (Merola ve Eubig, 2012). Selamektinin köpek ve kedilerde gebelik esnasında kullanımı güvenlidir (Wiebe ve Howard, 2009). Selamektin topikal solüsyonu köpek ve kedilerde kalp kurdunun önlenmesi, pire (*C. felis*) ve kulak akarının (*O. cynotis*) kontrolü için onaylanmıştır (Boy ve ark., 2000). Kalp kurduna ait mikrofilere etkili değildir. Köpeklerde sarkoptik uyuz (*Sarcoptes scabiei*) ve *Dermacentor variabilis* tedavisi ve kontrolü için onaylanmıştır (Jernigan ve ark., 2000). Kedilerde ayrıca kancalı kurt (*A. tubaeforme*) ve *T. cati* tedavisi ile bu parazitlerin kontrolü için endikedir. Avrupa'da selamektin köpeklerde *T. canis*, *Trichodectes canis*, kedilerde *Felicola subrostratus* tedavisi için etiketlenmiştir (Plumb, 2011).

Selamektin, kedide *A. abstrusus* tedavisinde etiket dışı kullanıldığında tedavi başarısı düşük kalmıştır. Diğer etiket dışı uygulamaları köpekte *P. caninum*, köpek,

kedi ve tavşanda *Cheyletiella* spp. enfestasyonu, kedilerde hasat akarları (*Neotrombicula autumnalis*) tedavisidir (Plumb, 2011; Bowman, 2014). Selamektin, demodetik uyuz tedavisinde topikal olarak etkili olmamıştır (Plumb, 2011; Bowman, 2014).

Selamektin, potansiyel akarisidal ve inseksidal etkiye sahip sarolaner (isoxazoline) ile kombine ürünler de piyasada bulunmaktadır (Little ve Otranto, 2019).

Selamektin konsantre formda piyasada bulunmadığından doz aşımına nadiren rastlanır (Merola ve Eubig, 2012). MDR1 mutasyonu olan köpeklerde nispeten daha güvenli kullanılabilir, ancak 15 mg/kg'dan daha yüksek dozda oral uygulanması duyarlı köpeklerde bazı nörolojik toksisite belirtileri oluşturmuştur (Geyer ve Janko, 2012). Selamektinin P-gp ile etkileşime giren ilaçlarla birlikte kullanımdan kaçınılmalıdır. Köpekte toksikasyon belirtileri arasında kusma, salya akması, öğürme, dudakların yalanması, uyuşukluk, ajitasyon, anoreksi ve ataksi bulunur (Merola ve Eubig, 2012). Kedilerin yaklaşık %1'inde uygulama alanında geçici, lokalize bir alopesi gözlenmiştir. Bildirilen diğer yan etkiler arasında diyare, kusma, kas titremeleri, anoreksi, kaşıntı/ürtiker, eritem, uyuşukluk, salivasyon ve taşipne yer alır.

DORAMEKTİN

Doramektinin ruminant için enjektabl formu (10 mg/ml) ve sığır için dökme (5 mg/ml) formu bulunur. Köpekte oral uygulandığında iki saatte, deri altı uygulandığında ise 1,4 günde kanda pik seviyeye ulaşır, yarı ömrü 3-3,7 gündür (Merola ve Eubig, 2012).

Üretici firma inek ve domuz dışındaki hayvan türlerinde kullanıma karşı uyarıda bulunmaktadır. Bu bileşik köpeklerde ölüm de dahil ciddi yan etkiler oluşturur (Plumb, 2011; Bowman, 2014). Buna rağmen enjeksiyon formundaki doramektinin, köpek ve kedide generalize demodikoz tedavisinde 0,6 mg/kg dozda deri altı dört hafta süreyle etiket dışı kullanımı mevcuttur (Plumb, 2011). Köpekte generalize demodikoz için 0,6 mg/kg'lık bir oral doz tavsiye edilmiştir. Kedide demodikoz için 0,6 mg/kg dozda haftada bir deri altı yolla uygulanır. Bu bileşiğin etiket dışı kullanımı; tedavide diğer bileşiklerin etkisiz kaldığı durumda, hastalığın oluşturduğu risk tedaviye bağlı gelişecek riskten daha yüksekse, hasta sahibi uygulamaya bağlı gelişebilecek muhtemel yan etkiler hakkında bilgilendirilmiş ve onay alınmışsa,

uygulanacak köpekte MRD1 mutasyonu yoksa önerilir (Plumb, 2011; Bowman, 2014). Köpeklerde demodikoz için kullanıldığında yan etkiler nadirdir ancak gözbebeği genişlemesi, uyuşukluk, körlük veya koma izlenebilir.

Sonuç olarak; ML köpek ve kedilerde bazı parazitlerinin tedavi ve kontrolünde ruhsatlandırılmıştır. Bunun yanı sıra bu bileşiklerin etiket dışı kullanımı da yaygındır. Etiket dışı kullanımlarda hayvan sahibi bilgilendirilmeli ve onay alındıktan sonra uygulanmalıdır. Etiket dışı uygulama esnasında, özellikle ruminantlar için geliştirilmiş ürünlerin köpek ve kedide kullanımına bağlı doz aşımı ve toksikasyon riski mevcuttur. Özellikle ivermektinin MDR1 mutasyonuna bağlı duyarlı olması muhtemel köpek ırklarında kullanılmasından kaçınılmalıdır. ML'ların P-gp ile taşınan diğer ilaçlarla birlikte kullanımına da dikkat edilmelidir. Avermektin grubu bileşikler arasında köpek ve kediler için daha güvenli olanlar öncelikle tercih edilmelidir.

KAYNAKLAR

- Arthur, R. G., Bowman, D. D., Slone, R. L. & Travis, L. E. (2005). Imidacloprid plus moxidectin topical solution for the prevention of heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in dogs. *Parasitology Research*, 97 (Suppl 1), S76-S80.
- Bahçivan, E. & Oğuz, H. (2019). Zehirlenmelerde intravenöz lipit emülsiyonu tedavisi. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 12, 70-77.
- Bates, N., Chatterton, J., Robbins, C., Wells, K., Hughes, J., Stone, M. & Campbell, A. (2013). Lipid infusion in the management of poisoning: a report of 6 canine cases. *Veterinary Record*, 172, 339.
- Bishop, B. F., Bruce, C. I., Evans, N. A., Goudie, A. C., Gration, K. A., Gibson, S. P., Pacey, M. S., Perry, D. A., Walshe, N. D. & Witty, M. J. (2000). Selamectin: a novel broad-spectrum endectocide for dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, 91, 163-176.
- Blagburn, B. L., Hendrix, C. M., Lindsay, D. S. & Vaughan, J. L. (1987). Anthelmintic efficacy of ivermectin in naturally parasitized cats. *American Journal of Veterinary Research*, 48, 670-672.
- Blagburn, B. L., Hendrix, C. M., Lindsay, D. S., Vaughan, J. L., Hepler, D. I. & Wright, J. C. (1992). Efficacy of milbemycin oxime against naturally acquired or experimentally induced *Ancylostoma* spp. and *Trichuris vulpis* infections in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 53, 513-516.
- Bowman, D. D., Lin, D. S., Johnson, R. C. & Hepler, D. I. (1991). Effect of milbemycin oxime on adult *Ancylostoma caninum* and *Uncinaria stenocephala* in dogs with experimentally induced infections. *American Journal of Veterinary Research*, 52, 64-67.
- Bowman, D. D. (2014). *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. 10th ed. St Louis Missouri: Elsevier Saunders.
- Boy, M. G., Six, R. H., Thomas, C. A., Novotny, M. J., Smothers, C. D., Rowan, T. G. & Jernigan, A. D. (2000). Efficacy and safety of selamectin against fleas and heartworms in dogs and cats presented as veterinary patients in North America. *Veterinary Parasitology*, 91, 233-250.
- Crandell, D. E. & Weinberg, G. L. (2009). Moxidectin toxicosis in a puppy successfully treated with intravenous lipids. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 19, 181-186.
- El-Saber Batiha, G., Alqahtani, A., Ilesanmi, O. B., Saati, A. A., El-Mleeh, A., Hetta, H. F. & Magdy Beshbishy, A. (2020). Avermectin derivatives, pharmacokinetics, therapeutic and toxic dosages, mechanism of action, and their biological effects. *Pharmaceuticals (Basel)*, 13, 196.
- Geyer, J. & Janko, C. (2012). Treatment of MDR1 mutant dogs with macrocyclic lactones. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13, 969-986.
- Grieve, R. B., Frank, G. R., Stewart, V. A., Parsons, J. C., Belasco, D. L. & Hepler, D. I. (1991). Chemoprophylactic effects of milbemycin oxime against larvae of *Dirofilaria immitis* during prepatent development. *American Journal of Veterinary Research*, 52, 2040-2042.
- Jernigan, A. D., McTier, T. L., Chieffo, C., Thomas, C. A., Krautmann, M. J., Hair, J. A., Young, D. R., Wang, C. & Rowan, T. G. (2000). Efficacy of selamectin against experimentally induced tick (*Rhipicephalus sanguineus* and *Dermacentor variabilis*) infestations on dogs. *Veterinary Parasitology*, 91, 359-375.
- Johnson-Arbor K. (2022). Ivermectin: a mini-review. *Clinic Toxicology (Philadelphia)*, 60, 571-575.

- Karademir, Ü. (2005). Köpeklerde ivermectin ve doramektinin ağız ve derialtı yol ile uygulanmalarını takiben karşılaştırılmalı farmakokinetikleri. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Kidwell, J. H., Buckley, G. J., Allen, A. E. & Bandt, C. (2014). Use of IV lipid emulsion for treatment of ivermectin toxicosis in a cat. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 50, 59-61.
- Kirkpatrick, C. E. & Megella, C. (1987). Use of ivermectin in treatment of *Aelurostrongylus abstrusus* and *Toxocara cati* infections in a cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 190, 1309-1310.
- Krämer, F., Hammerstein, R., Stoye, M. & Epe C. (2006). Investigations into the prevention of prenatal and lactogenic *Toxocara canis* infections in puppies by application of moxidectin to the pregnant dog. *Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 53, 218-223.
- Laing, R., Gillan, V. & Devaney, E. (2017). Ivermectin - old drug, new tricks? *Trends in Parasitology*, 33, 463-472.
- Little, S. & Otranto, D. (2019). Tradition and innovation: Selamectin plus sarolaner. A new tool to control endo- and ectoparasites of cats-Studies from North America and Japan. *Veterinary Parasitology*, 270 Suppl 1, S1-S2.
- Lok, J. B., Knight, D. H., Selavka, C. M., Eynard, J., Zhang, Y. & Bergman, R. N. (1995). Studies of reproductive competence in male *Dirofilaria immitis* treated with milbemycin oxime. *Tropical Medicine and Parasitology*, 46, 235-240.
- McCall, J. W. (2005). The safety-net story about macrocyclic lactone heartworm preventives: a review, an update, and recommendations. *Veterinary Parasitology*, 133, 197-206.
- McKellar, Q. A. & Benchaoui, H. A. (1996). Avermectins and milbemycins. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 19, 331-351.
- Mealey, K. L. (2004). Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27, 257-264.
- Mealey, K. L. & Burke, N. S. (2015). Identification of a nonsense mutation in feline ABCB1. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 38, 429-433.
- Mealey, K. L. & Meurs, K. M. (2008). Breed distribution of the ABCB1-1Delta (multidrug sensitivity) polymorphism among dogs undergoing ABCB1 genotyping. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 233, 921-924.
- Merola, V. M. & Eubig, P. A. (2012). Toxicology of avermectins and milbemycins (macrocyclic lactones) and the role of P-glycoprotein in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 42, 313-333.
- Merola, V., Khan, S. & Gwaltney-Brant, S. (2009). Ivermectin toxicosis in dogs: a retrospective study. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 45, 106-111.
- Muhammad, G., Jabbar, A., Khan, M. Z. & Saqib, M. (2004). Use of neostigmine in massive ivermectin toxicity in cats. *Veterinary and Human Toxicology*, 46, 28-29.
- Mueller, R. S. (2012). An update on the therapy of canine demodicosis. *Compendium: Continuing Education for Veterinarians*, 34, E1-4.
- Nelson, T., McCall, J., Jones, S. & Moorhead, A. (2020). Current Canine Guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Dogs. American Heartworm Society Erişim Adresi: AHS_Canine_Guidelines_11_13_20.pdf d3ft8sckhnqim2.cloudfront.net. Erişim Tarihi: 02.12.2022.
- Parton, K., Wiffen, E. M., Haglund, N. D. & Cave, N. J. (2012). Macrocyclic lactone toxicity due to abamectin in farm dogs without the ABCB1 gene mutation. *New Zealand Veterinary Journal*, 60, 194-197.
- Paul, A. J., Tranquilli, W. J. & Hutchens, D. E. (2000). Safety of moxidectin in avermectin-sensitive collies. *American Journal of Veterinary Research*, 61, 482-483.
- Perez, R., Cabezas, I., Sutra, J. F., Galtier, P. & Alvinerie, M. (2001). Faecal excretion profile of moxidectin and ivermectin after oral administration in horses. *Veterinary Journal*, 161, 85-92.

- Plumb, D. C. (2011). Plumb's Veterinary Drug Handbook. Seventh Ed. Wiley Blackwell.
- Pritchard, J. (2010). Treating ivermectin toxicity in cats. *Veterinary Record*, 166, 766.
- Prichard, R., Menez, C. & Lespine, A. (2012). Moxidectin and the avermectins: consanguinity but not identity. *International Journal for Parasitology: Drug and Drug Resistance*, 2, 134-153.
- Tranquilli, W. J., Paul, A. J. & Seward, R. L. (1989). Ivermectin plasma concentrations in collies sensitive to ivermectin-induced toxicosis. *American Journal of Veterinary Research*, 50, 769-770.
- Tranquilli, W. J., Paul, A. J., Seward, R. L., Todd, K. S. & Dipietro, J. A. (1987). Response to physostigmine administration in collie dogs exhibiting ivermectin toxicosis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 10, 96-100.
- Vercruysse, J. (2002). Macrocytic Lactones in Antiparasitic Therapy. Belgium: CABI Publishing.
- Yarsan, E. & Pehlivan, S. (2020). Veteriner hekimlikte etiket dışı ilaç kullanımı: antimikrobiyal ilaçlar. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 11, 134-150.
- Wiebe, V. J. & Howard, J. P. (2009). Pharmacologic advances in canine and feline reproduction. *Topics in Companion Animal Medicine*, 24, 71-99.



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni

Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association

e-ISSN: 2667-8381

Gazel Ayça KURTBEYOĞLU^{1,2a*}
Mehmet AKAN^{2b}

¹Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
²Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı, Ankara

ORCID^a: 0000-0002-5414-3598
ORCID^b: 0000-0002-7342-1450

*Sorumlu Yazar: Gazel Ayça KURTBEYOĞLU
E-Posta: kurtbeyoglu@ankara.edu.tr

Geliş Tarihi: 30.03.2023
Kabul Tarihi: 27.08.2023

14 (2): 98-107, 2023
DOI: 10.38137/vftd.1273600

Makale atf

Kurtbeyoğlu, G.A. ve Akan, M. (2023). Kanatlı Hayvanlarda Kullanılan Vektör Aşılar, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni, 14 (2), 98-107. DOI: 10.38137/vftd.1273600.

KANATLI HAYVANLARDA KULLANILAN VEKTÖR AŞILAR

ÖZET. Aşılar, kanatlı hayvan hastalıklarının kontrolünde biyogüvenlik uygulamaları ile birlikte önemli bir yere sahiptir. Günümüzde konvansiyonel aşılarla ilave olarak özellikle tavuklarda vektör aşıların kullanımında önemli bir artış görülmektedir. Rekombinant aşı teknolojisinde patojenlere ait antijenleri kodlayan genler başka bir mikroorganizmaya aktarılmakta ve aşının uygulandığı hayvanın bağışıklık sistemi, bu antijenlerle uyarılmaktadır. Vektör aşıların oluşturulmasında sıklıkla viruslar kullanılmakta olup bakteriler ya da mayaların tercih edildiği çalışmalar da bulunmaktadır. Bu amaçla, tavuk çiçeği virusu (FPV), Hindi Herpesvirusu (HVT), Newcastle hastalığı virusu (NDV), Avian Lökozis Sarkoma Virus (ALSV) gibi viruslar vektör olarak seçilmektedir. Bu virusların yanı sıra Salmonella ve Campylobacter gibi bakterilerin vektör olarak kullanıldığı aşı araştırmaları da yapılmıştır. Bu derlemede kanatlı hayvan hastalıklarına yönelik geliştirilen vektör aşılarla ilgili bilgiler verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aşı, bağışıklık, kanatlı, vektör aşı.

VECTOR VACCINES FOR POULTRY

ABSTRACT. Vaccines are important in the control of the poultry diseases along with biosecurity measures. Today, vector vaccines which have lots of advantages compared to conventional vaccines stand out as a valuable alternative. In recombinant vector vaccine technology, antigens of various pathogens are delivered to another microorganism and the immune system of the vaccinated animal is stimulated by this vector. Viruses are frequently used in development of vector vaccines and bacteria or yeasts have also been preferred in some studies. For that purpose, viruses such as fowlpox virus (FPV), herpesvirus of turkeys (HVT), Newcastle disease virus (NDV), avian leukosis-sarcoma virus (ALSV) are selected as vectors. In addition to these viruses, some bacteria including Salmonella and Campylobacter have been used in some vaccine research. This review provides information on vector vaccines against various infectious diseases of poultry.

Keywords: Immunity, poultry, vaccine, vector vaccine.

GİRİŞ

Tarihi eski çağlara kadar uzanan, hasta bir kişiden etken taşıyan parçaların alınıp sağlıklı bir bireye aktarılmasıyla yapılan, neticesinde kişinin hastalığı ağır geçirmesini ya da hayatını kaybetmesini önleyen bir teknik olan variolizasyon, modern aşuların bulunmasında atılan ilk adım olarak kabul edilebilir. En eski kayıtlara göre on beşinci yüzyıldan önce Çin ve Hindistan'da uygulanan bu yöntem, İpekyolu üzerinden önce Osmanlı Devleti'ne, buradan da İngiltere'ye kadar ulaşmış, her ne kadar tam bir çare olmamışsa da yapılan denemelerin hastalığa karşı korumada başarılı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalarla birlikte mikrobiyoloji ve immünoloji konularındaki bilgi eksiklerine rağmen aşı kavramı ortaya çıkmaya başlamıştır (Tizard, 2020).

Edward Jenner'ın 1796 yılında yaptığı denemeler ile çiçek virüsü üzerindeki çalışmalarının başarıya ulaşması, 19. yüzyılda ise Louis Pasteur'un tavuk kolerası, antraks ve kuduz gibi hastalıklara karşı aşular geliştirmesiyle birlikte aşular, insan sağlığında olduğu kadar hayvan sağlığı açısından da büyük bir önem kazanmaya başlamıştır. Zaman içinde gelişen teknoloji ve bulunan farklı teknikler ile günümüze kadar çeşitli tiplerde aşular geliştirilmiş, bunlar sayesinde kimi hastalıklar eradike edilmiş, pek çoğu ise önlenabilir bir hale gelmiştir. Böylelikle aşular hem beşerî hem de veteriner tıpta hastalıklardan korunma konusunda en mühim araçlardan biri olmuştur (André, 2003; Shams, 2005; Tizard, 2020).

Hayvanlarla direkt temas ya da besinler aracılığıyla zoonoz etkenlerin insanlara bulaşma riski ve çiftlik hayvanları ile kümes hayvanlarının ekonomik değerleri göz önüne alındığında, hastalıkların yayılmasının engellenmesi, insan ve hayvan sağlığı için oldukça önemlidir. Bu amaçla, hayvanlarda hastalıklara karşı aktif bağışıklığı sağlayan, güvenli ve etkili aşular, diğer korunma yöntemleri arasında öne çıkmaktadır. Kanatlı hayvanlarda ve özellikle tavuklarda yetiştirme tiplerine bağlı olarak farklı aşuların kullanımı ile aşılama programları oluşturulmuş ve bu programların uygulanması ile sağlıklı ve yüksek performanslı sürülerin yetiştirilmesi mümkün olmuştur. Bu derlemede, kanatlılarda son yıllarda kullanımı artan rekombinant vektör aşular ve bu aşuların kullanımı ile ilgili temel bilgilerin verilmesi amaçlanmıştır.

VETERİNER HEKİMLİKTE AŞILAR

Geçmişten bu yana aşuların gelişimi incelendiğinde insan ile hayvan sağlığının birbiriyle bağlantılı olduğu, hali hazırda kullanılan ya da üzerinde çalışılan aşuların da önemli bir kısmının zoonoz hastalıklar için olduğu görülmektedir. Toplum sağlığına olan riskleri en aza indirmek için ilk olarak hayvanların bu zararlı etkenlerden korunması sağlanmalıdır, bunun için de günümüzde sıklıkla güvenliği ile etkinliği kanıtlanmış olan aşular tercih edilmektedir. Ayrıca hayvansal üretim kapasitelerinin artmasıyla birlikte, ekonomiyi olumsuz etkileyen ve hızlı bulaşan hastalıklara karşı da aşular geliştirilmekte ve bu aşuların performans etkisi de izlenmektedir (Shams, 2005; Lütticken ve ark., 2007).

Temel olarak aşular, konvansiyonel ve gelecek nesil aşular olmak üzere ikiye ayrılır. Geleneksel aşular olarak da bilinen konvansiyonel aşular içinde yer alan canlı ve inaktif aşular, güncel olarak kullanılan lisanslı veteriner aşularının büyük bir kısmını oluşturur. Canlı aşular attenüe edilmiş canlı mikroorganizmalar içerirken inaktif aşularda ölü patojenler kullanılır. Bakteri toksinlerine karşı kullanılan toksoid aşular ve hastalıklara neden olan mikroorganizmalardaki sadece antijenik kısımları barındıran subunit aşular da konvansiyonel aşular kategorisi içinde bulunmaktadır (Arda ve Sareyyüpoğlu, 2004).

Bu kategorideki aşuların hastalıklara karşı korumada etkili olmalarının yanında değişen üretim süreçlerine de uygun olması oldukça önemlidir. Canlı aşuların toplu kullanımı (sprey, içme suyu aşılama gibi), sürü bağışıklığıyla birlikte bireysel bağışıklığın izlenmesini ve hastalık gerçekleştiğinde tüm bireylerin korunmasını sağlayacak şekilde aşılama programlarının düzenlenmesini zorunlu kılmaktadır. Diğer yandan canlı aşular içinde bulunan attenüe edilmiş mikroorganizmaların tekrar patojenik forma dönüşebilme potansiyelinin bulunması bu aşuların önemli dezavantajlarından biridir. Sahada yapılan teşhis işlemlerinde hayvanlarda saptanan mikroorganizmanın aşı suşu ya da saha suşu olup olmadığının ayırt edilmesinde de zorluklar yaşanmaktadır (Hanley, 2011; Lupini ve ark., 2011).

Canlı aşulardaki güvenlik sorunu, inaktif aşuların güvenli olmalarına rağmen koruyuculuklarının daha düşük ve koruyuculuklarının daha kısa süreli olması, toksoid

ve subunit aşıların da benzer şekilde daha düşük immün yanıt sağlaması gibi nedenler, daha etkili ve güvenli aşılar geliştirilmesi ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Biyoteknoloji, immünoloji, moleküler biyoloji ve genetik gibi alanlarla birlikte aşı teknolojilerindeki gelişmeler sonucunda yeni nesil aşılar olarak da bilinen biyoteknolojik aşılar geliştirilmiş, son yıllarda bu tipteki aşılar üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır (Büyüktanır, 2010).

Gelecek nesil aşılar, hastalık etkeni olan mikroorganizmaların genomlarının tamamını değil, yalnızca immüniteyi uyuracak parçalarını içerirler. Böylelikle canlı aşılardaki gibi enfeksiyon oluşturma riski bulunmaz, bu sebeple onlara göre daha güvenilir oldukları söylenebilir. Avantajlarının yanında geliştirme aşamalarının daha kompleks ve pahalı olması gibi dezavantajları da bulunan bu tipteki aşılar rekombinant subunit aşılar, DNA aşıları, marker aşılar ve vektör aşılar örnek gösterilebilir (Bouazzaoui ve ark., 2021; Jafari ve ark., 2022).

Rekombinant DNA teknolojisinin kullanıldığı aşılar da patojen mikroorganizmadan seçilen genetik materyal bakteri, virus ya da maya gibi başka bir taşıyıcıya aktarılır. Vektör aşılar da ise bakteri, virus, maya, plasmid ya da bitki gibi vektörler başka patojenlere ait antijenleri kodlayan genleri taşırlar. Rekombinant subunit aşıların aksine bu aşıların geliştirme ve üretim aşamalarında antijenlerin izole edilip saflaştırılmasına gerek yoktur ve vektörün kendisi aşı olarak kullanılabilir (Tizard, 2020).

VEKTÖR AŞILAR

Son yıllarda hem insan hem de hayvan sağlığına yönelik sıklıkla çalışılan aşı tiplerinden biri de vektör aşılarıdır. Bu yöntem ile patojenlere ait antijenlerin ekspresyonu vektörler aracılığıyla gerçekleştirilir ve böylelikle bağışıklık sistemi uyarılır (Yamanouchi ve ark., 1998). Canlı aşılar da göre daha güvenli olmaları, üretim ile geliştirme sürecinin daha kısa sürmesi, hem hücresel hem de humoral yanıt uyarmaları ve bu açıdan özellikle intraselüler patojenlere karşı güçlü bağışıklık sağlamaları gibi pek çok avantajları bulunan vektör aşıların hayvan sağlığı alanında önemi giderek artmaktadır. Bu alandaki aşılar da vektör olarak genellikle poxvirus, adenovirus, herpesvirus gibi DNA virüsleri, daha nadir olarak *Salmonella*, *Lactobacillus*, *Mycobacterium bovis* gibi bakteriler ya da bazı maya türleri kullanılmaktadır (Tizard, 2020).

Viral vektörler arasında, geniş DNA parçalarının aktarılabilmesi büyük bir genoma (130-230 kbp) sahip olan poxvirüsler, bu aile içinde ise fowlpox, canarypox ve vaccinia virus gibi türler ön plana çıkmaktadır (Moss, 2013). Bu vektörlerin humoral ve hücresel yanıt uyurabilmeleri, etkinliklerinin ve güvenliklerinin yüksek olması, adjuvan ihtiyacının bulunmaması, pek çok farklı şekilde uygulanabilmeleri gibi başka avantajları da bulunmaktadır (Rajasekaran ve ark., 2018).

KANATLI HAYVANLARDA KULLANILAN VEKTÖR AŞILAR

Veteriner aşıları arasında diğer hayvanlarda olduğu gibi kanatlı hayvanlara yönelik aşılar da rekombinant aşı teknolojisi çalışmaları son yıllarda artış göstermektedir. Büyük ekonomik kayıplara neden olan ve aynı zamanda insan sağlığı için de riskler taşıyan avian influenza (AI) ile Newcastle hastalığına (ND) yönelik vektör aşılar ve devam eden çalışmalar bulunmaktadır. Bunlarla birlikte oldukça bulaşıcı olan, verim kayıplarının yanı sıra ölümlere sebebiyet veren enfeksiyöz bursal hastalık (IBD), enfeksiyöz bronşitis (IB), enfeksiyöz laringotrakeitis (ILT), Marek hastalığı (MD) ve kanatlı çiçeği gibi hastalıkların önlenmesinde de vektör aşı uygulamaları ön plana çıkmaktadır. Bu kategoride üretilen aşıların büyük çoğunluğunun güvenli ve hastalıktan korunma açısından etkili oldukları yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Romanutti ve ark., 2020; Hein ve ark., 2021).

Bu tip aşıların en önemli dezavantajı ise vektöre karşı maternal antikor bulunması durumunda, bu antikorların oluşacak immün yanıtı müdahale edip aşının etkinliğini azaltması olasıdır. Bu olay hakkında farklı çalışmalar bulunmakta ve bunlar da farklı düşünceler ortaya koymaktadır. Bu düşüncelerden biri olan epitop maskeleymesi, aşılamadan sonra maternal antikorların antijen üzerindeki spesifik epitoplara bağlanıp antijeni örtmesi ve B lenfositler tarafından tanınmasını önlemesi ile gerçekleşmekte olup bu durum, aşıların etkinliğini azaltan sebeplerden biri olarak görülmektedir. Bir başka görüşe göre ise aşı antijeni maternal antikor ile B hücre reseptörüne bağlanırken, maternal antikor da antijenle birlikte B hücre aktivasyonunu engelleyen bir Fc reseptörü olan FcγRIIB'ye bağlanmaktadır. Bu çapraz bağlantının negatif bir sinyal oluşturması sonucu B hücre aktivasyonu ile antikor oluşumu engellenmektedir. Bu durumda aşılama zamanı, antikor titresi ve maternal antikor

miktarının etkili olduğu da göz önünde bulundurulmalıdır (Niewiesk, 2014).

Tavuk Çiçeği Virüsü (FPV)

Kanatlı hayvan hastalıklarına karşı vektör aşılarında, piyasaya sunulan ilk aşıda tavuk çiçeği virüsü olarak da bilinen fowlpox virus (FPV) vektör olarak kullanılmış ve bu virusa, Newcastle hastalığına neden olan virüsün hemagglutinin nöraminidaz (HN) ve füzyon (F) genleri eklenerek elde edilmiştir (Jackwood, 1999). Bu aşıyla birlikte, HN ve F genleri nötralize edici antikorların salınmasını uyarırken aynı anda hem Newcastle hastalığı virüsüne (NDV) hem de tavuk çiçeği virüsüne karşı immün yanıt gelişir. Tavuk çiçeği virüsünün deride, Newcastle hastalığı virüsünün ise üst solunum yollarında çoğalması sebebiyle solunum sisteminde bir hastalık oluşması riski yoktur ve bu durum, bu aşuların en önemli avantajlarından biridir (Tizard, 2020).

Genel olarak rekombinant FPV aşularında zarflı virüslere karşı geliştirilen aşuların, zarfsız virüsler için geliştirilen aşılardan daha başarılı olduğu, bu durumun sebebinin de humoral immüniteyi uyarma şekillerinde görülen farklılıklar olduğu saptanmıştır. Yine de aşuların başarıya ulaşmasında asıl olarak antijen seçimi ile hastalığın patogenezi önem taşımaktadır (Skinner ve ark., 2005).

Dünyada pek çok ülkede lisanslı olarak kullanılan avian influenzaya yönelik FPV vektörlü bir aşıda, tavuk çiçeği virüsüne avian influenza virüsünün (AIV) H5 alt tipine ait hemagglutinin (HA) geni eklenmiştir. Avian influenza ya da tavuk çiçeğine karşı maternal antikorların varlığının aşının etkinliğini azaltmamasının yanında, bir günlük hayvanlara uygulanan tek doz aşı erken koruma sağlamakta, adjuvana bağlı kalıntı problemi de oluşturmamaktadır. Diğer yandan, yapılan çalışmalar FPV'ye karşı aktif bağışıklık geliştirmiş olan hayvanlarda aşının etkinliğinin düştüğünü göstermiştir, bu nedenle aşının kanatlı çiçeği hastalığını geçirmiş ya da daha önceden bu hastalığa karşı aşılanmış hayvanlarda kullanımı uygun bulunmamaktadır (Bublott ve ark., 2006).

Günümüzde kullanımı yaygın olsa da ILT'ye yönelik canlı aşuların, aşısız hayvanlara virus saçılımına, virulans artışına neden olmak gibi istenmeyen durumlara yol açma olasılığı bulunduğundan bu aşuların yanında başka bir seçenek olarak rekombinant aşulara yönelmiş ve bunun için FPV'nin vektör olarak kullanıldığı aşular

üzerinde de çalışılmıştır. Bunun için tavuk çiçeği virüsünün, enfeksiyöz laringotrakeitis virüsünden (ILTV) alınan ve herpesvirus kaynaklı hastalıklara karşı bağışıklıkta önemli bir rol oynayan glikoprotein B'yi eksprese etmesi sağlanmıştır. Denemelerin sonucunda SPF tavuklarda ve ticari sürülerde yüksek bir koruma sağlanırken mortalite engellenmiş, konvansiyonel aşılardaki olumsuz yanlar da önlenmiştir (Tong ve ark., 2001).

Hindi Herpesvirüsü (HVT)

Kanatlı hayvan hastalıklarına yönelik geliştirilen rekombinant aşılarda vektör olarak sıklıkla kullanılan bir başka virus ise Marek hastalığı virüsü serotip 3 (MDV-3) olarak da bilinen hindi herpesvirüsüdür (HVT). Şimdiye kadar NDV, AIV, MDV ve ILTV'ye ait genler bu virüsün genomuna aktarılarak vektörler oluşturulmuştur (Jackwood, 1999). Bu tipteki aşuların, tek bir aşılama ile yaşam boyu Marek hastalığına karşı koruma sağlaması ve konakları arasında sadece kanatlı hayvanlar bulunması sebebiyle oldukça güvenli sayılmaları gibi avantajları bulunmaktadır (Sonoda ve ark., 2000).

Enfeksiyöz laringotrakeitis virüsüne karşı geliştirilen aşılarda, bu virusa ait glikoprotein D, glikoprotein I veya glikoprotein B genlerinin HVT'ye aktarılması tercih edilmiş, yapılan çalışmalar sonucunda bu aşuların uygulandığı hem SPF tavukların hem de ticari sürülerin büyük bir kısmının, ILTV ile karşılaşması durumunda semptom göstermedikleri gözlenmiştir (Esaki ve ark., 2013). Bu aşular, in ovo uygulama yapılabilmesi, hastalık oluşturmada immün sistemi uyarabilmeleri, diğer aşulara güvenli bir alternatif olmaları sebebiyle son yıllarda özellikle broiler, yumurtacı ve damızlık işletmelerde sıklıkla tercih edilmektedir. Aşılama sonrasında, vektör aşının replikasyonunun düşük olması durumunda yeterli ILTV ekspresyonunun olmaması ve düşük düzeyde bağışıklık/koruma şekillenebilir (Gimeno ve ark., 2011).

Konvansiyonel NDV aşulara ilave olarak geliştirilmiş rekombinant aşılardan biri de NDV'nin hemagglutinin nöraminidaz ve füzyon genini eksprese eden HVT ile elde edilen vektör aşılardır. Bu aşuların uygulanmasından iki hafta kadar sonra NDV'ye maruz kaldıklarında aşının hayvanların tamamında koruma sağladığı tespit edilmiştir (Heckert ve ark., 1996). Yalnızca hindilerin kullanıldığı bir başka çalışmada ise NDV'nin sadece füzyon geni HVT'ye aktarılmış,

yapılan aşılama sonucunda hiçbir hayvanda semptomlara rastlanmamasının yanında virüsün saçılımı da azalmıştır (El Khantour ve ark., 2017).

HVT'nin vektör olarak kullanıldığı AIV'ye yönelik aşılarından birinde bakteriyel yapay kromozom teknolojisi kullanılmış ve HVT'nin bakteriyel yapay kromozom (BAC) klonunun H7N1 suşundan alınan hemagglutinin genini eksprese etmesi sağlanmıştır. Bu aşının H7N1 virüsüyle birlikte Marek hastalığına karşı da koruma sağlamakta olduğu yapılan denemeler sonucunda görülmüştür. Aşılı tavuklarda yalnızca HA proteinine karşı antikor oluşacağından ve yapılan çalışmada bu tavuklarda nükleoproteine (NP) yönelik antikora rastlanmamasından bu aşının aynı zamanda DIVA aşısı olarak da kullanılma potansiyeline sahip olduğu anlaşılmaktadır (Li ve ark., 2011).

Enfeksiyöz bursal hastalığa yönelik aşılarla da HVT vektör olarak kullanılmış, bunun için geliştirilen ilk aşıda enfeksiyöz bursal hastalık virüsünün (IBDV) VP2 geni HVT'nin genomunda bulunan US7 lokusuna eklenmişti. Fakat bu aşı Marek hastalığına karşı yeterince koruma sağlamadığı için ticari olarak üretilmemiştir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda Faragher 52/70, Delaware varyant E gibi farklı IBD suşlarına ait VP2 geni HVT'nin genomundaki farklı lokuslara eklenerek türlü aşılar geliştirilmiş, bunlardan bazıları lisans kazanarak üretilmeye ve satılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalarda bu aşıların Marek hastalığıyla birlikte enfeksiyöz bursal hastalığa karşı korumada başarılı ve son derece güvenli olduğu ortaya konmuştur. Diğer yandan aşıların etkisinin uzun sürdüğü, yüksek maternal antikorların varlığından etkilenmediği ve hem humoral hem de hücrel bağışıklığı uyardığı görülmüştür. Canlı aşılarla vektör aşıların karşılaştırıldığı bir çalışmada ise hayvanların virusa maruz bırakılması durumunda, bursa fabricius histolojik olarak incelendiğinde vektör aşısı verilen hayvanlarda daha az lezyon bulunduğu saptanmıştır (Bublot ve ark., 2007; Prandini ve ark., 2016; Hein ve ark., 2021).

HVT'nin vektör olarak kullanıldığı aşılarından bazıları ise enfeksiyöz bursal hastalığın yanında enfeksiyöz laringotrakeitis ya da Newcastle hastalığına da karşı koruma sağlayan kombine aşılar şeklinde hazırlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan aşıların kullanıldığı bir çalışmada HVT vektörüne NDV'nin F geni ile IBDV'nin VP2 geni eklenen vektör aşılar broiler tavuklara in ovo, yumurtacı tavuklara deri altı uygulanmış ve sonrasında hayvanlar

farklı günlerde Marek hastalığı virüsü, Newcastle hastalığı virüsü ve enfeksiyöz bursal hastalık virüsüne maruz bırakılmıştır. Çalışmanın neticesinde, fazla doz verilen hayvanlar da dahil olmak üzere hiçbir hayvanda yan etkiye rastlanmamış olması aşının güvenli olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte aşının maternal antikor varlığından etkilenmediği ve üç virüse karşı da koruma sağladığı saptanmıştır (Van Hulten ve ark., 2021).

Benzer şekilde HVT vektörü ile birden fazla hastalığa karşı geliştirilen aşının denendiği başka bir çalışmada ise HVT'nin US2 bölgesine, ILTV'nin gD ve gI genleri ile NDV'nin F genini içeren bir plasmidin eklenmesiyle elde edilen bir vektör aşısı kullanılmıştır. Bu aşı 18 günlük yumurtalar ile bir günlük civcivlere sırasıyla in ovo ve deri altı uygulandıktan sonra hayvanlar farklı zamanlarda ILTV, NDV ve MDV'ye maruz bırakılmıştır. Çalışmanın neticesinde hiçbir hayvanda yan etki ya da Marek hastalığında görülen lezyonlar saptanmamış olması aşının güvenliği olduğunu göstermiştir. Tek doz aşısı uygulanan hayvanlarda her üç hastalığa karşı da bağışıklık geliştiği görülmüş olup maternal antikorların aşısı etkinliğine olan etkisi çalışmada incelenmemiştir (Gergen ve ark., 2019).

Newcastle Hastalığı Virüsü (NDV)

Genomunun değiştirilmesinin veya klonlanabilmesinin kolay olması, yapısında başka virüslere ait genlerin stabil şekilde bulunabilmesi, humoral ve hücrel bağışıklığı uyarabilmesi gibi özelliklerinin bulunması NDV'yi viral bir vektör olarak ön plana çıkarmaktadır. İnek, domuz, kedi, köpek gibi pek çok hayvan türünde görülen hastalıklar için vektör olarak kullanılan NDV, tavuklarda avian influenza, enfeksiyöz bursal hastalık, enfeksiyöz bronşitis ve enfeksiyöz laringotrakeitis hastalıklarına, hindilerde ise avian metapneumovirus enfeksiyonuna karşı üretilen aşılarla vektör olarak kullanılmıştır (Hu ve ark., 2020).

Avian influenzaya yönelik aşılarla, yüksek patojeniteli avian influenza virüslerinin (HPAIV) H5 ve H7 alt tiplerine ait farklı suşlardan alınan hemagglutinin geni NDV'ye aktarılmıştır. Bunların SPF tavuklardaki uygulamalarında hayvanların hem HPAIV hem de NDV'ye karşı korunduğu tespit edilmiştir ancak saha şartlarında yüksek immünitelyi sağlamak için birden fazla aşılama yapılması da sıklıkla karşılaşılan bir durum olarak dikkati çekmiştir. Bu işlem sonraki nesilde maternal antikorların

yüksek olmasını sağlamayı amaçlansa da maternal antikorların varlığı AIV ve NDV'ye karşı zayıf antikor yanıtı gözlenmesine de neden olabilmektedir ve bunu engellemek için kimerik NDV vektör aşılı geliştirilmiştir (Choi, 2017). Bu aşılılar NDV'nin hemagglutinin nöraminidaz ve füzyon proteinlerinin ektodomainlerini, avian paramyxovirus serotip 2'ninkilerle değiştirilerek oluşturulmuştur ve yapılan çalışmalar bu aşılıların, NDV ile çapraz reaksiyona girmeden genç tavuklarda maternal antikorların yüksek derecede bulunduğu dönemde hastalığa karşı güvenli bir şekilde koruma sağladığını göstermektedir (Kim ve ark., 2017; Liu ve ark., 2018).

Kanatlı hayvanlar için özellikle ekonomik açıdan önem arz eden hastalıklardan bir diğeri olan enfeksiyöz bursal hastalığa yönelik de farklı türlerde aşılı geliştirilmiştir. Bu hastalık için uygulanan canlı attenüe aşılıların etkili olmalarının yanı sıra genç tavuklarda ciddi yan etkilere neden olabilmesi, aynı zamanda maternal antikor engelini aşamaması gibi sebeplerden ötürü başka alternatiflere yönelme ihtiyacı duyulmuştur. Aynı zamanda virulansı artmış yeni antijenik varyant ve suşların ortaya çıkmasında da canlı aşı kullanımının katkısı olduğu da düşünülmektedir. Bu nedenle, bir alternatif olarak geliştirilen vektör aşılılarda IBDV'den alınan VP2 geni, NDV'nin LaSota suşunun genomuna eklenmiş, yapılan denemeler sonucunda aşının genç hayvanlarda daha güvenli bir koruma sağladığı ve SPF tavukları da NDV ile IBDV enfeksiyonlarına karşı koruduğu saptanmıştır (Huang ve ark., 2004; Choi, 2017).

Özellikle solunum sistemi ile böbrekleri etkileyen türleri bulunan enfeksiyöz bronşitisin günümüzde kullanılan canlı aşılılarının, saha suşlarıyla rekombinasyonları sonucu yeni varyantların oluşması riskinin yanında canlı NDV aşılılarıyla çakışmaları ve etkinliklerinin azalması durumları bulunmaktadır. Bu nedenle geliştirilen vektör aşılıda NDV'nin LaSota suşuna IBV'nin Massachusetts suşunun S2 geni aktarılmış ve bu aşılıyla yapılan çalışmada aşının hastalığa karşı korumada etkili olduğu görülmüştür (Toro ve ark., 2014; Choi, 2017).

Solunum sisteminde hastalık oluşturan bir başka etken olan enfeksiyöz laringotrakeitis virüsüne yönelik canlı aşılılarda, hayvanlar arasındaki geçişlerde virulans kazanma ve latent enfeksiyonlara neden olma olasılıkları bulunmaktadır ve bu durum daha güvenli aşılı üzerinde çalışılması ihtiyacını doğurmuştur. Bu doğrultuda yapılan

çalışmada NDV'nin LaSota suşuna ILTV'nin immünite rol alan üç önemli yüzey glikoproteinleri olan gB, gC ve gD'nin genleri ayrı ayrı ve kombine şekillerde aktarılmıştır. Yapılan denemelerin neticesinde gB içeren aşı ile aşılıanan hayvanlarda hastalığın şiddetinin düşmediği ve virüslerin replikasyonuna bir etkisi olmadığı görülmüştür. Buna karşın rNDV gC ya da multivalan aşı ile aşılıanan hayvanlarda kısmi koruma ile virüs replikasyonunda düşüş ve rNDV gD ile aşılıamada ise tam bir koruma elde edildiği saptanmıştır. Bu nedenle gD ile oluşturulan vektör aşılıların kullanımının bu iki hastalığı karşı korunmada etkili ve güvenli olduğu düşünülmektedir (Basavarajappa ve ark., 2014).

Avian Lökozis Sarkoma Virüsü (ALSV)

Bu gruptaki aşılılardan biri, *Retroviridae* ailesinden *Alpharetrovirus* cinsine ait bir tür olan avian lökozis sarkoma virüsüne (ALSV), Newcastle hastalığı virüsünün hemagglutinin nöraminidaz ve fosfoprotein (P) genleri aktararak elde edilmiştir. Bu aşının denendiği çalışmanın sonucunda, HN geni bulunan retrovirüsün verildiği tavuklarda düşük de olsa tespit edilecek düzeyde bir immün yanıt geliştiği ve bu hayvanların NDV ile karşılaştırılması sonucunda hastalıktan korundukları gözlenmiştir. Diğer yandan P geni içeren retrovirüsün verildiği hayvanlarda ise NDV ile karşılaşma sonucunda aşılıama yapılmayan ya da NDV geni içermeyen retrovirus verilmiş hayvanlara göre daha erken ve daha şiddetli enfeksiyon görülmüştür. Türü tahminler olsa da bu durumu araştırmacılar kesin bir şekilde açıklayamamışlardır (Morrison ve ark., 1990). Aynı türdeki bir virüsün kullanıldığı bir başka çalışmada, bu kez avian lökozis virüsüne avian influenza virüsünün H7N7 suşuna ait bir hemagglutinin geni aktarılmıştır. Bu genin seçilmesinin nedeni ise bu genin, virus adsorbsiyonu ve penetrasyonuna, böylelikle de nötralize edici antikorların stimülasyonuna aracılık eden bir glikoproteini kodluyor olmasıdır. Bu deneme sonucunda serumda hemagglutinasyon inhibisyon (HI) ve nötralize edici antikor seviyeleri inaktif influenza aşılılarının kullanımında görülen değerden çok daha düşük bulunmuş olsa da aşının AI H7N7'ye karşı koruma sağladığı görülmüştür (Hunt ve ark., 1988).

Diğer Viral Vektörler

Sıklıkla üzerinde çalışılan vektörler haricinde de henüz lisansı bulunmayan lakin bazı çalışmalara konu

olan viral vektörler de bulunmaktadır. Bunlardan biri *Rhabdoviridae* ailesine ait bir tür olan veziküler stomatit virüsüdür (VSV). Bu virüs, kanatlı hayvanlara olduğu kadar insanlarda da sağlık açısından risk oluşturan avian influenza virüsünün H5 ve H7 alt tiplerine yönelik aşılar da vektör olarak kullanılmış, bu virüsten silinen G geni yerine H5 suşlarından hemagglutinin, H7 suşlarından ise hemagglutinin ve nükleoprotein genleri yerleştirilmiştir. Yapılan denemelerde uygulanan tek bir doz aşı ile H5N1'e karşı tam bir koruma sağlanmasının yanında virüs saçılımı da önlenmiştir. Diğer çalışmada ise H7N1'e yönelik ilk aşılardan üç hafta sonra bir booster aşı daha yapılmış ve bunun sonucunda hayvanlar H7N1 ile karşılaştıklarında hastalığa dair hiçbir semptom göstermemişlerdir. Bununla beraber virüsün saçılmasında da aşısız hayvanlara göre azalma gözlenmiştir. Her iki aşı da serolojik incelemelerde hasta ile enfekte hayvanların ayırımında kullanılabildiği için DIVA aşı olma özelliğini de taşımaktadır (Kalhorova ve ark., 2009; Halbherr ve ark., 2013).

Hem insan hem de hayvanlarda görülen farklı hastalıklardan korunmada vektör aşılar da kullanıldıktan ve başarılı sonuçlar elde edildikten sonra enfeksiyöz bursal hastalık virüsünün vektör olarak potansiyeli üzerinde durulmaya başlanmıştır. Bunun için NDV'nin hemagglutinin nöraminidaz proteininin nötralize edici epitoplarını kodlayan bir sekans IBDV vektörünün genomundaki belli bölgelere eklenmiştir. Aşılama sonucunda hayvanlarda IBDV'ye karşı %70-80, NDV'ye karşı ise %50-60 koruma sağlanmıştır (Li ve ark., 2014).

Bakteriyel Vektörler

Bir vektör olarak kullanıldıklarında, kolay üretilebilmeleri, oral yolla verilebilmeleri ve hücrel immün yanıtla birlikte humoral yanıtı uyarabilmeleri gibi avantajları bulunan *Salmonella* cinsi bakteriler hem insan hem de hayvan sağlığına yönelik aşılar da kullanılabilmektedir. Bu konuda yapılan önemli çalışmalardan biri de avian influenzaya yönelik geliştirilen aşılar üzerinedir. Bu çalışmalardan birinde attenüe edilmiş *Salmonella* Enteritidis'in genomu AIV'nin M2e protein epitoplarını ekspres edecek şekilde değiştirilmiştir. Bu aşının verildiği tavuklar LPAI H7N2 ve HPAI H5N1'le karşılaştıklarında morbiditede ve semptomların görülme süresinde düşüş saptanmış olsa da HPAI'nın neden olduğu mortalitede bir değişim olmamıştır. Bu sebeple bu aşının daha çok

düşük patojeniteli avian influenzaya yönelik bir aşı adayı olabileceği düşünülmektedir (Hargis ve ark., 2008).

Campylobacter bakterilerine bağlı hastalıklar bütün dünyada özellikle insan sağlığını tehdit eden bir unsur olarak görülmekte ve bu hastalıkların önüne geçmek adına tavuklardaki *Campylobacter* enfeksiyonları engellenmeye çalışılmaktadır. Diğer kontrol önlemleriyle birlikte aşılamının da hastalıkların önlenmesindeki katkısı etkisi büyüktür, bu sebeple bu bakterilere yönelik aşı geliştirmek için uzun yıllar boyunca türlü metotlar denenmiştir ancak kesin koruma sağlayan ticari bir aşı henüz geliştirilememiştir.

Son zamanlarda attenüe edilmiş *Salmonella* suşları vektör aşı çalışmalarında sıklıkla kullanılmış olsa da bu çalışmalar arasında tutarsızlıklar bulunmaktadır. Yapılan denemelerin çoğunda *Salmonella* Typhimurium'un farklı suşları, daha az olarak *Salmonella* Enteritidis ve *C. jejuni*'nin özellikle CjaA antijeni olmak üzere, CjaC, CjaD gibi çeşitli antijenleri kullanılmıştır. Her ne kadar çalışmaların sonuçları arasında farklılıklar bulunsun da bunlar arasında başarılı aşı adayları da bulunmaktadır (Wyszyńska ve ark., 2004; Layton ve ark., 2011; Kashoma ve ark., 2019).

SONUÇ

Aşılar, hastalıklara karşı korunmada iyi biyogüvenlik uygulamaları ile işletmelerde alınacak diğer önlemlerin yanında önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle gelişen teknolojiyle birlikte bu alanda yapılan çalışmalar da giderek artmakta, dünyanın çeşitli bölgelerinde hayvanları olduğu kadar insanları da tehdit eden hastalık etkenlerine karşı farklı koruma yöntemleri aranmaktadır.

Hayvan sağlığı konusunda konvansiyonel aşıların kullanımı son derece yaygın olsa da son dönemde gelişen teknolojilerin ve bilginin doğrultusunda geliştirilen çeşitli hayvan türlerine yönelik vektör aşıların sayısı ve kullanımı her geçen gün artmaktadır.

Hem ülkemizde hem de dünya genelinde hâlâ sıklıkla görülen, zoonoz olanların toplum sağlığını tehdit etme riski bulunan ve ekonomik kayıplara da sebep olabilen kanatlı hayvan hastalıklarıyla mücadelede aşılar en önemli unsurlardan biridir. Günümüzde lisanslı aşıların birçoğu canlı attenüe ya da inaktif aşılar olsa da rekombinant aşı teknolojisindeki gelişmelerle birlikte vektör aşılar da ön plana çıkmaya başlamıştır. Bu aşılar üzerindeki çalışmaların artmasıyla birlikte yakın

gelecekte daha fazla vektör aşının kanatlı işletmelerinde kullanılacağı ön görülebilir çünkü bu aşilar hastalıklara uzun dönemli koruma sağladıkları gibi üretim sürecinde kullanım kolaylığı ve otomasyona elverişli olması (in ovo) gibi avantajları vardır. Ayrıca vektör aşiların hücrel immün yanıtla humoral immün yanıtı birlikte uyarmaları, adjuvan ihtiyacının bulunmaması, tekrarlayan aşilamalara olan ihtiyacı azaltması, hasta hayvanları aşılı hayvanlardan ayırmada kullanılan DIVA aşısı özelliğini taşıyabilmeleri gibi olumlu yönleri de bulunmaktadır.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda özellikle avian influenza, Newcastle hastalığı, Marek hastalığı, enfeksiyöz laringotrakeitis, enfeksiyöz bursal hastalık, enfeksiyöz bronşitis gibi hastalıkların etkenlerine ait genlerin viral vektörlere aktarılmasıyla elde edilen aşiların büyük oranda başarıya ulaştığı ortaya konmaktadır. Aynı patojenin farklı genlerinin yine aynı vektöre aktarıldığı ya da aynı hastalık etkeninin genlerinin farklı vektörlerde eksprese edildiği çalışmalarda da sonuçların paralel olduğu görülmektedir.

KAYNAKÇA

- André, F. E. (2003). Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises. *Vaccine*, 21, 593–595.
- Arda, M. & Sareyyüpoğlu, B. (2004). Aşilar; Hazırlama Teknikleri, Avantaj ve Dezavantajları. Ankara, Turkey: İnkansa Yayınları.
- Basavarajappa, M. K., Kumar, S., Khattar, S. K., Gebrelul, G. T., Paldurai, A. & Samal, S. K. (2014). A recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing infectiouslaryngotracheitis virus (ILTV) surface glycoprotein D protects against highly virulent ILTV and NDV challenges in chickens. *Vaccine*, 32, 3555-3563.
- Bouazzaoui, A., Abdellatif, A. A. H., Al-Allaf, F. A., Bogari, N. M., Al-Dehlawi, S. & Qari, S. H. (2021). Strategies for Vaccination: Conventional Vaccine Approaches Versus New-Generation Strategies in Combination with Adjuvants. *Pharmaceutics*, 13, 140.
- Bublot, M., Pritchard, N., Le Gros, F. X. & Goutebroze, S. (2007). Use of a vectored vaccine against infectious bursal disease of chickens in the face of high-titred maternally derived antibody. *J Comp Pathol*, 137, S81–S84.
- Bublot, M., Pritchard, N., Swayne, D. E., Selleck, P., Karaca, K., Suarez, D. L., Audonnet, J. C. & Mickle, T. R. (2006). Development and use of fowlpox vectored vaccines for avian influenza. *Ann N Y Acad Sci*, 1081,193-201.
- Büyüktanır, Ö. (2010). Günümüzde Biyoteknolojik Bakteriyel Aşilar. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 5, 97-105.
- Choi, K. S. (2017). Newcastle disease virus vectored vaccines as bivalent or antigen delivery vaccines. *Clin Exp Vaccine Res*, 6, 72-82.
- El Khantour, A., Darkaoui, S., Tatár-Kis, T., Mató, T., Essalah-Bennani, A., Cazaban, C. & Palya, V. (2017). Immunity Elicited by a Turkey Herpesvirus-Vectored Newcastle Disease Vaccine in Turkey Against Challenge With a Recent Genotype IV Newcastle Disease Virus Field Strain. *Avian Dis*, 61, 378-386.
- Esaki, M., Noland, L., Eddins, T., Godoy, A., Saeki, S., Saitoh, S., Yasuda, A. & Dorsey, K. M. (2013). Safety and Efficacy of a Turkey Herpesvirus Vector Laryngotracheitis Vaccine for Chickens. *Avian Dis*, 57, 192-198.
- Gergen, L., Cook, S., Ledesma, B., Cress, W., Higuchi, D., Counts, D., Cruz-Coy, J., Crouch, C., Davis, P., Tarpey, I. & Morsey, M. (2019). A double recombinant herpes virus of turkeys for the protection of chickens against Newcastle, infectious laryngotracheitis and Marek's diseases. *Avian Pathol*, 48, 45–56.
- Gimeno, I. M., Cortes, A. L., Guy, J. S., Turpin, E. & Williams, C. (2011). Replication of recombinant herpesvirus of turkey expressing genes of infectious laryngotracheitis virus in specific pathogen free and broiler chickens following in ovo and subcutaneous vaccination. *Avian Pathol*, 40, 395-403.
- Halbherr, S. J., Brostoff, T., Tippenhauer, M., Locher, S., Berger Rentsch, M. & Zimmer, G. (2013). Vaccination with Recombinant RNA Replicon Particles Protects Chickens from H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus. *PLoS One*, 8, e66059.
- Hanley, K. A. (2011). The double-edged sword: How evolution can make or break a live-attenuated virus vaccine. *Evolution (N Y)*, 4, 635–643.

- Hargis, B. M., Layton, S. L., Kapczynski, D. R., Cole, K., Cox, M. M., Ywon, Y. M., Bergham, L.R., Liljebjelke, K.A. & Bottje, W. J. (2008). Development and evaluation of a potential universal Salmonella-vectored avian influenza vaccine. *Poultry Science Association Annual Meeting*, Niagara Falls, Canada, 2008, 2-3.
- Heckert, R. A., Riva, J., Cook, S., Mcmillen, J. & Schwartz, R. D. (1996). Onset of protective immunity in chicks after vaccination with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing Newcastle disease virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase antigens. *Avian Dis*, 40, 770-777.
- Hein, R., Koopman, R., García, M., Armour, N., Dunn, J. R., Barbosa, T. & Martinez, A. (2021). Review of Poultry Recombinant Vector Vaccines. *Avian Dis*, 65, 438-452.
- Hu, Z., Ni, J., Cao, Y. & Liu, X. (2020). Newcastle Disease Virus as a Vaccine Vector for 20 Years: A Focus on Maternally Derived Antibody Interference. *Vaccines*, 8, 222.
- Huang, Z., Elankumaran, S., Yunus, A. S. & Samal, S. K. (2004). A recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus (IBDV) protects against NDV and IBDV. *J Virol*, 78, 10054-10063.
- Hunt, L. A., Brown, D. W., Robinson, H. L., Naeve, C. W., & Webster, R. G. (1988). Retrovirus-expressed hemagglutinin protects against lethal influenza virus infections. *J Virol*, 62, 3014-3019.
- Jackwood, M. W. (1999). Current and Future Recombinant Viral Vaccines for Poultry. In, Dodds WJ, Schultz RD, Editors. *Veterinary Vaccines and Diagnostics*. Cilt 41. San Diego, ABD: Academic Press; 1999, pp. 518-519.
- Jafari, A., Danesh Pouya, F., Niknam, Z., Abdollahpour-Alitappeh, M., Rezaei-Tavirani, M. & Rasmi, Y. (2022). Current advances and challenges in COVID-19 vaccine development: from conventional vaccines to next-generation vaccine platforms. *Mol Biol Rep*, 49, 4943-4957.
- Kalhoroa, N. H., Veits, J., Rautenschlein, S. & Zimmer, G. (2009). A recombinant vesicular stomatitis virus replicon vaccine protects chickens from highly pathogenic avian influenza virus (H7N1). *Vaccine*, 27, 1174-1183.
- Kashoma, I. P., Srivastava, V. & Rajasheka, G. (2019). Advances in Vaccines for Controlling Campylobacter in Poultry. In, Venkitanarayanan K, Thakur S, Ricke SC. Editors. *Food Safety in Poultry Meat Production*. Cham, İsviçre: Springer Nature Switzerland; 2019, pp. 191-210.
- Kim, S. H., Paldurai, A. & Samal, S. K. (2017). A novel chimeric Newcastle disease virus vectored vaccine against highly pathogenic avian influenza virus. *Virology*, 503, 31-36.
- Layton, S. L., Morgan, M. J., Cole, K., Kwon, Y. M., Donoghue, D. J., Hargis, B. M. & Pumford, N. R. (2011). Evaluation of Salmonella-Vectored Campylobacter Peptide Epitopes for Reduction of Campylobacter jejuni in Broiler Chickens. *Clin Vaccine Immunol*, 18, 449-454.
- Li, K., Gao, L., Gao, H., Qi, X., Gao, Y., Qin, L., Wang, Y. & Wang, X. (2014). Recombinant infectious bursal disease virus expressing Newcastle disease virus (NDV) neutralizing epitope confers partial protection against virulent NDV challenge in chickens. *Antiviral Res*, 101, 1-11.
- Li, Y., Reddy, K., Reid, S. M., Cox, W. J., Brown, I. H., Britton, P., Nair, V. & Iqbal, M. (2011). Recombinant herpesvirus of turkeys as a vector-based vaccine against highly pathogenic H7N1 avian influenza and Marek's disease. *Vaccine*, 29, 8257-8266.
- Liu, J., Xue, L., Hu, S., Cheng, H., Deng, Y., Hu, Z., Wang, X. & Liu, X. (2018). Chimeric Newcastle disease virus-vectored vaccine protects chickens against H9N2 avian influenza virus in the presence of pre-existing NDV immunity. *Arch Virol*, 163, 3365-3371.
- Lupini, C., Cecchinato, M., Ricchizzi, E., Naylor, C. J. & Catelli, E. (2011). Turkey rhinotracheitis outbreak caused by the environmental spread of a vaccine derived avian metapneumovirus. *Avian Pathol*, 40, 525-530.
- Lütticken, D., Segers, R. P. & Visser, N. (2007). Veterinary vaccines for public health and prevention of viral and bacterial zoonotic diseases. *Rev Sci Tech*, 26, 165-177.
- Morrison, T., Hinshaw, V. S., Sheerar, M., Cooley, A. J., Brown, D., Mcquain, C. & McGinnes, L.

- (1990). Retroviral expressed hemagglutinin-neuraminidase protein protects chickens from Newcastle disease virus induced disease. *Microb Pathog*, 9, 387-396.
- Moss, B. (2013). Poxvirus DNA Replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a010199.
- Niewiesk, S. (2014). Maternal antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies. *Front Immunol*, 5, 446.
- Prandini, F., Simon, B., Jung, A., Pöppel, M., Lemiere, S. & Rautenschlein, S. (2016). Comparison of infectious bursal disease live vaccines and a HVT-IBD vector vaccine and their effects on the immune system of commercial layer pullets. *Avian Pathol*, 45, 114–125.
- Rajasekaran, R., Kirubaharan, J. J. & Vidhya, M. (2018). Recombinant Veterinary Vaccines. *Indian Farmer*, 5, 507-513.
- Romanutti, C., Keller, L. & Zanetti, F. A. (2020). Current status of virus-vectored vaccines against pathogens that affect poultry. *Vaccine*, 38, 6990–7001.
- Shams, H. (2005). Recent developments in veterinary vaccinology. *Vet J*, 170, 289–299.
- Skinner, M. A., Laidlaw, S. M. & Elda, I. (2005). Fowlpox virus as a recombinant vaccine vector for use in mammals and poultry. *Expert Rev Vaccines*, 4, 63-76.
- Sonoda, K., Sakaguchi, M., Okamura, H., Yokogawa, K., Tokunaga, E., Tokiyoshi, S., Kawaguchi, Y. & Hirai, K. (2000). Development of an effective polyvalent vaccine against both Marek's and Newcastle diseases based on recombinant Marek's disease virus type 1 in commercial chickens with maternal antibodies. *J Virol*, 74, 3217–3226.
- Tizard, I. R. (2020). Vaccines for Veterinarians. St. Louis, Missouri, ABD: Elsevier.
- Tong, G. Z., Zhang, S. J., Meng, S. S., Wang, L., Qiu, H. J., Wang, Y. F. & Wang, M. (2001). Protection of chickens from infectious laryngotracheitis with a recombinant fowlpox virus expressing glycoprotein B of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Pathol*, 30, 143–148.
- Toro, H., Zhao, W., Breedlove, C., Zhang, Z., Van Santen, V. & Yu, Q. (2014). Infectious Bronchitis Virus S2 Expressed from Recombinant Virus Confers Broad Protection Against Challenge. *Avian Dis*, 58, 83-89.
- Van Hulten, M. C. W., Cruz-Coy, J., Gergen, L., Pouwels, H., Ten Dam, G. B., Verstegen, I., de Groof, A., Morsey, M. & Tarpey, I. (2021). Efficacy of a turkey herpesvirus double construct vaccine (HVT-ND-IBD) against challenge with different strains of Newcastle disease, infectious bursal disease and Marek's disease viruses. *Avian Pathol*, 50, 18–30.
- Wyszyńska, A., Raczko, A., Lis, M. & Jagusztyn-Krynicka, E. K. (2004). Oral immunization of chickens with avirulent Salmonella vaccine strain carrying C. jejuni 72Dz/92 cjaA gene elicits specific humoral immune response associated with protection against challenge with wild-type Campylobacter. *Vaccine*, 22, 1379-1389.
- Yamanouchi, K., Barrett, T. & Kai, C. (1998). New approaches to the development of virus vaccines for veterinary use. *Rev Sci Tech off Int Epiz*, 17, 641-653.