

ISSN 1016-3573



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



ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ

JOURNAL OF ETLİK VETERINARY MICROBIOLOGY
ANKARA – TURKEY

Cilt/Volume 27 ♦ Sayı/Number 1 ♦ 2016

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi
Cilt/Volume 27 ♦ Sayı/Number 1 ♦ 2016
Journal of Etlik Veterinary Microbiology
Yılda iki kez yayımlanır / Published two times per year
ISSN 1016-3573

Sahibi

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

Yayın Kurulu / Publication Board

Sorumlu Yazı İşleri Müdürü / Managing Editor

Dr. A. Burak Güngör

Editör / Editor in Chief

Dr. Tahsin Onur Kevenk

Bilimsel Kurul / Editorial Board

Dr. Erhan Akçay

Dr. Asiye Dakman

Dr. Ali Erkurt

Dr. Elçin Günaydın

Dr. Filiz Şen

Adres / Address

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü

Ahmet Şefik Kolaylı Cad. No 21/21-A

06020 Etlik - Ankara / TÜRKİYE

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

Faks : +90 312 321 17 55

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

E-posta : etlikvetmikrobiyolderg@gmail.com

Hakem Listesi / Referee List*

Dr. Ayşe ATEŞOĞLU	Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü
Dr. Eray ATIL	Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü
Dr. Aysel BACA	Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü
Doç. Dr. Faruk BOZKAYA	Harran Üniv. Veteriner Fakültesi Genetik AD
Prof. Dr. Bilal DİK	Selçuk Üniv. Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD
Prof. Dr. Meryem EREN	Erciyes Üniv. Veteriner Fakültesi Biyokimya AD
Doç. Dr. Veli GÜLYAZ	Şap Enstitüsü Müdürlüğü
Prof. Dr. Hasan Hüseyin HADIMLI	Selçuk Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD
Prof. Dr. Mustafa HASÖKSÜZ	İstanbul Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD
Doç. Dr. Şahver Ege HİŞMİOĞULLARI	Balıkesir Üniv. Veteriner Fakültesi Farmakoloji AD
Prof. Dr. Gülhan TÜRKEY HOŞTÜRK	İstanbul Üniv. Veteriner Fakültesi Biyokimya AD
Yrd. Doç Dr. Özgür KANAT	Mustafa Kemal Üniv. Veteriner Fakültesi Patoloji AD
Prof. Dr. Zafer KARAER	Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Protozooloji AD
Prof. Dr. Firuze KURTOĞLU	Selçuk Üniv. Veteriner Fakültesi Biyokimya AD
Doç. Dr. Ertan Emek ONUK	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD
Dr. Ümit ÖZDEMİR	Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü
Prof. Dr. Şinasi UMUR	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD
Dr. H. Hüseyin ÜNAL	Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü
Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ	Uludağ Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD

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

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

Copyright © Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2016, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

Basım Tarihi / Publishing Date: Haziran / June 2016, Baskı adedi / Circulation: 500

Tasarım ve Baskı / Printing



Medisan Yayınevi Ltd.Şti.

Çankırı Cad. 45 / 347 Ulus - Ankara, Türkiye

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

İçindekiler / Contents

Araştırma Makalesi / Research Article	Sayfa
Effect of Female Camel Urine on Different Testosterone Levels in Adult Male Rats Dişi Deve İdrarının Erişkin Erkek Ratlarda Farklı Testosteron Seviyelerine Etkisi Khogali M.E. Salwa, Abd Alla M.A. Dalia, Elhassan AM , Ishraga G. Ibrahim, Esra M. Musa, Samia H. Abdarahman.....	1
Prevalence of <i>Hyalomma aegyptium</i> (Linnaeus, 1758) on Tortoises (<i>Testudo graeca</i>) in Izmir and Aydin Province, Turkey İzmir ve Aydın İlindeki Kaplumbağalarda <i>Hyalomma aegyptium</i> (Linnaeus, 1758)'un Yaygınlığı Serkan Bakirci.....	5
Contagious Ecthyma Virus (ORF) İzolasyonunda FLK-BLV-044 Hücre Kültürünün Kullanılması The Use of FLK-BLV-044 Cell Culture for Isolation of Contagious Ecthyma Virus (Orf) Veli Gülyaz, Fahriye Saraç, Mustafa Hasöksüz, Hüseyin Çakıroğlu, Zeynel Arslan.....	8
Contagious Ecthyma (ORF) enfeksiyonu görülen koyun ve kuzularda pestivirus varlığının araştırılması The Determination of Presence of Pestivirus in Sheep and Lambs Infected with Contagious Ecthyma (Orf) Veli Gülyaz, Aysel Baca, Fahriye Saraç, Ahmet Sait.....	12
Marmara Bölgesinde Yeni Doğan Buzağı İshallerinde Bovine Coronavirusların Saptanması ve Patojenite Çalışması The Determination and Pathogenicity of Bovine Coronavirus in Newborn Calves with Diarrhea in Marmara Region Züleyha Pestil, Veli Gülyaz, Mustafa Hasöksüz.....	16
Subklinik Mastitisli İneklerde Süt ve Süt Hücrelerinde Vitamin C Düzeyleri Effects of Subclinical Mastitis on Milk Somatic Cells and Milk Vitamin C Levels in Cows Pınar Peker Akalın, Yaşar Ergün, Nuri Başpınar, Gökhan Doğruer, Altuğ Küçükgül, Zafer Cantekin, Mustafa İşgör, Mustafa Sarıbay, Ayhan Baştan, Ece Koldaş, Seçkin Salar, İshak Gökçek.....	21
Sığır ve Koyunlarda Eş Zamanlı Brusella ve Şap Aşısı Uygulamalarının Antikor Düzeylerine Etkisi The Effect of Simultaneous Application of Brucella and FMD Vaccines on Antibody Level in Cattle and Sheep İbrahim Hancı, İ. Safa Gürcan, Ahmet Sönmez.....	27

Derleme / Review Article

Bakteriyofaj Tedavisi

Bacteriophage Therapy

Demet Yaman Aydoğan, H. Hüseyin Hadımlı38

MikroRNA'lar ve Atlarda MikroRNA'lar ile İlgili Yapılan Çalışmalar

MicroRNA's and Studies Performed on Horses Concerning MicroRNA's

Seda Ekici, Özge Özmen48

Su Samurlarında (*Lutra lutra*) Görülen HastalıklarDiseases in Otters (*Lutra lutra*)

Banur Boynukara Timur Gülhan.....53

Gen İdentifikasyonu ve DNA Kütüphanelerinin Oluşturulması

Gene Identification and Construction of DNA Libraries

Gülseren Yıldız Öz, Vahdettin Altunok63

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayım Koşulları

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Teşekkür bölümü, gerekli görülüyorsa kaynaklardan hemen önce belirtilmelidir.

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

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

Kaynak yazımı ve sıralaması aşağıdaki gibi yapılmalıdır;

Sürelî Yayın:

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

Yazarlı Kitap:

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

Editörlü Kitap:

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

Editörlü Kitapta Bölüm:

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

Kongre Bildirileri:

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

Tezler:

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

Anonim:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

14. Dergiye gönderilen yazılar geliş tarihine göre yayımlanır.

15. Yayımlanmayan yazılar, yazarına iade edilmez.

Journal of Etlik Veterinary Microbiology Publication Conditions

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgements must be indicated before references if necessary.

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

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

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

For articles:

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

For books:

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

For edited books:

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

For chapter in edited books:

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

For congress papers:

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

For dissertations:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15. Unpublished papers are not returned to their author.

Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi
Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi - Ankara

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

Yayının adı:

Yazar/ların ad/ları:

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

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

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

Yazışma Adresi:

Copyright Release

Journal of Etlik Veterinary Microbiology Ankara - TURKEY

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

Title of paper:

Authors names:

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

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

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

To be signed by all author/s

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

Correspondence Address:

Effect of Female Camel Urine on Different Testosterone Levels in Adult Male Rats

**Khogali M.E. Salwa¹, Abd Alla M.A. Dalia², Elhassan AM³, Ishraga G. Ibrahim¹,
Esra M. Musa¹, Samia H. Abdarahman¹**

¹Central Veterinary Research Laboratories. Soba, Khartoum, Sudan

²University Of Khartoum, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry

³AlribatUniversity, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognasy, Sudan

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

Abstract: Our objectives were to investigate the effect of female camel urine on abnormal hormonal levels in male rats and to evaluate total protein, globulin, albumin and body weight gain according to administration of female camel urine. Twenty four adult Wistar albino rats were divided into four groups, normal testosterone control, treated control and high and low serum testosterone groups which produced by injection of testosterone Enanthate and Lead Acetate respectively twice a week for 21 days. All groups except the control group (normal) were orally dosed female camel urine (2ml / 100 gram body weight) for another 21 days. Female camel urine regulated the high and low testosterone level to their normal serum level. Testosterone level was significantly increased ($P<0.01$) in group three after seven days of female camel urine administration. The same time no change was observed on normal testosterone level group. In the 3th week all treated groups showed significant ($P<0.01$) increase in the testosterone level compared to the previous week. Total protein, globulin and albumin were significantly ($P<0.05$) elevated before and after female camel urine treatment.

Key words: Camel urine, rat, testosterone

Dişi Deve İdrarının Erişkin Erkek Ratlarda Farklı Testosteron Seviyelerine Etkisi

Özet: Bu çalışmada dişi deve idrarının erkek ratlarda anormal hormon seviyelerine etkisi ile total protein, globulin, albümin ve canlı ağırlık artışı değerlerindeki değişimin araştırılması amaçlandı. Yirmi dört erişkin Wistar albino rat; normal testosteron kontrol, tedavi edilmiş kontrol, yüksek serum testosteron ve düşük serum testosteron olmak üzere dört gruba ayrıldı. Düşük ve yüksek testosteron seviyeleri 21 gün boyunca haftada iki kez testosteron enantat ve kurşun asetat enjeksiyonu ile sağlandı. Enjeksiyonlar ile başlangıç seviyelerine ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli testosteron seviyeleri elde edildi ($P<0,01$). Kontrol grubu hariç tüm gruplara 21 gün boyunca oral olarak dişi deve idrarı verildi (2 ml/ 100 g vücut ağırlığı). Dişi deve idrarı düşük ve yüksek testosteron seviyelerine sahip gruplarda testosteron seviyelerini normal serum seviyelerine düşürürken, normal serum seviyesine sahip tedavi edilmiş grupta idrar uygulamasından 7 gün sonra testosteron seviyesinde herhangi bir değişikliğe yol açmadı. Tedavi edilmiş tüm gruplarda üçüncü haftada bir önceki haftaya kıyasla testosteron seviyelerinde istatistiksel olarak önemli artışlar şekillendi ($P<0,01$). Total protein, globulin ve albümin seviyeleri idrar uygulamasından önce ve sonra yükseldi ($P<0,05$).

Anahtar kelimeler: Deve idrarı, rat, testosteron

Introduction

Urine of one humped camel (*Camelus Dromedaries*) is medically used for centuries in different parts of Arab countries. It has been shown throughout the history of medical science till today that urine has a profound medical uses for allergies, psoriasis, burns, internal disorders, tuberculosis, fertility, alopecia and cancer [12, 8, 13]. Camel urine can influence the hormonal changes that lead to hair losses.

Testosterone is a more potent androgen that results in miniaturization of hair follicle and changes the

cyclic phase of hair growth cycle [17]. Hormonal problems are one of the causes of hair loss [14]. Testosterone is the major hormone that affect fertility in men, it is needed to initiate spermatogenesis at puberty and for maintenance of this process in the adult. Sex hormone levels can cause changes in body composition independently and through mediating factors. Testosterone has anabolic effects which promote protein synthesis and growth of the tissues, growth of muscle mass and strength, increase bone density and strength, stimulation of linear growth and bone maturation. Testosterone

and 5 alpha dihydrotestosterone (DHT) are responsible for most of the biological androgenic effects. Several studies discussed the effect of natural products, herbs and medicinal plants on Testosterone Hormone Level [2], but research that conducting the effects of camel urine on hormones or protein metabolism are scarce. This study is designed to examine the effect of camel urine on different (TL) together with some parameters related to protein metabolism namely serum total protein, globulins and albumin as well as body weights.

Materials and Methods

Experimental Animals

In this study 24 Wistar albino, adult male rats weighing 140 to 200 grams are used. Animals were kept in the Central Veterinary Research Laboratories premises at Soba, Khartoum, Sudan. They were kept under standard condition of temperature (23°C) and relative humidity (65%) 12h light and 12h dark cycle and adequate ventilation, they were provided with balanced diet and water ad libitum.

Experimental Design

Rats were randomly selected and assigned into four groups. Group one was control for normal testosterone level, group two was control for female camel urine, group three and four represent high and low testosterone levels.

Dosing

Urine was collected by natural urination or by tashweel technique (2 ml/100Gb.w) high and low Testosterone level were brought by parental injection of Testosterone Enanthate (1.5 mg) and Lead Acetate (8 mg) respectively according to the method described by Brunner et al., [5] and [4].

Blood Samples

Blood samples were taken once before female camel urine (FCU) treatment and weekly after FCU treatment. The samples were collected in a plain vials, allowed to stand and thereafter centrifuged at 2000 rpm for 10 minutes, serum was then separated and frozen at 20°C till analyzed.

Hormonal Assay

Serum testosterone was measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) microwell method described by Rajkowski et al., [15].

Biochemical Analysis

Total protein and albumin were determined according to Friedman and Young, [7]. Using Biuret reagent kit and Bromocresol green.

Globulin values were calculated by subtracting the values of albumin from the corresponding values of total protein [1].

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using computer software package statistics (Version 8). It was used to perform analysis of variance (ANOVA), Day and Quinn [6].

Results

The variation in the effect of female camel urine in the testosterone levels are illustrated in figure 1. Testosterone level was significantly increased ($P < 0.01$) in group three after seven days of female camel urine administration. The level of Testosterone was somewhat increase in group four, no changes were observed in groups one and two. At day 21 there was an increase in serum testosterone level in all groups treated with FCU compared to the previous weeks.

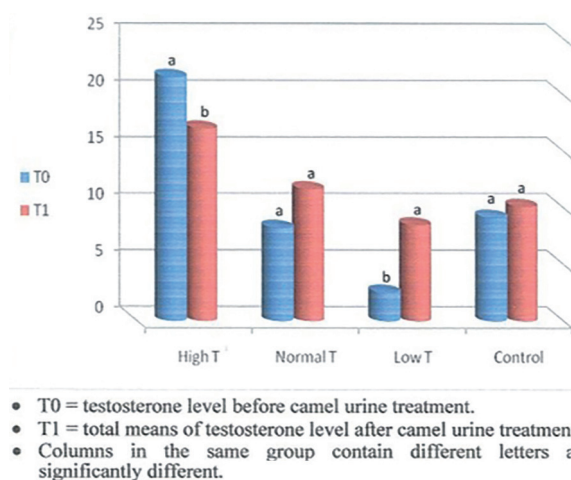


Figure 1. Effect of female camel urine on testosterone level(ng/ml)

The effect FCU on the total protein under different testosterone levels in the treated rats is shown in figure 2. At day zero high and low testosterone level groups were found to have significantly low ($P < 0.05$) serum total protein compared to the control group. In all groups after two weeks administration of female camel urine, total protein levels were significantly ($P < 0.01$) increased and became at the same level in the control group (Figure 2).

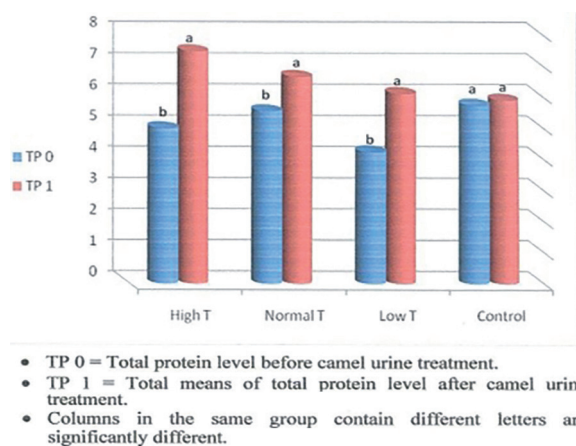


Figure 2. Effect of female camel urine on the rat serum total protein(g/dl)

Although, serum albumin significantly increased ($p < 0.05$) compared to the previous week in the normal testosterone group after seven days of female camel urine administration, no change was observed in all other treated groups (Figure 3)

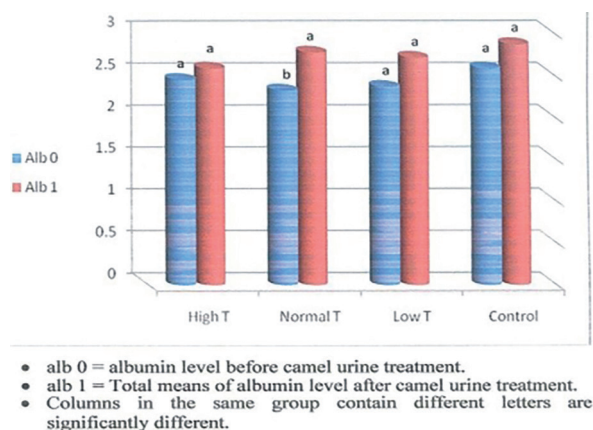


Figure 3. Effect of she-camel urine on the rat serum albumin level(g/dl.)

Figure (4) represents the influence of FCU on globulin level in all groups. Serum globulin was signifi-

cantly ($p < 0.01$) elevated after seven days of FCU treatment. There was significant ($p < 0.05$) increase in the normal testosterone group compared to the previous days. All groups showed an increase in globulin level at day 14 and 21, but high testosterone group was significantly ($p < 0.01$) higher than the control group during all weeks of treatment.

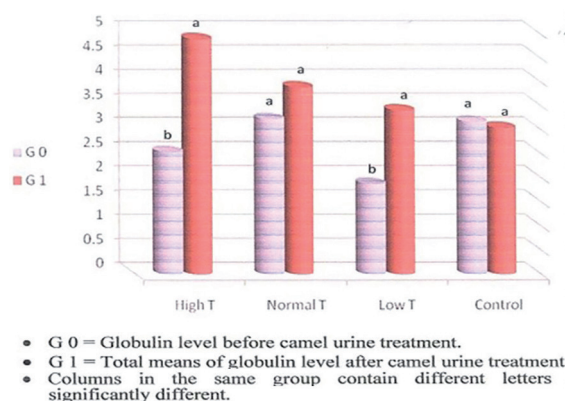


Figure 4. Effect of she-camel urine on the serum globulin level(g/dl)

Discussion and Conclusion

In the present study, high serum testosterone in male rats showed highly significant ($P < 0.01$) lower level after 7 days of FCU administration compared to day zero and remained stable for another week. On day 21 the hormonal level was raised to nearly the same level before FCU administration. This may be due to the presence of none sterified fatty acids which can inhibit testosterone synthesis by affecting cholesterol utilization or endogenous concentration [11]. This findings were similar to Wayne et al, [20], who found that Oleic acid treatment inhibited testosterone synthesis by inhibiting cholesterol esterase activity. Also Tehming and Shutsung, [18] reported that some unsaturated fatty acids (Linoleic, palmitleic, oleic and myristoleic) are potent inhibitors of 5- α reductase enzyme which convert testosterone into 5- α dihydrotestosterone. High testosterone reduce total protein in this study which in agreement with Mebh et al., [10] findings, also Baron, [3], documented that three factors may lead to a decrease in plasma total protein and albumin concentration, liver damage impaired intake of protein and toxic destruction of the protein. Albumin was slightly affected and this was in agreement with Sharaf et al., [16] and Zaki et al., [21] who studied lead toxicity

in bulls and marino sheep respectively and disagree with Voet and Voet, (19) who found a significant increase in serum albumin. However, FCU caused highly significant ($P < 0.01$) elevation on serum total protein and globulin level after 7, 14 and 21 days. The increment observed in total protein, globulin and normalization of elevated hormonal levels might be due to the nourishing compounds in camel urine [9].

Oral administration of female camel urine for three weeks resulted in transient lowering on the high testosterone level, gradual increase in the low testosterone level while the group of normal level was not affected by FCU administration. All groups treated by FCU showed significant increase in total protein, globulin and rats body weight. This study concluded that camel urine can rectify and regulate serum testosterone level, increase protein synthesis and support the body immunity.

References

- Abdel Fattah S A., El Sanhoury MH., El Medany NM., Abdel Azeem F., (2008). Thyroid activity, some blood constituents, Organs morphology and performance of broiler chicks supplemental Organic acids. *Int J Poultry Sci*, 7(3), 215-222.
- Arash KD., Fatemeh F., Mohammad N., Amir AK., Chelar CO., Marefat G., Mohammad H., (2009). The effects of ginger on spermatogenesis and sperm parameters of rat. *Iranian J Reproductive Med*, 7, 7-12 .
- Baron DN., (1973). Short textbook of chemical pathology (3rd edition) English Language and book society (ELBS) Hodder and Stoughton London. pp87.
- Biswas NM., Ghosh, P., (2004). Effect of Lead on male gonadal activity in Albino Rats, Kathmandu Uni. *Med J*, 2, 43-46 .
- Brunner M., Schraner EM., Wild P., (1992). Cellular Changes in rat parathyroid provoked by progesterone and testosterone. *Cell Tissue Res*. 268, 283-286.
- Day RW., Quinn GP., (1989). Comparison of treatments after analysis of variance in ecology. *Ecological Monographs* 59, 433-463.
- Friedman RB., Young DS., (1997). Effect of disease on clinical Laboratory tests. 3th edition, AACC press.
- Kabariti A., Mazuria S., Elgendi A., (1988). Camel urine a possible anti carcinogenic agent. *Arab Gulf J Sci Research Agric Biol Sci*, 6, 55-63.
- Khogali ME., (2005). PhD thesis .Hepatoprotective and Anti parasitic effect of Female Camel Urine in natural infected Calves.(Fashiolasis) University of Khartoum , Faculty of pharmacy, Khartoum, Sudan.
- Mebh U., Eyong U., Eyong G., Ifere O., Chukwuemeka N., (2005). Theobromine induced seminiferous tubular lesion with elevated serum testosterone levels in male wistar rats . *Biochemistry* 17 (2), 123-128.
- Meikle AW., Benson SJ., Lin XH., Boam WD., Stringham JD., (1989). Nonesterified fatty acids modulate steroidogenesis in mouse Leydig cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 237, 937-942 .
- Natalie B., (2002). Urine Therapy (drinking urine) J of Brekeley Medicine, www. Ocf.Berkeley.edu.
- Ohag HM., (1998). Clinical Trials for treatment of ascitis with camel urine. M.Sc. University of Gazera, Sudan.
- Peter YL., Nicholas A., (2008) Male pattern hair loses.
- Rajkowski, KM., Cittanova N., Desfosses B., Layle MF., (1977). The conjugation of Testosterone with horseradish peroxidase and a sensitive enzyme assay for the conjugate steroids.
- Sharaf NE., Zaki SZ., Hind R G., Nabila EB., Olfat MF., (2008). Some clinicopathological and microbiological studies on Lead toxicity in bull. *Amer Eurasian J Agric and Envirom, Sci*. 3 (2), 165 -168.
- Shweta P., Pharm M., Nagendra SC., Dixit VK., (2008). Effect of CuscutsreflexaRoxb on androgen induced alopecia. *J of Cosmetic Dermatology*, 7, 199- 204.
- Tehming L., Shutsung L., (1992). Inhibition of 5 α reductase by specific unsaturated fatty acids. *Biochem J*, 285 , 557 562 .
- Voet D., Voet JG., 1990. *Biochemistry* (1st ed.) New York Wiley sons, p. 1148
- Wayne M., Jose C, Jitka H, Darrell K (1996).Oliec acid inhibits cholesteryl estrase and testol utilization for testosterone synthesis in mouse leding cells.*J of Metabolism*, 45(3) 293-299
- Zaki MS., Suzan M, Awad I., (2010). Some studies on lead toxicity in marino sheep *Journal of American Science*, 6(4), 128-131.

Prevalence of *Hyalomma aegyptium* (Linnaeus, 1758) on Tortoises (*Testudo graeca*) in Izmir and Aydın Province, Turkey

Serkan Bakirci

Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology

Geliş Tarihi / Received: 03.09.2015, Kabul Tarihi / Accepted: 10.02.2016

Abstract: In this study, a total of 228 adult ticks were collected from twelve tortoises between 07.05.2007 and 08.07.2008 in Izmir and Aydın, Turkey. All ticks were identified as *Hyalomma aegyptium*. The proportion of adult ticks collected from Izmir and Aydın provinces were 60,08% (n=137) and 39,92% (n=91), respectively.

Key words: *Hyalomma aegyptium*, ticks, tortoise, Turkey

İzmir ve Aydın İlindeki Kaplumbağalarda *Hyalomma aegyptium* (Linnaeus, 1758)'un Yaygınlığı

Özet: Bu çalışmada, 07.05.2007 ve 08.07.2008 tarihleri arasında İzmir ve Aydın illerinde yakalanan 12 kaplumbağadan toplam 228 adet erişkin kene toplanmıştır. Toplanan tüm keneler *Hyalomma aegyptium* olarak tanımlanmıştır. İzmir ve Aydın illerinden toplanan kenelerin oranı sırasıyla %60,08 (n=137) ve %39,92 (n=91) olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Hyalomma aegyptium*, kaplumbağa, kene, Türkiye

Introduction

Ticks are the most prominent vectors within pests after mosquitoes. The genus *Hyalomma* Koch, 1844, like all other tick species, are ectoparasites that feed on animals and humans and transmit a great variety of parasitic, rickettsial, bacterial and viral agents to both humans and animals including; Lyme disease, babesiosis, ehrlichiosis, tularemia, Crimean-Congo hemorrhagic fever [7,16]. There are 30 *Hyalomma* species known to exist throughout the world. The genus *Hyalomma* distributed in Asia, southern Europe and Africa [8,14]. Among these, nine spp. have been identified in Turkey: *H. aegyptium*, *H. anatolicum*, *H. dromedarii*, *H. excavatum*, *H. impeltatum*, *H. marginatum*, *H. rufipes*, *H. scupense* (syn *H. detritum*), *H. turanicum* [3,6,10].

Tortoises are known as the common hosts for adult *H.aegyptium* in the Mediterranean region, Balkan countries, Middle East, Central Asia, Northern Africa, Afghanistan and Pakistan [1,17,18]. The species *Testudo graeca* Linnaeus, 1758, is a tortoise

inhabiting in Northern Africa, Middle East and Europe [16]. *H.aegyptium* is known as a three-host life cycle tick and infests tortoises, lizards, hedgehogs, birds, small mammals and even human. However, tortoises of the genus *Testudo* are the main hosts of adult *H.aegyptium* [1,6,18-20]. In this study, the ticks on *T.graeca* living in natural areas in Aydın and Izmir province were determined.

Material and Methods

This study was carried out between 07.05.2007 and 08.07.2008 on a total twelve tortoises found in Izmir and Aydın, Turkey (Figure 1). Tortoises were captured in forested areas, roadsides, vegetable gardens and all were inspected for the presence of ticks. Ticks were collected manually from alive tortoises and preserved in 70% ethanol for identification. All collected ticks were identified based on morphological differences of each species using the methods described by Hoogstraal [14] and Apanaskevich [1].

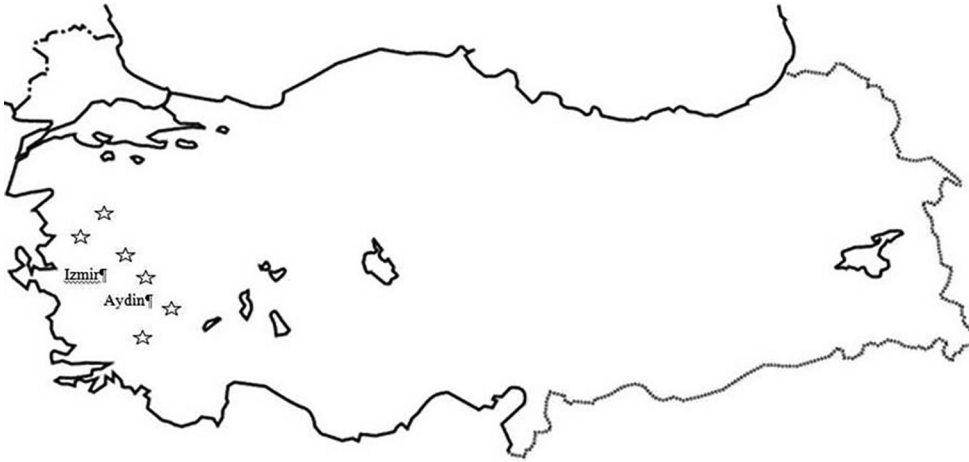


Figure 1. Turkey, and locations of sampling areas (small stars) within Izmir and Aydın province.

Results

During the study a total of 228 adult ticks were collected from tortoises. Attached ticks were found on the skin parts of hind legs and neck of tortoises. All collected ticks were identified as *H.aegyptium* (Figure 2). It was found that 147 (64,47%) out of 228 identified ticks were male and 81 (35,53%)

out of 228 were found to be female (Table 1). The proportion of adult ticks collected from Izmir and Aydın provinces were 60,08% (n=137) and 39,92% (n=91), respectively (Table 1). Evaluation of the distribution of ticks attached on a monthly base indicated that infestation by *H.aegyptium* increased May - July with the highest numbers of attached occurring during the summer season.



Figure 2. *Hyalomma aegyptium* male (A), *Hyalomma aegyptium* female (B)

Table 1. Distribution of *Hyalomma aegyptium* according to study area

	İzmir		Aydın		Prevalence %
	♂	♀	♂	♀	
March	-	-	11	-	4,8
May	41	40	7	3	39,91
June	32	9	28	12	35,53
July	14	1	14	16	19,74
Total	87	50	60	31	100

Discussion

Hyalomma aegyptium is known as dominant species among ticks parasitizing tortoises in Mediterranean region, Northern Africa, Balkan countries, Pakistan, Russia, India, Middle East [1,12,17,19], having a typical three-host life cycle. In Balkan countries and southern Europe the hosts of *H.aegyptium* are primarily tortoises but also lizards, dog, horse, hedgehog, cattle [12,14,17]. On the other hand the adult form *H.aegyptium* were reported from cattle and

buffaloes from Balkan countries, Pakistan, Turkey, India [2,5,12,19]. While larvae and nymph forms of *H.aegyptium* mostly attack on partridges, lizards and a wide variety of rodents, the adults parasitize mainly on turtles [1,6,17]. The adult forms of *H.aegyptium* are also demonstrated to parasitize on humans [6,11,15,20]. In feeding, hosts of ticks and predilection sites on host body vary depending on tick species and instars [6,15]. In the present study, the predilection sites of *H.aegyptium* were mainly observed on hind limbs of tortoises and some were found on the neck.

Increasing number of human tick infestation rates raise the question about the importance of *H.aegyptium* as a vector of pathogens [6,15,20]. *H.aegyptium* threatens human health and animal production as they are shown to transmit pathogens like *Borrelia burgdorferi*, *Theileria annulata*, *Pasteurella tularensis*, *Rickettsia aeschlimannii* [9,16,19]. A spirochete, *Borrelia turcica* was also isolated from *H.aegyptium* collected from tortoises in Turkey [13].

In previous studies, *H.aegyptium* adults were reported from tortoises, lizards, hedgehog, cattle and human in Turkey [2,4,6,12,16]. Results obtained in this study, showed that *H.aegyptium* was the only tick species on tortoises in our study area. In previous studies, *H.aegyptium*, *Haemaphysalis sulcata*, *H.inermis* and *Rhipicephalus sanguineus* were reported from tortoises in Balkan countries [19]. Existence of eight different tick species belonging to three different genus on cattle has been demonstrated in Aydın province, in which *H.aegyptium* species could not be determined on cattle in Aydın province [7].

In conclusion, this study demonstrated the existence of *H.aegyptium* on tortoises in Aydın and Izmir provinces. However, in terms of determining the true prevalence of this tick on both tortoises and other animals and its potential role on transmitting diseases more studies need to be performed.

References

- Apanaskevich DA, (2003) To diagnostics of *Hyalomma aegyptium* (Acari: Ixodidae). Parazitologiya. 37, 47-59.
- Aydın L, (2000) Güney Marmara Bölgesi ruminantlarında görülen kene türleri ve yayılışları. Türkiye Parazit Derg. 24, 194-200 (article in Turkish with an English abstract).
- Aydın L, Bakırcı S, (2007) Geographical distribution of ticks in Turkey. Parasitol Res. 101, 163 - 166.
- Aydın L, Yıldırımhan HS, Uğurtaş İH, (2002) Marmara Bölgesi'ndeki bazı kertenkele ve kaplumbağa türlerinde kenelerin (Ixodidae) yaygınlığı. Türkiye Parazit Derg. 26, 84-86 (article in Turkish with an English abstract).
- Aysul N, Kar S, Yılmaz N, Alp HG, Gargılı A, (2010) Trakya yöresi'ndeki Kaplumbağalarda (*Testudo graeca*) *Hyalomma aegyptium* (Lineaus, 1758)'un yaygınlığı. Pendik Vet Mikrobiyol Derg. 37(1), 53-56 (article in Turkish with an English abstract).
- Bakırcı S, Aysul N, Eren H, Ünlü AH, Karagöç T, (2014) Diversity of ticks biting humans in Aydın Province of Turkey. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 61, 93-98.
- Bakırcı S, Saralı H, Aydın L, Eren H, Karagöç T, (2012) Distribution and seasonal activity of tick species on cattle in the West Aegean region of Turkey. Exp Appl Acarol. 56, 165-178.
- Bakırcı S, Saralı H, Aydın L, Latif A, Eren H, Karagöç T, (2011) *Hyalomma rufipes* (Koch, 1844) infesting cattle in the West Aegean region of Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 35, 359-363.
- Bitam I, Kernif T, Harrat Z, Parola P, Raoult D, (2009) First detection of *Rickettsia aeschlimannii* in *Hyalomma aegyptium* from Algeria. Clin Microbiol Infect. 15, 253-254.
- Bursalı A, Keskin A, Tekin S, (2012) A review of the ticks (Acari: Ixodidae) of Turkey: species diversity, hosts and geographical distribution. Exp Appl Acarol. 57, 91-104.
- Gargılı A, Kar S, Yılmaz N, Cerit Ç, Sönmez G, Şahin F, Alp HG, Vatanserver Z, (2010) Evolution of ticks biting humans in Thrace province, Turkey. Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 16, 141-146.
- Gazyağcı S, Aşan N, Demirbaş Y, (2010) A common tortoise tick, *Hyalomma aegyptium* Linne 1758 (Acari: Ixodidae), identified on eastern hedgehog (*Erinaceus concolor* Martin 1838) in Central Anatolia. Turk J Vet Anim Sci. 34, 211-213.
- Guner ES, Hashimoto N, Kadosaka T, Imai Y, Masuzawa T, (2003) A novel, fast-growing *Borrelia* sp. isolated from the hard tick *Hyalomma aegyptium* in Turkey. Microbiology. 149, 2539-2544.
- Hoogstral H, (1956) African Ixodoidea. I. Ticks of the Sudan. U.S. Naval Medical Research Unit Cairo, Egypt, No: 3, p: 513-516.
- Kar S, Dervis E, Akın A, Ergonul O, Gargılı A, (2013) Preferences of different tick species for human hosts in Turkey. Exp Appl Acarol. 61, 349-355.
- Kireççi E, Özer A, Balkaya İ, Tanış H, Deveci S, (2013) Identification of ticks on tortoises (*Tetudo graeca*) and investigation of some pathogens in these ticks in Kahramanmaraş, Turkey. KSÜ Doğa Bil Derg. 16, 42-46.
- Široký P, Erhart J, Petrzelková KJ, Kamler M, (2011) Life cycle of tortoise tick *Hyalomma aegyptium* under laboratory conditions. Exp Appl Acarol. 54, 277-284.
- Široký P, Kubelová M, Modrý D, Erhart J, Literák I, Špitalská E, Kocianova E, (2010) Tortoise tick *Hyalomma aegyptium* as long term carrier of Q fever agent *Coxiella burnetii*-evidence from experimental infection. Parasitol Res. 107, 1515-1520
- Široký P, Petrzelková KJ, Kamler M, Mihalca AD, Modrý D, (2006) *Hyalomma aegyptium* as dominant tick in tortoises of the genus *Testudo* in Balkan countries, with notes on its host preferences. Exp Appl Acarol. 40, 279-290.
- Vatanserver Z, Gargılı A, Aysul NS, Sengoz G, Estrada-Penã A, (2008) Ticks biting humans in the urban area of Istanbul. Parasitol Res. 102,551-553.

Contagious Ecthyma Virus (ORF) İzolasyonunda FLK-BLV-044 Hücre Kültürünün Kullanılması

Veli Gülyaz¹, Fahriye Saraç¹, Mustafa Hasöksüz², Hüseyin Çakıroğlu¹, Zeynel Arslan¹

¹Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü 34890, İstanbul

²İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji ABD, Avcılar, İstanbul

Geliş Tarihi / Received: 19.02.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 29.05.2016

Özet: Bu çalışma, FLK-BLV-044 hücre kültürünün Contagious Ecthyma (CE) enfeksiyonuna yakalanmış kuzu ve oğlaklardan orf virusunun izolasyonunda ilk kez kullanılması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Klinik olarak CE lezyonlarına sahip 4 oğlak ve 2 kuzuya ait dudak dokusundan hazırlanan inokulumlar PCR testi ile orf virusuna ait nükleik asitlerin varlığı yönünden test edildi. Örneklerden monolayer FLK-BLV-044 hücre kültürlerine ekimler gerçekleştirildi. Yapılan hücre kültürü ekimlerinin 2. pasajında hücre yuvarlaklaşması ile karakterize sitopatik efekt (CPE) odaklarının oluştuğu saptandı. PCR testi ile izole edilen virusların orf virusu olduğu, üreyen virusların titrelerinin 3 oğlak ve 1 kuzu izolatında DKID₅₀ 10^{5.5} ve 1 kuzu ve 1 oğlak izolatında 10^{5.0}/ml olduğu, yapılan histopatolojik boyamalarda üreyen virusların intrasitoplazmik inklüzyon cisimleri oluşturduğu saptandı. Sonuç olarak, sürekli üretilebilir karakterde olan FLK-BLV-044 hücre kültürünün CE enfeksiyonuna yakalanmış hayvanlardan orf virusunun izolasyonunda kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: Contagious ecthyma, hücre kültürü, izolasyon, orf virus

The Use of FLK-BLV-044 Cell Culture for Isolation of Contagious Ecthyma Virus (Orf)

Abstract: The aim of this study was to use of FLK-BLV-044 cell culture for isolation of orf viruses from lambs and kids infected with contagious ecthyma virus. For this purpose, the existence of nucleic acid of orf virus was analyzed by PCR test from inoculum prepared from lips clinically infected 4 kids and 2 lambs. Each of the samples were inoculated into FLK-BLV-044 monolayer cell cultures. Cytopathogenic effect (CPE) characterized by rounding of the cells were seen in the second passage of the cell cultures. Isolated viruses were identified as orf virus by PCR test. The titer of viruses were found as 10^{5.5}/ml TCID₅₀ for 3 kids and 1 lamb strains, 10^{5.0}/ml for 1 goat and 1 lamb strains. Intracytoplasmic inclusion bodies were detected in infected cells with H&E staining. In conclusion, it was represented that the FLK-BLV-044 cell cultures, propagated permanently, can be used for isolation of orf virus from infected materials obtained from kids and lambs.

Key words: Cell culture, Contagious Ecthyma, isolation, orf virus

Giriş

Contagious ecthyma (CE) veya contagious pustular dermatitis olarak bilinen orf hastalığı koyun ve keçilerde özellikle kuzu ve oğlaklarda dudak, burun çevresi, ağız mukozası, meme ve meme uçlarında yaygın olarak görülen nonsistemik eruptif deri hastalığıdır [10,14]. Hastalık etkeni Poxviridae familyasının Parapoxvirus genusunda yer alan orf virusudur [14]. CE enfeksiyonunun teşhisinde Elektron mikroskopi, virus izolasyonu, Serum Nötralizasyon Testi, Komplemet Fiksasyon Testi, Agar Jel Immüno Diffüzyon, İmmünperoksidaz, Floresan Antikor

Tekniği, ELISA ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Testleri kullanılmaktadır [5,11,15,18]. Orf virusunun izolasyonu amacıyla primer kuzu ve oğlak hücre kültürleri ile birlikte vero, fetal lamb lung (CSL-503), BHK, MDBK, MDCK gibi devamlı üretilebilen hücre kültürleri kullanılmaktadır [1,4,8,16,17].

Bu çalışma, CE enfeksiyonuna yakalanmış kuzu ve oğlaklardan orf virusunun izolasyonunda sürekli pasajlanabilir cell line FLK-BLV-044 hücre kültürünün kullanılması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Materyal ve Metot

Enfekte doku örnekleri

Çalışmada kullanılan enfekte dudak derisi örnekleri klinik olarak CE lezyonlarına sahip 1-3 aylık 4 oğlak ve 2 kuzudan elde edildi.

Hücre kültürü

CE şüpheli doku örneklerinden orf virusu izolasyonu amacıyla kullanılan FLK-BLV-044 (ovine embryonal kidney cells) (DSMZ No: ACC 153) Almanya DSMZ hücre kültürü koleksiyonundan temin edildi.

İnokulum hazırlanması

Kuzu ve oğlaklardan elde edilen lezyonlu dudak deri örnekleri havan içinde ezilerek virus üretme vasatı içinde homojenatlar hazırlandı. Örnekler 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi ve 0,45 µm filtrelerden geçirildi [9].

Doku örneklerinde orf virusunun tespiti

Doku homojenatlarından DNA ekstraksiyonu amacıyla ticari genomik DNA purifikasyon kiti (Promega) kullanıldı. DNA peletleri 50 ml distile su içinde toplandı ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı. Orf virusunun identifikasyonu amacıyla Inoshima ve ark. (2000) tarafından bildirilen semi-nested PCR metodu kullanıldı.[13]

Virus izolasyonu

Flasklarda %10 FCS içeren Dulbecco's MEM/Ham's F-12 (Biochrom) vasatı ile monolayer hücre kültürü hazırlandı (Şekil 2). Hazırlanan örnekler FLK-BLV-044 hücre kültürüne inokule edildi. Hücre kültürleri 37°C'de, %5 CO₂'li etüvde inkubasyona bırakıldı. Her gün inverted mikroskopta sitopatik efekt (CPE) oluşumu yönünden kontrolleri gerçekleştirildi. Hücre kültürlerinde CPE oluşumları gözlenene kadar 5 günde bir kör pasajlar yapıldı ve %75 CPE görülen hücre kültürleri 3 kez dondurulup çözdürüldü. Santrifüj ile temizlenen süpernatantlar kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edildi [8, 9].

Virus titrasyonu

Hücre kültüründe CPE oluşturarak üreyen orf viruslarının titrasyonu FLK-BLV-044 hücre kültüründe

Buddle ve ark. [2,3] tarafından bildirilen metotla gerçekleştirildi. Santrifüj işlemi 3000 rpm'de 20 dakika yapılarak hücre kalıntılarında temizlenen virus süspansiyonunun DMEM/Ham's-F12 vasatı içinde 10 katlı dilüsyonu yapıldı. Her dilüsyondan 96 gözlü pleytlerin 4 gözüne 100'er µl kondu ve üzerine 1x10⁴/ml hücre süspansiyonundan 100'er µl eklendi. Pleytler 37°C'de, %5 CO₂'li etüvde inkubasyona bırakıldı ve pleytler CPE oluşumları yönünden 5-7 gün süreyle gözlemlendi. TCID₅₀ değerleri Karber Metodu ile saptandı.

Hücre kültürlerinde virus üremesinin tespiti

Hücre kültürlerinin histolojik muayenesi

İzole edilen orf viruslarının hücre kültüründe üremesi esnasında oluşturduğu inklüzyon cisimciğinin saptanması amacıyla orf virusu inokulasyonu yapılan FLK-BLV-044 lamel hücre kültüründe Hematoksilen-Eozin (H&E) boyama gerçekleştirildi [7].

Orf virusu varlığının saptanması

Toplanan klinik örnekler ve pozitif kontrolden, viral DNA'nın ekstraksiyonu için, DNAeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN) üretici talimatlarına göre kullanıldı.

PCR reaksiyonu

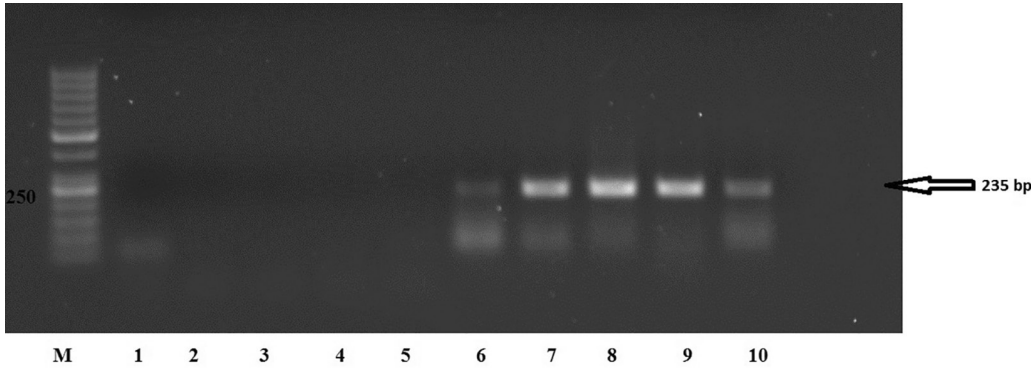
PCR reaksiyonu için Inoshima ve ark. (2000) tarafından bildirilen yöntem uygulandı. PCR ürününün çoğaltılmasında, elde edilen viral DNA'dan 1 mikrogram, toplam 50 µl reaksiyon miktarı için, 0,2 mM her bir primerden (PPP-1 ve PPP-4), 200 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ ve 1U Taq DNA polimeraz (Fermentas) kullanıldı.

PCR reaksiyonu için ısı döngü cihazı (Techne TC-412 Thermal Cycler), 95°C'de 9 dk'yı takiben, 94°C'de 1 dk, 55°C'de 1 dk ve 72°C'de 1 dk olacak şekilde 30 siklus şeklinde ayarlandı. Semi nested PCR, ilk reaksiyon sonucu elde edilen 5 µl PCR ürünü ile aynı reaksiyon şartlarında PPP-3 ve PPP-4 primerleri kullanılarak tekrarlandı [13]. PCR ürünlerinin görüntülenmesi, 0,5 µg/ml etidyum bromid içeren %1'lik agaroz jelin elektroforezi ile gerçekleştirildi.

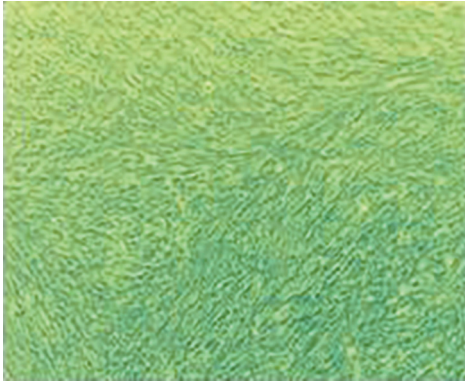
Bulgular

Klinik olarak CE enfeksiyonu belirtileri gösteren 4 oğlak ve 2 kuzu numunesinden hazırlanan homojenatların semi-nested PCR testi ile 235 bp büyüklüğünde ampliconlar elde edildi (Şekil 1). Virus izolasyonu amacıyla hücre kültürüne yapılan inokulasyonlar sonucu hücre kültürlerinin 2. pasajlarında virus üremesine bağlı CPE odaklarının, inkubasyonun 3. gününden itibaren ortaya çıktığı ve 5. günde

%90'a ulaştığı gözlemlendi (Şekil 3). Üreyen virusların titreleri 3 oğlak ve 1 kuzu izolatında $DKID_{50} 10^{5.5}/ml$ ve 1 kuzu ve 1 oğlak izolatında $10^{5.0}/ml$ olarak belirlendi. FLK-BLV-044 hücre kültürlerinde izole edilen 6 izolatın yapılan semi-nested PCR ile orf virusu olduğu (Şekil 3), lamel hücre kültürlerinin histopatolojik boyamalarında üreyen virusların intrasitoplazmik inklüzyon cisimcikleri oluşturduğu tespit edildi (Şekil 4).



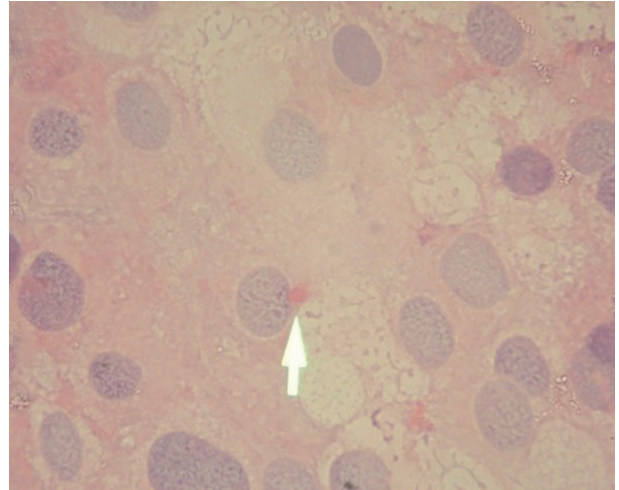
Şekil 1. M: Marker (50 bp), 1-5: 1. PCR (PPP1-PPP4), 6-10: Semi-nested PCR (PPP3-PPP4)



Şekil 2. FLK-BLV-044 hücre kültürü



Şekil 3. Orf virusunun CPE oluşumları



Şekil 4. FLK-BLV-044 hücre kültüründe orf virusuna ait intrasitoplazmik inklüzyon cisimciği

Tartışma

Koyun ve keçilerde CE enfeksiyonunun teşhisi amacıyla son yıllarda PCR kullanılırken, virus izolasyonu metodunun zaman alması ve zahmetli olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmamaktadır. Ancak, orf virusunun gerek moleküler gerekse aşı-patojenite çalışmaları amacıyla izolasyon ça-

lışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Koyun ve keçilerde orf virusunun izolasyonu amacıyla primer ve sürekli hücre kültürleri yaygın olarak kullanılmaktadır [2,3,6,8,12]. Primer hücre kültürleri virus izolasyonları için her ne kadar uygun ise de birçok dezavantaja sahiptirler. Primer hücre kültürlerinin düzenli aralıklarla hayvan dokularından hazırlanması, karakterize edilmesi ve viral kontaminantlar yönünden test edilmeleri de gerekmektedir. Sürekli üretilen hücreler bu dezavantajlara sahip oldukları gibi likit nitrojende kullanılıncaya kadar yıllarca saklanabilirler [16].

Orf virusunun izolasyonu amacıyla yapılan diğer çalışmalarda primer ve sürekli hücre kültürlerinde elde edilen virus titreleri $DKID_{50} 10^{4.5}-10^{7.5}/ml$ olduğu ve virusun 2-3 kör pasajı takiben hücre kültürlerinde yuvarlaklaşma ile karakterize CPE oluşturduğu bildirilmiştir [3,6,8,12] Bu çalışmada, orf virusunun FLK-BLV-044 hücre kültüründe 2. kör pasajda $DKID_{50} 10^{5.5}-10^{5.0}/ml$ titrelerde hücre yuvarlaklaşması ile karakterize üremesinin diğer çalışmalarda elde edilen sonuçlarla benzer olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, bu çalışma ile devamlı üretilen (permanent cell line) hücre hattı olan FLK-BLV-044 hücre kültürünün orf virusu izolasyonu amacıyla kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

Kaynaklar

1. Abu Elzein EME, Housavi FMT, (2009). Drastic cutaneous multi-focal orf infection in goats, causing severe dysfunctioning. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 28(3),1025-1029.
2. Buddle BM, Dellers RW, Schuring GG, (1984 a). Heterogeneity of contagious ecthyma virus isolates. *Am J Vet Res*, 45(1), 75-79.
3. Buddle BM, Dellers RW, Schuring G. G, (1984 b). Contagious ecthyma virus-vaccination failures. *Am. J. Vet. Res*, 45(2), 263-266.
4. Coates JW, Haff S, (1990). Contagious ecthyma: An unusual distribution of lesions in goats. *Can Vet J*, 31, 209-210.
5. Çabalar M, Voyvada H, Sekin S, (1996). Van yöresinde bir sürüde ecthyma contagious (Orf) olgusu. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 43,45-51.
6. De la Concha-Bermejillo A, Guo J, Zhang Z, Waldron D, (2003). Severe persistent orf in young goats. *J Vet Diagn Invest*, 15, 423-431.
7. Ekicioğlu G, Özkan N, Şalvaazar E, (2005). Hematoksilen-Eozin (hematoxylin-eosin) (H&E). *Aegean Pathology Journal*, 2, 58-61.
8. Ergin H, Köklü A, (1974). Ektima virusunun doku kültürlerinde pasajı ve antijenik özelliklerinin incelenmesi. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg*, 6(2),12-20.
9. Guo J, Rasmussen J, Wünschmann A, De la Concha-Bermejillo A, (2004). Genetic characterization of orf viruses isolated from various ruminant species of a zoo. *Vet Microbiol*, 99, 81-92.
10. Hawkins CD, Ellis TM, Davis MK, Peet RL, Parkinson J, (1991). An unusual outbreak of contagious ovine ecthyma. *Aust Vet J*, 68, 210-211.
11. Hooser SB, Scherbo G, Morin DE, Whiteley HE, (1989). A typical contagious ecthyma in a sheep after extensive cutaneous thermal injury. *Jaoumo*, 195(9), 1255-1256.
12. Housawi FMT, Abu Elzein EME, Amin MM, Al Afaleg AI, (1991). Contagious pustular dermatitis (orf) infection in sheep and goats in Saudi Arabia. *Vet Rec*, 128, 550-551.
13. Inoshima Y, Morooka A, Sentsui H, (2000). Detection and diagnosis of parapoxvirus by polimerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 84, 201-208.
14. Mondal B, Bera AK, Hosamani M, Tembhurne PA, Bandyopadhyay SK, (2006). Detection of virus from an outbreak in goats and its genetic relation with other Parapoxviruses. *Vet Res Commun*, 30, 531-539.
15. Nettleton PF, Gilray JA, Yirrell DL, Scott GR, Reid HW, (1996). Natural transmission of orf virus from clinically normal ewes to orf-naive sheep. *Vet Record*, 139, 364-366.
16. Pye D, (1989). Cell lines for growth of sheep viruses. *Aust Vet J*, 66(7), 231-232.
17. Sanchez RL, Hebert A, Lucia H, Swedo J, (1985). A case report with histologic, electron microscopic and immunoperoxidase studies. *Arch Pathol La Med*, 109, 166-170.
18. Zhang K, Lu Z, Shang Y, Zhergld, Jin Y, He J, Liu , (2010). Diagnosis and phylogenetic analysis of orf virus from goats in China. *Virology Journal*,7, 78.

Contagious Ecthyma (ORF) enfeksiyonu görülen koyun ve kuzularda pestivirus varlığının araştırılması

Veli Gülyaz, Aysel Baca, Fahriye Saraç, Ahmet Sait

Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü 34890, İstanbul

Geliş Tarihi / Received: 09.02.2016, **Kabul Tarihi / Accepted:** 30.05.2016

Özet: Contagious ecthyma (CE), özellikle kuzu ve oğlaklarda yaygın şekilde görülen ve Orf virusu tarafından oluşturulan viral bir enfeksiyondur. Bu çalışma, Sakarya’da bir koyun işletmesinde CE enfeksiyonuna yakalanan koyun ve kuzularda şiddetli dudak ve diş eti lezyonlarının oluşmasında immunosuppressive etki yapan persiste pestivirus varlığının araştırılması amacıyla gerçekleştirildi. Bu amaçla, CE enfeksiyonuna özgü semptomlar gösteren sakız ırkı 18 koyun ve 26 kuzudan kan ve dudak lezyonlarından doku örnekleri alındı. Alınan doku örneklerinde orf virusu ve kanlardan elde edilen lökosit örneklerinde polymerase chain reaction (PCR) ile pestivirus antijen varlığı araştırıldı. Doku numuneleri yapılan semi-nested PCR testi ile orf virusu yönünden pozitif bulunurken aynı hayvanlara ait lökosit örneklerinin nested RT-PCR metodu ile pestivirus nükleik asit varlığı yönünden negatif olduğu saptandı. Sonuç olarak, bu vakada kuzular ve koyunlarda görülen şiddetli CE enfeksiyonunun temelinde pestivirusların etkisinin olmadığı, dudaklarda yoğun olarak görülen lezyonların izole edilen virusların patojenitesinden ve koyunların ırkından kaynaklanabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Contagious ecthyma, koyun, kuzu, orf, pestivirus,

The Determination of Presence of Pestivirus in Sheep and Lambs Infected with Contagious Ecthyma (Orf)

Abstract: Contagious ecthyma (CE), caused by Orf virus is widespread viral infection in young sheep and goats especially in newborn lambs and kids. In a sheep flock, severe lesions of the lips and gums caused by CE virus were detected at 18 of 115 sheep between the 2 and 4 ages and at 26 of 72 lambs during the clinical examination of animals in Sakarya. The aim of this study was to determine the presence of persistent pestiviruses that causes immunosuppressive effect on formation of severe CE lesions in the sheep and lambs. For this purpose, the blood and lip samples were taken from 18 sheep and 26 lambs showing the CE-specific symptoms. For the identification of orf virus, tissue samples leukocyte samples obtained from bloods were tested by PCR to determinate the presence of orf and pestivirus antigens. Orf viruses were determined from all tissue samples obtained lip samples with semi-nested PCR and leukocyte samples were found as negative for the presence of pestivirus nucleic acid by nested RT-PCR test. As a result, in this case, the existence of pestivirus was not found on severe CE infection in lambs and sheep. It was concluded that intensive lesions seen on lips can be connected to pathogenicity of the isolated viruses and caused by the race of sheep.

Key words: Contagious ecthyma, lamb, orf virus, pestivirus, sheep,

Giriş

Contagious ecthyma (CE), Parapoxvirus generi içinde yer alan orf virusu tarafından oluşturulan viral bir enfeksiyondur. CE, özellikle yeni doğan kuzu ve oğlaklar ile genç koyun ve keçilerde yaygın şekilde görülür. CE’ya bağlı lezyonlar özellikle genç kuzu ve oğlaklarda ağız çevresi, dudak, diş etlerinde görülürken, tipik lezyonlar doğum yapmış koyun ve keçilerin memelerinde ve nadiren dudak-diş etlerinde ortaya çıkmaktadır [6].

Koyunlarda pestivirus enfeksiyonları, bovine viral diarrhoea (BVDV) ve border disease virusu

(BDV) tarafından oluşturulan, koyunlarda immunosupresyon gebelik dönemine bağlı olarak yavru atma ve yeni doğan kuzularda; merkezi sinir sistemi bozuklukları, tüylerde dikleşme, normalin altında doğum ağırlığı ve kafatasında değişikliklerle karakterize bulaşıcı viral bir hastalıktır [11,20]

Bu çalışmanın amacı, CE enfeksiyonuna yakalanan koyun ve kuzularda şiddetli dudak ve diş eti lezyonlarının oluşmasında, immunosupresif etkisi yapan persiste pestivirus varlığının araştırılmasıdır.

Materyal ve Metot

Materyal

Çalışmada, orf ve pestivirus tespiti amacıyla, doku ve kan örnekleri Sakarya'da CE enfeksiyonuna yakalanan 2-4 yaş arası sakız ırkı 18 koyun ve 1-2 aylık 26 kuzudan sağlandı.

Metot

İnokulum hazırlanması: Kuzu ve oğlaklardan elde edilen lezyonlu dudak deri örnekleri havan içinde ezilerek virus üretme vasatı içinde homojenatlar hazırlandı. Örnekler 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi ve 0,45 µM filtrelerden geçirildi [10].

Doku örneklerinde Orf virusunun tespiti: Toplanan klinik örnekler ve pozitif kontrolden viral DNA'nın ekstraksiyonu için, DNAeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN) üretici talimatlarına göre kullanıldı. DNA pelletleri 50 µl distile su içinde toplandı ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı. Orf virusunun identifikasyonu amacıyla Inoshima ve ark. (2000) tarafından bildirilen semi-nested PCR metodu kullanıldı. [15]

PCR reaksiyonu: PCR reaksiyonu için Inoshima ve ark. (2000) tarafından bildirilen yöntem uygulandı. PCR ürününün çoğaltılmasında, elde edilen viral DNA'dan 1 mikrogram olacak şekilde, toplam 50 µl reaksiyon miktarı için, 0,2 mM her bir primerden (PPP-1 ve PPP-4), 200 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ ve 1U Taq DNA polimeraz (Fermentas) kullanıldı.

PCR reaksiyonu için ısı döngü cihazı (Techne TC-412 Thermal Cycler), 95°C'de 9 dk'yı takiben, 94°C'de 1 dk 55°C'de 1 dak ve 72°C'de 1 dk olacak şekilde 30 siklus şeklinde ayarlandı. Semi nested PCR, ilk reaksiyon sonucu elde edilen 5 µl PCR ürünü ile aynı reaksiyon şartlarında PPP-3 ve PPP-4 primerleri kullanılarak tekrarlandı [15]. PCR ürünlerinin görüntülenmesi, 0,5 µgr/ml etidyum bromid içeren %1'lik agaroz jelin elektroforezi ile gerçekleştirildi. [15]

Lökosit örneklerinde pestivirus varlığının saptanması: Lökosit örneklerinden viral RNA'nın ekstraksiyonu için High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche) kullanıldı. Örneklerle birlikte RNA ekstraksiyonu yapılmış pozitif ve negatif örnekler kullanıldı. Bunun için, RNA ekstraksiyon kontrolü

olarak, BVDV pozitif bir RNA ve su RT-PCR kontrolü olarak kullanıldı.

PCR'da; V324 (5'-ATG CCC WTA GTA GGA CTA GCA - 3') ve V326 (5'-TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC -3') dış primerler, A11 (5'-AGT ACA GGG TAG TCG TCA GTG GTT CG- 3') ve A14 (5'-CAA CTC CAT GTG CCA TGT ACA GCA -3') primerleri iç primerler olarak kullanıldı. Bu primerler, yaklaşık 300 bp ve 200 bp büyüklüğünde fragmentler amplifiye etmektedir.

PCR ürünlerinin elde edilmesi için, McGoldrick ve ark. (1999) tarafından belirtilen yöntemle göre reaksiyon, RT ve PCR basamaklarının tek tüpte birleştirilmesi ve takiben nPCR'ın ayrı bir tüpte yapılması olarak iki basamakta gerçekleştirildi [16]

Birinci basamakta, viral RNA'dan cDNA sentezi ve PCR için Qiagen One step RT-PCR kiti kullanıldı ve RT-PCR reaksiyonu 20 µl olarak hazırlandı. Reaksiyon karışımı, 6 µl RNase free su, 4 µl 5x RT-PCR buffer, 0,8 µl dNTP's, 4 µl Q solution, 1'er µl V324 (20pmoles/ul) ve V326 (20pmoles/ µl) primerleri, 0,8 µl enzim mix olacak şekilde hazırlandı ve bu karışıma 2,4 µl daha önce ekstrakte edilmiş RNA eklendi.

Thermalcycler, cDNA sentezi için; 50°C'de 30 dk 1 siklus, PCR aktivasyonu için; 95°C'de 15 dk 1 siklus ve amplifikasyon için; 35 siklus olacak şekilde, 95°C'de 1'dk, 56°C'de 1 dk 72°C'de 1 dk ve son olarak 72°C'de 10 dk 1 siklus şeklinde programlandı.

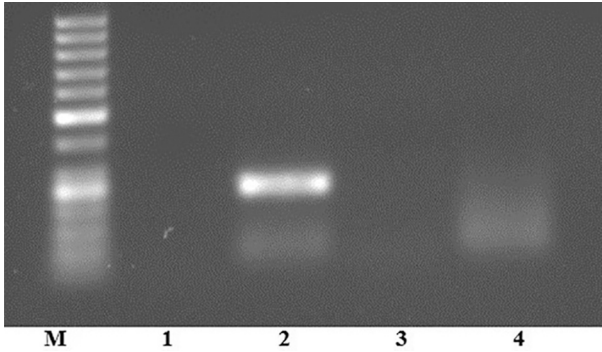
Nested PCR için, PCR Master Mix (2X) kiti (Fermentas) kullanıldı ve reaksiyon karışımı 10 µl 2xMaster Mix, 2'er µl A11(20 Pmoles/ul) ve A14 primerleri, 6 µl RNase free su şeklinde hazırlandı. Bu karışıma 1/10 oranında sulandırılmış birinci basamak reaksiyondan elde edilen 2 µl PCR ürünü eklendi.

Thermalcycler cihazı, 94°C'de 2 dk, 30 siklus olacak şekilde, 94°C'de 1 dk, 56°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk ve son olarak, 72°C'de 5 dk olacak şekilde programlandı.

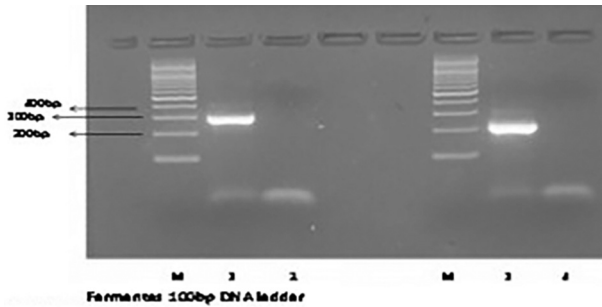
PCR ürünleri, 0,2 µg/ml ethidium bromide içeren %2'lik agar jele, 5 µl yüklendikten sonra elektroforezi yapılarak, UV transimülatörde görüntüledi.

Bulgular

CE enfeksiyonuna yakalanan 18 koyun ve 26 kuzudan sağlanan doku homojenatlarında semi-nested PCR testi 235 bp büyüklüğünde ampikonlar elde edilerek doku örnekleri orf virusu yönünden pozitif olarak bulunurken (Şekil 1), aynı hayvanlara ait lökosit örneklerinin nested RT-ŞPCR metodu ile pestivirus nükleik asit varlığı yönünden yaklaşık 300 bp ve 200 bp büyüklüğünde fragmentler amplifiye edilemedi (Şekil 2).



Şekil 1. Şekilde 1;1: basamak pozitif kontrol, 2;2: basamak pozitif kontrol, 3; 1. basamak negatif kontrol,4; 2 basamak negatif kontrol



Şekil 2. 1. basamak PCR, 1: Pozitif kontrol, 2: Negatif Kontrol; 2. Basamak PCR, 3: pozitif Kontrol, 4: negatif kontrol

Tartışma ve Sonuç

CE enfeksiyonu genç kuzu ve oğlakların dışında ergin koyun ve keçilerde özellikle atipik ve persiste, multifokal, proliferatif lezyonlarla karakterize enfeksiyonlar şeklinde sık sık görülmekte olduğu ve sebep olarak immun yetmezlik ve orf virusun virulensinin etkili olabileceği bildirilmiştir [1,2,14].

Persiste koyun ve keçilerden izole edilen virusların koyun ve keçilerde yapılan patojenite çalışmaları

rında, Orf virus izolatlarının persiste enfeksiyonlar oluşturmasının sebebi olarak en yaygın görüş immun yetmezlik olarak bildirilmektedir [9,17]. Koyun ve keçilerde immun yetmezlik nedenlerinden biri de persiste enfeksiyonlara sebep olan pestiviruslardır.

Koyun ve keçilerde özellikle atipik ve persiste CE enfeksiyonlarının görülmesinde immun sistemi olumsuz etkileyen sebepler arasında, hayvanların bir yerden başka bir yere nakledilmesi [23], mineral madde eksikliği, hayvanların kuru ve sert otlaklarda otlatılması [12], hayvan rasyonlarında bulunan bakır ve demir arasında mineral madde dengesizliği [5] yapılan çalışmalarda bildirilmiştir.

Bu çalışma, CE enfeksiyonuna yakalanan ergin koyun ve bu koyunlara ait kuzularda şiddetli dudak ve diş eti lezyonlarının oluşmasında immunosupresif etki yapan persiste pestivirus varlığının araştırılması amacıyla gerçekleştirilmiş, ancak kuzularla birlikte 3-4 yaş ergin koyunlarda özellikle dudak, diş eti ve meme lezyonlarıyla karakterize CE enfeksiyonu görülen hayvanların lökosit örneklerinde pestivirus varlığı saptanamamıştır.

Sonuç olarak hastalık olgularının vitamin-mineral eksiklikleri, parazit enfestasyonları ve kronik zehirlenmeler yönünden incelenmesinin atipik ve persiste CE enfeksiyonlarının sebeplerinin ortaya konulmasında uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

1. Abu Elzein EME and Housavi FMT (2009). Drastic cutaneous multi-focal orf infection in goats, causing severe dysfunctioning. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 28(3), 1025-1029.
2. Buddle BM, Dellers RW, Schuring GG. (1984a). Heterogeneity orf contagious ecthyma virus isolates. *Am J Vet Res*, 45(1), 75-79.
3. Buddle BM, Dellers RW, Schuring GG. (1984b.) Contagious ecthyma virus-vaccination failures. *Am J Vet Res*, 45(2), 263-266.
4. Coates JW, Haff S. (1990). Contagious ecthyma: An unusual distribution of lesions in goats. *Can Vet J*, 31, 209-210.
5. Çabalar M, Voyvada H, Sekin S, (1996). Van yöresinde bir sürüde ecthyma contagious (Orf) olgusu. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 43, 45-51.
6. De la Concha-Bermejillo A, Guo J, Zhang Z, Waldron D, (2003). Severe persistent orf in young goats. *J Vet Diagn Invest*, 15, 423-431.
7. Ekicioğlu G, Özkan N, Şalvaazar E. (2005). Hematoksilen-Eozin (hematoxylin-eosin) (H&E). *Aegean Pathology Journal*, 2, 58-61.

8. Ergin H, Köklü A. (1974). Ektima virusunun doku kültüründe pasajı ve antijenik özelliklerinin incelenmesi. *Pendik Vet Mikrobiyol*, 6 (2), 12-20.
9. Gallina L, Scagliarina L, McInnes CJ, Guercio A, Purpari G, Prosperi S, Scagliarini A. 2008. Parapoxvirus in goats: experimental infection and genomic analysis. *Vet Res Common*, 32, 203-205.
10. Guo. J, Rasmussen J, Wünschmann A, De la Concha-Bermejillo A. (2004). Genetic characterization of orf viruses isolated from various ruminant species of a zoo. *Vet Microbiol*, 99, 81-92.
11. Hasırcıoğlu S., Kale M., Acar A. (2009). Investigation of pestivirus infections in aborted sheep and goats in Burdur region. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15(2), 163-167.
12. Hawkins CD., Ellis TM., Davis MK., Peet RL., Parkinson J. (1991). An unusual outbreak of contagious ovine ecthyma. *Aust Vet*, 68, 210-211.
13. Hooser SB., Scherbo G., Morin DE., Whiteley HE. (1989). Atypical contagious ecthyma in a sheep after extensive cutaneous thermal injury. *Jaoumo*, 195(9), 1255-1256.
14. Housawi FMT, Abu Elzein EME, Amin MM, Al Afaleg AI. (1991). Contagious pustular dermatitis (orf) infection in sheep and goats in Saudi Arabia. *Vet Record*, 128, 550-551.
15. Inoshima Y, Morooka A, Sentsui H, (2000). Detection and diagnosis of parapoxvirus by polimerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 84, 201-208.
16. Mc Goldrick A, Bensaude E, Ibata G, Sharp G, Paton DJ. (1999). Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent probes. *J Virol Methods*, 79, 85-95.
17. McKeever D. 1984. Persistent orf. *Vet Record*, 29, 334-335.
18. Mondal B, Bera AK, Hosamani M, Tembhumne PA, Bandyopadhyay SK. (2006). Detection of virus from an outbreak in goats and its genetic reletion with other Parapoxviruses. *Vet Res Commun*, 30, 531-539.
19. Nettleton PF, Gilray JA, Yirrell DL, Scott GR, Reid HW. (1996). Natural transmission of orf virus from clinically normal ewes to orf-naive sheep. *Vet Record*, 139, 364-366.
20. Peterhans E, Bachofen C, Stalder H, Schweizer M. (2010). Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Vet Res*, 41-44.
21. Pye D. (1989). Cell lines for growth of sheep viruses. *Aust Vet J*, 66(7), 231-232.
22. Sanchez RL, Hebert A, Lucia H, Swedo J. (1985). A case report with histologic, electron microscopic and immunoperoxidase studies. *Arch Pathol La Med*, 109, 166-170.
23. Zhang K, Lu Z, Shang Y, Zhergld , Jin Y, He J. And Liu X. (2010). Diagnosis and phylogenetic analysis of orf virus from goats in china. *Virology Journal*, 7, 78.

Marmara Bölgesinde Yeni Doğan Buzağı İshallerinde Bovine Coronavirusların Saptanması ve Patojenite Çalışması

Züleyha Pestil¹, Veli Gülyaz¹, Mustafa Hasöksüz²

¹ Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü 34890, İstanbul

² Viroloji Anabilim Dalı, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Avcılar, İstanbul

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

Özet: Bu çalışma Marmara Bölgesi'nde yeni doğan ishallerinde buzağılarda BCoV'un yaygınlığının tespiti, virus izolasyonu ve aşı virüsü belirlenmesi amacıyla gerçekleştirildi. İstanbul, Tekirdağ, Kırklareli, Kocaeli illerinden sırasıyla 28, 37, 15 ve 20 adet olmak üzere toplam 100 adet ishal görülen 0-2 aylık buzağıya ait gaita numunesi çalışıldı. Her bir numune örneği BCoV antijen detection ELISA ve PCR ile test edildi. Yapılan analizler sonucu gaita numunelerinden PCR testi ile 2 adet BCoV nükleik asit varlığı saptandı. Pozitif bulunan gaita örnekleri 1/10 dilüsyonlarda sulandırılıp HRT hücre kültürüne ekimleri yapıldı. Pozitif numunelerden yapılan hücre kültürü ekimlerinde BCoV izole edilemedi.

Anahtar kelimeler: Coronavirus, Buzağı, ELISA, izolasyon, PCR, Patojenite

The Determination and Pathogenicity of Bovine Coronavirus in Newborn Calves with Diarrhea in Marmara Region

Abstract: The aim of this research project was to determine the prevalence of BCoV infection in dairy enterprises in Marmara region, Turkey and to isolate the seed strain for a Turkish vaccine. A total of 100 feces samples obtained from calves up to 2 months were examined that were collected 28, 37, 20 and 15 samples from provinces of İstanbul, Tekirdağ, Kocaeli and Kırklareli, respectively. All samples were tested for BCoV using by ELISA and PCR assays. Two samples were detected as positive by PCR. For virus isolation, 1/10 dilution of feces samples was inoculated in HRT cell cultures. On contrary to assays, the virus was not isolated.

Key words: Coronavirus, calves, ELISA, isolation, PCR, pathogenicity

Giriş

Bovine coronavirus (BCoV) ilk defa Mebus ve arkadaşları tarafından 1973 yılında neonatal buzağı ishalleri etkeni olarak bildirilmiştir. Ayrıca virus sığır solunum sistemi ve ergin sığırların kış dizanterisi etkeni olarak tanımlanmıştır. Bir vakada buzağılarda deneysel çalışma esnasında kaza eseri insanlara bulaştığı bildirilmiştir [8,18].

BCoV etkeni tracheal ve lenfoid organ kültüründe üretilmekte birlikte cell line hücre kültürlerinden HRT-18, Vero, MDBK, MDCK hücre kültürlerinde de üretilmektedir. Hücre kültürlerine tripsin ve pankreatinin eklenmesi virusun üremesi üzerine olumlu etkisi vardır. Hücre kültürlerinin erken pasajlarında virus üremesine bağlı olarak tipik sitopatojenik (CPE) odaklar görülmeyebilir. İleri pasajlarda syncytia oluşumu, hücrelerin yüzeyden ayrılması gibi oluşumlarla CPE odakları netleşir. Virusun üremesine bağlı olarak meydana gelen plaklar besiyerine agaroz ve tripsin eklenmesiyle net olarak

gözlenir. Deneysel enfeksiyon amacıyla kolostrum almamış Germ-free ve konvansiyonel buzağular kullanılır [4,8].

BCoV partikülleri 80-160 nm, ortalama 120 nm çapındadır. BCoV izolatları poliklonal serum ile yapılan çalışmalarda tek serotipe sahiptirler. Ayrıca monoklonal antikolar ile N, S, HE proteinleri bakımından farklı suşlar saptanmıştır. Ayrıca suşlar arasında CPE ve plak oluşturma özellikleri bakımından farklılıklar olduğu bildirilmiştir. Virus üremesine bağlı hücre stoplazmasında inklüzyon cisimcikleri saptanır [12].

BCoV'unun meydana getirdiği enteritis vakaları buzağuların yaşına, immun sistemin durumuna, virus suşuna ve dozuna bağlı olarak değişiklik gösterir. Özellikle kolostrum almamış genç buzağılarda şiddetli ishal ortaya çıkar. Deneysel enfeksiyonlarda virus inokulasyonunu takiben 48 saat sonra sarı ishal gelişir ve 3-6 gün sürer. Bu periyotta virus gaita da saptanabilir. Akut dönemde buzağular anorek-

sik ve durgundur. Eğer ishal şiddetliyse buzağılarda dehidrasyon ve pireksi görülür. Hastalık şiddetliyse buzağılarda ölüm oranı yükselir. BCoV ve BRV enfeksiyonları çoğunlukla genç hayvanlarda görülmektedir. Yeni doğanlar genellikle yaşamlarının ilk haftasında enfeksiyona duyarlı olup, BCoV enfeksiyonu sıklıkla 3-21 günlük yaş grubundaki buzağılarda kolon ve incebağırsaklarda meydana gelen lokal bir enfeksiyondur [21,22].

BRV enfeksiyonu ve BCoV ile gelişen sindirim sistemi enfeksiyonlarında etkenlerin alınması enfekte gaita ile bulaşık yem ve sular ile oral yoldan olmaktadır. Erişkin hayvanlar genellikle BRV ve BCoV ile subklinik enfekte olduklarından, hastalığın sürü içinde yayılmasında önemli rol oynarlar [11,13]. Virusun saçılışı gebeliğin geç dönemlerinde özellikle doğum yaptıkları gün muhtemelen hormonal değişiklikler ve hormonların immun sistemdeki etkilerine bağlı olarak artmaktadır [2]. Bu nedenle sürü içindeki subklinik enfekte erişkin hayvanlar yeni doğan buzağuların etkeni edinmelerinde önemli rol oynarlar. Bundan başka sağlıklı görünümlü buzağuların nazal svap örnekleri ya da gaitalarından BCoV, gaita örneklerinden BRV izolasyonları bildirilmiş olup, bu buzağuların virüsü düşük titrede saçtıkları ve sürüde klinik enfeksiyonların oluşmasında önemli rol aldıkları bildirilmiştir [16].

BCoV, İngiltere, Almanya ve diğer bazı avrupa ülkelerinde, Japonya ve Çin'de yeni doğan buzağılarda diyare etkeni olarak tanımlanmıştır [5].

Etken sığır popülasyonu arasında yaygındır. Virus hem ishalleri hemde sağlıklı buzağılarda saptanabilir. Sığırlar arasındaki insidensi %8-69 olurken, ishalleri ve sağlıklı buzağılarda %24'e kadar tespit edilmiştir. Yeni doğan buzağılarda ishalleri neden olan en önemli viral etkenler arasında bovine rotavirus (BRV)'lerle birlikte bovine coronavirus (BCoV)'lar önemli yer tutmaktadır. Ülkemizde ve diğer ülkelerde yapılan çalışmalar sonucu kimi ülkelerde BCoV enfeksiyonunun BRV enfeksiyonuna göre daha fazla olduğu, kimi ülkelerde ise tersi durum arz ettiği bildirilmektedir. Ülkemizde BRV ve BCoV'ların neden olduğu buzağı ishalleri ile mücadelede başarılı olmanın bir yoluda etkenlerin varlığı ve oranlarının bilinmesine bağlıdır. Özellikle BCoV ishallerinin önlenmesi amacıyla gebe sığırlara yapılan aşılamaların etkinliği, hastalık etkeninin yaygınlığının bilinmesine bağlıdır [14].

Bu proje, Marmara Bölgesi'nde sığır yetiştiriciliği yapılan işletmelerdeki buzağılarda görülen BCoV izolasyonu, aşı suşu seçimi ve patojenitesinin saptanması amacıyla gerçekleştirildi.

Materyal ve Metod

Materyal

Gaita örnekleri: Bu çalışmada Marmara Bölgesi illerinden; İstanbul, Tekirdağ, Kırklareli ve Kocaeli'nde süt sığırcılığı yapan işletmelerden sırasıyla 28, 37, 15 ve 20 adet olmak üzere ishal görülen, 0-2 aylık toplam 100 buzağıya ait gaita numunesi işlendi.

Hücre kültürü: Virus izolasyonu ve serum nötralizasyon testleri için Human Rectal Tümör [HRT] hücre kültürü, ABD Ohio Tarımsal Araştırma ve Kalkınma Merkezinden temin edildi.

Referans Coronavirus suşu: BCoV Mebus suşu ABD Ohio Tarımsal Araştırma ve Kalkınma Merkezinden temin edildi ve pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Coronavirus hiperimmun serumu: BCoV Mebus suşu kullanılarak tavşanlarda hazırlandı [5,9,13,19].

Vasat: Hücre kültürü ve virus üretimi amacıyla Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM) kullanıldı.

Fötal Calf Serum: Hücre kültürü hazırlanmasında %10 oranında GMEM vasatına eklendi.

Pankreatin: 10mikrogram/ml oranında virus üretme vasatına eklendi.

ELISA test kiti; Ticari ELISA test kiti (Bio-X Coronavirus Antijen Detektion Elisa Kit) kullanıldı.

Deneme hayvanları: Çalışmada izole ve identifiye edilecek BCoV suşlarının buzağılarda patojenite çalışmaları amacıyla, BCoV aşısı yapılmamış ve doğum öncesi kanlarında BCoV karşı antikor taşımadıkları saptanan gebe sığırlardan doğan 4 buzağı kullanılacaktır [3]. İsolasyon gerçekleştirilemediği için deneme hayvanı kullanılmadı.

Metod

Gaita örneklerinin hazırlanması: İshalleri buzağılardan toplanan 100 gaita örneği 10µg/ml pankreatin, 100 IU/ml penicilin, 100mg/ml streptomisin ve

10µl/ml partricine içeren GMEM vasatı ile %10 oranında sulandırıldı. Sulandırılan gaita örnekleri 3000 rpm'de 30 dakika süreyle santrifüj edildi. Ayrılan süpernatantlar ve 0,22µm por çaplı membran filtrelerden süzülür ve elde edilen süzüntüler cryoviallere taksim edilerek -70°C'de kullanılmaya kadar muhafaza edildi [8,13,17].

Coronavirusların RT-PCR ile saptanması: RNA izolasyonu: Gaita veya hücre kültürü örneklerinden RNA izolasyonu High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) protokolü uygulanarak yapıldı.

RT-PCR: RT-PCR aşaması [11]'nin bildirdiği yöntem kullanılarak One Step RT-PCR Kit (Qiagen) ile gerçekleştirildi.

İzole edilen RNA'lar BCoV'unun Mebus suşunun N proteininden seçilen 729bp lik (GenBank No. M16620) bölgeyi kodlayan spesifik primerler F:(-GCAATCCAGTAGTAGAGCGT-) (21-40); R:(-CTTAGTGGCCTCTTGCCAA-) (731-750); nested PCR için Fn primer, (-GCCGATCAGTCCGACCAATG-) (79-98);Rn primer, (-AGAATGTCAGCCGGGGTAG-) (467-485) kullanıldı. RT-PCR ürünleri sırasıyla 730 ve 407 bp'dir.

İlk tur PCR için;

İzole edilen RNA'nın 2,5µl'si ile 0,3µl DMSO karıştırıldı ve üzerine 17,2µl master miks (5,6 µl DPEC'li su, 4µl 5x buffer, 4µl Q solüsyonu, 0,8µl dNTP, 0,8µl enzim 0,5'er µl primerler) eklendi. Karışımı içeren tüpler thermalcycler cihazına yerleştirilerek 50°C'de 30 dk(1siklus), 95°C'de 15dk(-1siklus), 95°C'de 1dk, 58°C'de 1 dk, 72°C'de 2 dk (30 siklus) ve 72°C'de 10 dk(1 siklus) olacak şekilde ilk tur PCR işlemi gerçekleştirildi.

İkinci tur nested PCR için; 2x MMix (Fermentas) 10 µl, DPEC'li su 6 µl, Primer Fn 1 µl Primer Rn 1 µl içeren karışım hazırlandı. Hazırlanan bu karışıma ilk tur PCR ürününden 2 µl eklendi. Karışımı içeren tüpler thermalcycler cihazına yerleştirilerek(1siklus) 95°C'de 5dk, 30 siklus için 95°C'de 1dk, 58°C'de 1 dk, 72°C'de 2 dk ve (1 siklus) 72°C'de 10 dk olacak şekilde nested PCR işlemi gerçekleştirildi.

Birinci ve İkinci tur PCR ürünleri (cDNA) %2'lik agarozda yürütülerek UV altında gözlemlendi [12].

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA): Bu amaçla ticari ELISA test kiti (Bio-X Coronavirus

ELISA Kit) kullanıldı. Gaita örnekleri üretici firma tarafından belirlenen uygulama yönergesi doğrultusunda işlenerek 450 nm filtre absorbanları okunmak suretiyle sonuçlar değerlendirildi [2,7].

Human Rectal Tümör (HRT) hücre kültürü hazırlanması: Azot tankında muhafaza edilen HRT hücre kültürü 37°C'lik benmaride hızlı bir şekilde çözdürüldü, 3-5X10⁵/ml hücre olacak şekilde %10 FCS içeren GMEM vasatı ile sulandırılarak 25 cm²'lik flasklara 7,5 ml konarak 37°C'de ve %5 CO₂'li ortamda monolayer hücre kültürü hazırlandı [3,5,8].

Hücre kültüründe BCV izolasyonu: Gaita örneklerinden hazırlanan süpernatantlardan 100 µl 25 cm²'lik flasklarda üretilen HRT hücre kültürlerine ekimleri yapıldı. Bu amaçla, %90 monolayer olarak üreyen HRT hücre kültürlerinin vasatları döküldü, 3 kez 10µg/ml pankreatin, 100 IU/ml penicilin, 100 mg/ml streptomisin ve 10 µl/ml partricine içeren GMEM vasatı ile hücre yüzeyleri yıkandı ve 7,5 ml pankreatinli GMEM vasatı konarak 1 saat süreyle 37°C'de inkube edildi. İnkubasyon periyodu sonunda flasklardaki hücrelerin yüzeyleri 3 kez pankreatinli GMEM vasatı ile yıkandı ve her flaska 10µg/ml pankreatin içeren 7,5 ml GMEM vasatı konarak 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkubasyona bırakıldı. Her gaita örneğinden ekim yapılan 4 flask hücre kültüründen ikisine her iki günde bir 500 µg/ml saf pankreatin solüsyonundan 25'er µl eklendi. Hücre kültürleri 10 gün süreyle her gün CPE oluşumları yönünden kontrolleri yapılarak her örneğin 3 kör pasajı gerçekleştirildi [6,8,17].

Bulgular ve Tartışma

Gaita örneklerinde BCoV varlığının saptanması: İshalli buzağılardan toplanan 100 adet gaita örneklerinden 2 adetinde (%2) RT-PCR ile BCoV varlığı pozitif olarak tespit edildi.

Human Rectal Tümör (HRT) hücre kültüründe BCoV izolasyonu: Gaita örneklerinden hazırlanan süpernatantlardan HRT hücre kültürlerine yapılan ekimlerde 3 kör pasaj sonrasında, BCoV izolasyonu yapılamadı [2,6], yapmış olduğu çalışmada, 116 erişkin sığırdan alınan gaita örneklerini BCoV antijenleri yönünden ELISA ile, 919 erişkin sığırdan alınan kan örneklerini Coronavirus spesifik antikoları yönünden mikronötralizasyon testi ile incelen-

diğini, elde edilen veriler sonucu erişkin sığırlarda Coronavirus enfeksiyonunun yaygın olduğunu ve yeni doğanların Coronavirus enfeksiyonlarında, erişkin sığırların da bir epidemiyolojik kaynak olarak değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Erdoğan ve ark.,(2003) Kars ve yöresinde neonatal buzağılarda BRV ve BCoV'unun yaygınlığının belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada, neonatal buzağılarda ishal insidensi %28,8 olarak bulunurken BRV ve BCoV'ların prevalanslarını sırasıyla %31,1 ve %2,2 olarak belirlemişlerdir. Türkiye'nin 16 farklı ilinden toplanan 1-30 günlük ishalleri buzağıya ait 185 gaita örneğinin 48'inde (% 25,9) BRV, 27'sinde tek başına BRV, 24'ünde (% 13) BCoV, 8'inde tek başına BCoV, 9'unda BRV+BCV birlikte tespit edilmiştir [6]. İshal semptomu gösteren 83 buzağıdan sağlanan gaita örneklerinin 52'sinde (%61,4) BRV ve BCoV yönünden etkenlerin varlığının saptandığını, 52 olgunun 7'sinde (%13,4) BRV ve BCoV ile mix enfeksiyonlar olduğunu, 37 (%71,1) olguda sadece BRV ve 8 (%15,4) olguda sadece BCoV etkenlerinin varlığının ELISA tekniği ile saptandığını bildirmiştir [2,20], tarafından 180 ishalleri sığırdan sağlanan gaita ve nazal svap örneklerinin kontrolü sonucunda gaita örneklerinin %3 ünde, nazal svap örneklerinin %31'inde virus izolasyonu yapılmak suretiyle BCoV enfeksiyonunun varlığı saptanmıştır. Araştırmacılar ishalleri buzağılar ile aynı ahırda bulunan sağlıklı görünümlü buzağıların nazal svap örneklerinin % 25 inde BCoV varlığını bildirmişlerdir.

[1] yaptıkları çalışmada, ishal görülen 8 haftalık 108 buzağıdan topladıkları gaita örneklerinde ELISA metodu ile BCoV oranının %38,9 olarak saptandığını bildirmişlerdir.

[17], tarafından Çin'de yapılan çalışmada buzağılarda ishallerin ilk 2 aylık dönem içinde olduğunu, morbidite oranının %98,8 (78/79), mortalite oranının %10 (8/79) olarak saptandığını, çalışmalarında 10 adet ishalleri buzağılara ait gaita örneklerinin BCoV yönünden 10 örnekten HA-HI ile 4 (%40) adetinde, ELISA metodu ile 6 (%60) adetinde BCoV'un pozitif bulunduğunu bildirmişlerdir.

[22], Endonezya'da ishalleri 78 buzağıya ait gaita örneklerinde BCoV oranını %5 olarak saptamışlardır.

[9], tarafından 121 sığır gaitasında BCoV antijenleri yönünden ELISA metodu ile yapılan tara-

malarda, 121 gaita örneğinin 6'sında (%5) serbest, 85'inde (%70) ise BCoV'larının immunglobulinleri ile complex halde olduklarını tespit ettikleri bildirilmiştir.

[15], ishal görülen 8 buzağının gaitaları üzerinde yaptıkları çalışmada 1 buzağıda aynı hafta içinde gaita ve nazal svaplarında BCoV'u tespit ettiklerini, bir buzağıda doğumdan sonraki 4. haftada önce gaitada sonra 6. haftada nazal svaplarında, bir buzağıda ise 9. haftada gaita örneğinde, 10. haftada ise nazal svaplarında BCoV tespit ettiklerini bildirmişler, BCoV epidemiyolojisinde buzağı ishallerinde respiratorik formun, virus saçımı yönünden üzerinde durulmasının gerekliliğini vurgulamışlardır. Tarafımızdan yapılan bu çalışmada ishal görülen 100 buzağıya ait gaita örneklerinden 2'sinde %2 oranında ELISA ve RT-PCR ile BCoV antijenleri tespit edilmiştir. Tespit edilen bu oran [10], tarafından bildirilen orana yakın olmasına rağmen, aynı tespit oranının yapılan diğer bazı çalışmalarda bildirilen [1,2,9,15,20,22] oranlardan çok düşük olduğu görülmüştür.

BCoV'unun meydana getirdiği enteritis vakaları buzağıların yaşına, immun sistemin durumuna, virus suşuna ve dozuna bağlı olarak değişiklik gösterir. Özellikle kolostrum almamış genç buzağılarda şiddetli ishal ortaya çıkar. Buzağılarda enteritis vakalarında virus saçılımı enfeksiyonu izleyen günlerde azalacağından ishal görülen buzağılarda enfeksiyonun ilk 2 gününde gaita örneğinin alınması ve alınan örneklerin soğuk zincir altında dondurulmadan laboratuvarlara gönderilmesi BCoV'unun tespitinde önemlidir. Gaita örneklerinin BCoV yönünden uygun olmayan şartlarda muhafaza edilmesi ve buzağılarda belli bir tedavi süreci sonrası analiz için gaita örneklerinin laboratuvara gönderilmesi BCoV tespitini zorlaştırmaktadır.

Deneysel enfeksiyonlarda virus inokulasyonu takiben 48 saat sonra sarı ishal belirtileri gelişir ve 3-6 gün sürer. Bu periyotta virus gaitada saptanabilir [21,22]. Ancak direkt gaita süpernatantı ile yapılan patojenite çalışmasında buzağılarda ishal ile karakterize klinik bulguların saptanamamasının, RT-PCR ile BCoV pozitif gaita örneklerindeki BCoV'nun inaktif olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sonuç bize, buzağılarda enteritis vakalarında BCoV'unun tespitinde virus saçılımının enfeksiyonu izleyen günlerde azalacağından, ishal

görülen buzağılarda enfeksiyonun ilk 2 gününde gaita örneğinin alınması ve alınan örneklerin soğuk zincir altında dondurulmadan laboratuarlara gönderilmesinin önemini ortaya koymaktadır.

Tarafımızdan yapılan bu çalışmada BCoV oranının düşük bulunması (%2) ve virusun izole edilememesinin, gaita örneklerinin buzağılarda ishale karşı bir tedavi uygulandıktan sonra alınmasından ve gönderilme esnasında soğuk zincire uyulmamasından kaynaklanabileceği, ayrıca [9], tarafından da bildirildiği üzere, gaita örneklerinde BCoV'larının immunglobulinleri ile complex halde olduklarından, özellikle ELISA ile düşük oranda bulunduğu kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

1. Abraham, G., Roeder, P. L., and Zewdu R., (1992). Agents associated with neonatal diarrhea in Ethiopian dairy calves. *Tropical Animal Health & Production* 24,74-80.
2. Alkan, F., (2002). Sığırlarda Coronavirus Enfeksiyonunun Epidemiyolojisi. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu.
3. Benfield, D.A. and Saif, L. J., (1990). Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows diarrhea in Great Britain and Denmark, *Vet Microbiol* 3, 101-113.
4. Bridger, J.C., Woode, G. N., Meyling, A., (1978). Isolation of coronaviruses from neonatal calf diarrhea in Great Britain and Denmark. *Vet Microbiol* 3, 101-113
5. Chengping, L., Huochun, Y., Eichorn, W., (1991). Coronavirus as an agent of Neonatal calf diarrhea in a Chinese dairy cattle farm. *J Vet Med B* 38, 473-476.
6. Cho, K. O., M. Hasoksuz, P. R. Nielsen, K. O. Chang, S. Lathrop, and L. J. Saif., (2001). Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. *Archives of Virology* 146, 2401-19.
7. Choenthaler S.L. and Kapil S., (1999). Development and application of a bovine coronavirus antigen detection enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Clinic. and Diagnos. Lab. Immuno.* Jan. 130-132.
8. Clark, M. A., (1993). Bovine coronavirus. *British Veterinary Journal* 149, 51-70.
9. Crouch C.F. and Acres S.D., (1984). Prevalence of rotavirus and coronavirus antijens in the feces of normal cows. *Can.J.Comp.med.*, 48, 340-342.
10. Erdoğan H.M, Ünver Ahmet, Güneş Vehbi, Çitil Mehmet., (2003). Frequency of Rotavirus and Coronavirus in Neonatal Calves in Kars District. *Kafkas Univ. Vet Fak. Derg.* 9(1): 65-68
11. Hasoksuz M, Hoet AE, Loerch SC, Wittum TE, Nielsen PR, Saif L.J., (2002). Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in an Ohio feedlot. *J Vet Diagn Invest.*, 14(4), 308-13.
12. Hasoksuz M, Lathrop S, Al-dubaib MA, Lewis P, Saif L.J., (1999). Antigenic variation among bovine enteric coronaviruses (BECV) and bovine respiratory coronaviruses (BRCV) detected using monoclonal antibodies. *Arch Virol.*, 144(12), 2441-7.
13. Hasoksuz M, Lathrop SL, Gadfield KL, Saif L.J., (1999). Isolation of bovine respiratory coronaviruses from feedlot cattle and comparison of their biological and antigenic properties with bovine enteric coronaviruses. *Am J Vet Res.* 60(10), 1227-33.
14. Hasoksuz, M., Kayar, A., Dodurka, T., Ilgaz, A., (2005). Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in Northwestern Turkey. *Acta Vet Hung.*, 53(1), 137-46.
15. Heckert, R. A., Saif, L. J., G. Myers, W., and Agnes., A. G., (1991). Epidemiologic factors and isotype-specific antibody responses in serum and mucosal secretions of dairy calves with bovine coronavirus respiratory tract and enteric tract infections. *Am J Vet Res.* 52, 845-51.
16. Heckert, R. A., Saif, L. J., Hoblet K.H. and Agres A.G., (1990). A longitudinal study of bovine coronavirus enteric and respiratory infection in dairy calves in two herds in Ohio. *Vet. Microbiol.*, 22, 187-201.
17. Lu, C., Yao H. and Eichhorn W., (1991). Coronavirus as an agent of neonatal calf diarrhea in a chinese dairy cattle farm. *J.Vet. Med.*, 38, 473-476.
18. Mebus, C. A., Stair, E. L. Rhodes, M. B., and Twiehaus, M. J., (1973). Neonatal calf diarrhea: propagation, attenuation, and characteristics of a coronavirus-like agent. *Am J Vet Res.* 34, 145-50.
19. Reynolds, D. J., Chasey, D. A., Scott, C., and Bridger, J. C., (1984). Evaluation of ELISA and electron microscopy for the detection of coronavirus and rotavirus in bovine faeces. *Veterinary Record.*, 114, 397-401.
20. Tsunemitsu, H., Kanawati, Z. R., el-Smith, D. R., Reed, H. H., and Saif, L. J., (1995). Isolation of coronaviruses antigenically indistinguishable from bovine coronavirus from wild ruminants with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 3264-9.
21. Van Kruiningen, H. J., Castellano, V. P., Torres, A., and Sharpee, R. L., (1991). Serologic evidence of coronavirus infection in New York and New England dairy cattle with winter dysentery. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.*, 3, 293-6.
22. Waltner T.D., Martin S.W. and Meek A.H. (1986). An epidemiological study of selected calf pathogens on holstein dairy farms in southwestern ontario. *Can J. Vet. Res.* 50: 307-313.

Subklinik Mastitisli İneklerde Süt ve Süt Hücrelerinde Vitamin C Düzeyleri

Pınar Peker Akalın¹, Yaşar Ergün², Nuri Başpınar³, Gökhan Doğruer²,
Altuğ Küçükgül¹, Zafer Cantekin⁴, Mustafa İşgör¹, Mustafa Sarıbay²,
Ayhan Baştan⁵, Ece Koldaş², Seçkin Salar⁵, İshak Gökçek⁶

Geliş Tarihi / Received: 20.05.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 03.06.2016

¹Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Hatay

²Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Hatay

³Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Konya

⁴Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Hatay

⁵Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Ankara

⁶Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Hatay

Özet: Çalışma, subklinik mastitisli ineklerde süt ve süt hücrelerinde Vitamin C düzeylerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Süt örneklerinde somatik hücre sayımı yapıldı ve örnekler kontrol (1-87 x 1000 hücre), mastitli 1. grup (154-380 x 1000 hücre), 2. grup (418-812 x 1000 hücre), 3. grup (914-1928 x 1000 hücre) ve 4. grup (2614-8050 x 1000 hücre) olacak şekilde gruplandırıldı (n=12). Süt hücrelerinde ve süt serumunda (yağı ve hücreleri alınmış) Vitamin C düzeyleri belirlendi ve Vitamin C ve süt somatik hücre sayısı arasındaki korelasyonlar hesaplandı. Ayrıca alman süt numunelerinden mikrobiyolojik ekim yapılarak, etken izolasyonu ve identifikasyonu yapıldı. Subklinik mastitisli sütlerde (1, 2, 3, ve 4. gruplar) $\mu\text{g}/10^6$ hücredeki Vitamin C düzeyleri kontrol grubundan düşük olarak bulunurken ($p<0,001$), süt hücresi Vitamin C düzeyleri ile süt somatik hücre sayısı arasında pozitif bir korelasyon belirlendi ($r=0,469$, $p<0,001$ $n=60$). Süt serumu sonuçları ele alındığında mastitli 4. grup Vitamin C düzeyleri diğer mastit gruplarına ($p<0,05$) ve kontrol grubuna ($p>0,05$) göre düşük olduğu görüldü. Ayrıca süt serumu Vitamin C düzeyleri ile süt somatik hücreleri arasında negatif bir korelasyon saptandı ($r=-0,420$, $p<0,01$ $n=60$). Sonuç olarak subklinik mastitisin derecesi ile ilgili olarak somatik hücre sayısının arttığı, süt serumu Vitamin C düzeylerinin düştüğü, birim hücre başına düşen Vitamin C düzeylerinin azaldığı, Vitamin C düzeyleri ile mastit arasında bir bağıntının olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: Subklinik mastitis, Vitamin C, Süt Somatik Hücre Sayısı, İdentifikasyon

Effects of Subclinical Mastitis on Milk Somatic Cells and Milk Vitamin C Levels in Cows

Abstract: In this study, it was aimed to determine the levels of Vit C in milk and milk cells of subclinical mastitic cows. Somatic cell count was determined in the quarter milk samples of all animals and the groups were scored control (1-87 x 1000 cells), mastitic 1st group (154-380 x 1000 cells), 2nd group (418-812 x 1000 cells), 3rd group (914-1928 x 1000 cells) and 5th group (2614-8050 x 1000 cells) (n=12). Milk serum and milk cell Vitamin C levels were determined and the correlation between Vitamin C levels and somatic cell count were evaluated. Also microbiological diagnosis was conducted. In subclinical mastitic milks, Vitamin C levels ($\mu\text{g}/10^6$ cell) were lower compared to control group ($p<0,001$) and positive correlation was determined between milk cell Vitamin C levels and somatic cell count ($r=0,469$, $p<0,001$ $n=60$). As regards milk serum, Vitamin C levels were lower in the 5th group compared to the other mastitic ($p<0,05$) and control groups ($p>0,05$). There was a negative correlation between milk serum Vitamin C levels and somatic cell count ($r=-0,420$, $p<0,01$ $n=60$). In conclusion, it was found that somatic cell count was elevated with the mastitis levels, gradually, Vitamin C levels per cell and in milk serum decreased in mastitis. It is also found that there was a correlation between Vitamin C levels and mastitis.

Key words: Subclinical Mastitis, Vitamin C, Somatic Cell Count, Identification

Giriş

Mastitis hayvan sağlığını tehdit etmesinin yanı sıra ciddi ekonomik kayıplara neden olan ve insan sağlığı ve beslenmesi açısından da önemli olan bir problemdir. Mastitis sütteki fiziksel, kimyasal ve

bakteriyolojik değişimlerle meme glandular dokusundaki patolojik değişimleri kapsar [19]. Klinik mastitis olgularında süt ve meme dokusunda önemli yangısal belirtiler görülürken, subklinik mastitiste gözle görülür değişiklikler oluşmamaktadır. Bu nedenle subklinik mastitis uzun süre ve daha yaygın

bir şekilde devam etmekte ve daha fazla ekonomik kayıplara neden olmaktadır [4].

Subklinik mastitis görülme sıklığı Türkiye’de %30 olarak belirlenmiş, görülme sıklığının bölgelere göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir; Kars yöresinde yapılan çalışmada bu oran %15.78 iken, Afyon ilinde % 43.7, Konya yöresinde %23, Hatay ilinde %48 ile %71, Çukurova bölgesinde %58 olarak bildirilmiştir [13]. Ayrıca kooperatifler bünyesindeki işletmelerde bu oranların, büyük işletmelere göre daha yüksek olduğu (% 61.3 inek, % 26.7 meme lobu) da bildirilmiştir [23]. Bu durum; bölgenin sıcaklık ve nem oranının yüksek olmasından kaynaklanabildiği gibi, sağım ve altlık yönetiminin de direkt olarak etkilenmektedir [28].

Somatik hücreler meme dokusundan süte karşı epitel hücreleri ve yangı veya travma durumlarında kandan meme bezine geçen lökositlerden oluşmaktadır. Süt somatik hücrelerinin %75’ini lökositler (lenfosit, nötrofil ve makrofaj) %25’ini de epitel hücreleri oluşturur [19]. Meme dokusu enfeksiyonlarında sütteki lökosit ve epitel hücre sayıları artar [4]. Sağlıklı meme somatik hücre sayısı 100.000 hücre/ml’den az kabul edilirken [18], meme içi enfeksiyon geliştiğinde enfeksiyona karşı artan immün yanıtı paralel olarak lökosit sayısı (özellikle nötrofiller) önemli ölçüde artar. Bu sayının, California Mastitis Test (CMT) şüpheli olanlarda 150.000-500.000, CMT (+) olanlarda 400.000-1.500.000, CMT (++) olanlarda 800.000-5.000.000 ve CMT (+++) olanlarda ise 5.000.000’den fazla sayıda olduğu bildirilmektedir [1, 4, 5].

Yangı sırasında lökositlerde meydana gelen artış, mikroorganizmalara karşı vücudun savunma sistemlerinden birini oluşturmakta ve serbest radikal üretimini artırmaktadır. Serbest radikal eşlenmiş elektron taşıyan atom veya atom gruplarıdır. Bu moleküllerin artması sonucu meydana gelen oksidatif hasara bağlı olarak, membran bütünlüğünün bozulduğu, DNA hasarlarının olduğu proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının değiştiği bildirilmektedir [16]. Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada antioksidan olarak ifade edilen koruyucu mekanizmalar vardır. Bu koruyucu mekanizmaların bir kısmı serbest radikal oluşumunu önlerken, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemektedir. Artan serbest radikaller ve mevcut antioksidan moleküller arasındaki dengesizlik

oksidatif strese sebep olmaktadır [11]. Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma sistemlerini kullanırlar. Bunlar başlıca; superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi enzimatik ve glutatyon, α -tokoferol, karotenoidler ve Vitamin C (Vit C) gibi enzimatik olmayan moleküllerdir [11, 20]. *Eschericia coli* ile deneysel olarak enfekte edilen Holstein ineklerde 24 saat sonra alınan süt örneklerinde Vit C düzeylerinin mastitis derecesinin artması ile birlikte önemli düzeyde düştüğü bildirilmiştir [25]. Develerde de mastitisli sütlerdeki Vit C düzeyleri sağlıklılara göre daha düşük olarak belirlenmiştir [12]. Yapılan araştırmalarda; antioksidanlar düzeyinde meydana gelen azalmanın mastitis riskini arttırabileceği ve antioksidan takviyesinin ise bunun önlenmesinde etkili olabileceği belirtilmektedir [21, 22].

Subklinik mastitis oluşumunda rol oynayan patojenler kontagiyöz (*S. aureus*, *S. agalactia* ve *S. bovis*) ve çevresel (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. uberis*, *S. chromogenes* ve diğer koagulaz negatif stafilkoklar) olarak sınıflandırılmaktadır. Son yıllarda dünyada subklinik mastitis etkenleri arasında koagulaz negatif stafilkoklar (KNS) ilgi çekmektedir. KNS’ler subklinik mastitise neden olduğundan son yıllarda birçok ülkede subklinik mastitisin önemli etkenlerinden biri olarak kabul edilmektedir [2].

Sunulan çalışmada farklı derecelerde subklinik mastitisli sütlerde (yağı ve hücreleri alınmış) ve hücrelerinde Vit C düzeylerinin belirlenmesi, Vit C ve somatik hücre sayısı arasındaki olası korelasyonun incelenmesi amaçlandı. Ayrıca mastitis etkenlerinin tespiti yapılarak patojenler ile Vit C düzeyleri arasındaki bağıntı incelendi.

Materyal ve Metod

Materyal

Laktasyonun aynı döneminde olan 4-5 yaş aralığındaki Holstein ırkı inekler çalışmanın hayvan materyalini oluşturdu. Meme başı temizlenip %70’lik alkol ile silindikten sonra ilk sıkım süt atılarak her bir meme lobundan 45-50’şer ml süt örnekleri alındı. İneklere her bir meme lobundan alınan süt örnekleri California Mastitis Test (CMT) ile muayene edilerek, CMT reaksiyonlarına (- negatif, +/- şüpheli, +1, +2, +3) göre gruplandırıldı.

Metot

Somatik Hücre Sayımı

Çalışmada subjektif [9] bir metod olan CMT skorlamasına göre alınan süt örneklerinde somatik hücre sayımı yapıldı ve yeniden yapılan skorlamada örnekler, kontrol (1-87 x 1000 hücre), mastitli 1. grup (154-380 x 1000 hücre), 2. grup (418-812 x 1000 hücre), 3. grup (914-1928 x 1000 hücre) ve 4. grup (2614-8050 x 1000 hücre) olarak gruplandırıldı (n=12). Alınan süt örneklerine, hücreleri koruma amaçlı, 0.05 ml %24 mg sodyum azid (Sigma-Aldrich) eklendi. Somatik hücre sayımı yarı-otomatik bir cihaz olan ve flowsitometri prensibi ile çalışan Bentley BactoCount IBCm (Bentley Instruments Inc., Chaska, MN, USA) ile gerçekleştirildi.

Biyokimyasal Analizler

Biyokimya laboratuvarına getirilen sütler, süt serumu ve süt hücrelerinin ayırılmasında için 600 g'de 4°C'de 10 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstteki yağ tabakası koton bir aparat ile alınarak, yağı ve hücreleri uzaklaştırılan, süpernatant (süt serumu) eppendorf tüplere aktarıldı, Vit C analizi için, üzerine %6'lık Triklor asetik asit (TCA, 1 birim serum+2 birim TCA) eklenerek analizler için -86°C soğutucuda saklandı. Santrifüj sonrası dipteki pellet, soğuk PBS ile 2 defa yıkandı. Her yıkama sonrasında 600 g'de 4°C'de 10 dk santrifüj edildi. Yıkamış hücre pelleti PBS ile 2 ml'ye tamamlandı. Hücreler 10 sn süreli, 30 sn soğutmalı, 5 tekrarlı olacak şekilde sonike edildi (Bandelin, Sonopuls, HD 2070, Almanya). Sonikasyon sonrasında homojenatlar 13000 g'de 4°C'de 15 dk santrifüj edildi. Hücre homojenizasyon süpernatantları, üzerine %6'lık triklor asetik asit (TCA, 1 birim serum+2 birim TCA) eklenerek, analizler için -86°C soğutucuda saklandı. Analizden hemen önce süt serumu ve hücre homojenizasyon süpernatantları çözündürüldü ve 1000 g'de 4°C'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatantlarda Vit C analizi yapıldı.

Vitamin C Analizi

Süt serumu ve hücre süpernatantlarında Vit C analizi Haag [5]'in metoduna göre yapıldı: Askorbik asit hafif oksitleyici etkenlerle dehidro askorbikasite dönüşür, dehidro askorbik asit hafif asit solüsyonlarda yavaş bir şekilde diketogulonikasite dönüşür.

Dehidro askorbik asit ve diketogulonik asit, 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile reaksiyona girerek bis 2,4-dinitrofenilhidrazonu oluşturur. Sonuçlar µg/ml ve µg/10⁶ hücre olarak verildi.

Mikrobiyolojik Muayene

Laboratuvara getirilen süt numuneleri öncelikle bakteriyoskopi amacıyla Gram boyama yapılarak mikroskopta incelendi ve bakteriyoskopik bulgular kayıt edildi. Antibiyotik bulunmayan steril plastik numune kaplarına alınan süt numunelerinin, Kanlı Agar, MacConkey Agar'a ekimleri yapıldı ve 37°C'de 2-3 gün süre ile aerobik ortamda inkübe edildikten sonra üreyen koloniler bakteriyolojik testler kullanılarak tanıya edildi. Ayrıca tüm bu numunelerden Sabouraud Dextrose Agar'a ekimler yapılarak 25°C'de 7-10 gün süreyle aerobik ortamda inkübe edildikten sonra *Aspergillus spp.*, ve *Candida spp.* yönünden cins düzeyinde identifikasyonları araştırıldı [15, 17].

İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen değerler SPSS 15.0 programında ANOVA ile değerlendirilerek, gruplararası farklılıklar Duncan testi ile ortaya konuldu. Korelasyon analizleri için Pearson Korelasyon uygulandı ve p<0.05 önem düzeyinde önemli kabul edildi.

Bulgular

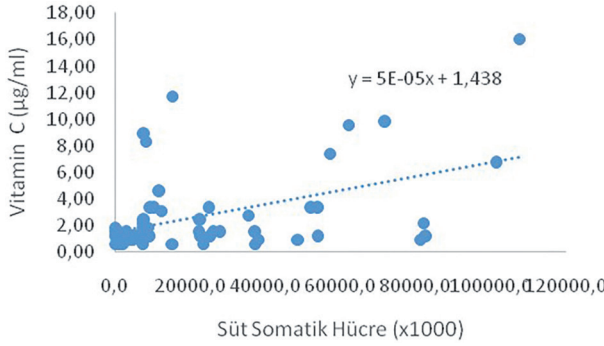
Alınan süt örneklerinden hazırlanan hücre homojenatı süpernatantlarının 1 ml'sindeki somatik hücre sayıları ile Vitamin C (µg/ml ve µg/10⁶ hücre) düzeyleri Tablo 1'de sunuldu.

Tablo 1. Sağlıklı ve mastitisli sütlerde hücre sayıları ve Vitamin C düzeyleri (n=12, Ort±SH)

	1 ml hücre süpernatantındaki hücre sayısı x 1000	Vitamin C µg/ml	Vitamin C µg/10 ⁶ hücre
Kontrol	247-3153	1,18±0,12 ^a	2,47±0,75 ^a
1. grup	3751-7620	1,31±0,16 ^a	0,23±0,02 ^b
2. grup	7641-15484	4,10±1,05 ^b	0,41±0,11 ^b
3. grup	22155-43087	1,62±0,25 ^a	0,06±0,01 ^b
4. grup	35507-170560	5,23±1,37 ^b	0,07±0,02 ^b
p		*	*

* : p<0,001, a, b: Aynı sütündeki farklı harfler birbirinden istatistiksel açıdan farklıdır.

Süt hücre Vit C düzeyleri ile süt somatik hücre sayıları arasında pozitif bir korelasyon belirlendi ve Figür 1’de sunuldu.



Figür 1. Süt hücrelerinde Vitamin C düzeyleri ile somatik hücre sayıları arasındaki korelasyon ($r=0,469$, $p<0,001$ $n=60$)

Alınan süt örneklerinin 1 ml’sindeki somatik hücre sayıları ve süt serumundaki Vit C düzeyleri Tablo 2’de sunuldu.

Tablo 2. Sağlıklı ve mastitisli sütlerde Vitamin C düzeyleri ($n=12$, Ort±SH)

	1 ml süttteki hücre sayısı x 1000	Vitamin C µg/ml
Kontrol	1-87	23,78±0,55 ^{ab}
1. grup	154-380	26,53±0,74 ^a
2. grup	418-812	25,40±2,53 ^a
3. grup	914-1928	24,79±1,28 ^a
4. grup	2614-8050	19,89±2,04 ^b
p		**

* : $p<0,05$, a, b: Aynı sütündeki farklı harfler birbirinden istatistiki açıdan farklıdır.

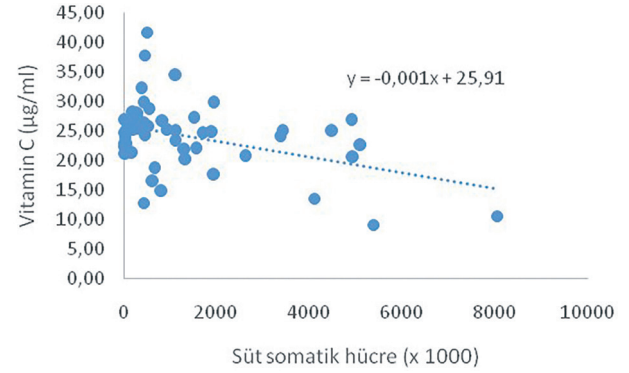
Tablo 3. Mastitisli sütlerden ($n=12$, toplam 48 adet süt) izole edilen patojenler

Patojenler	Sayı (%)
CNS (<i>Coagulase Negative Staphylococcus</i>)	20 (41,6)
<i>Streptococcus spp.</i>	2 (4,16)
<i>Bacillus spp.</i>	4 (8,32)
Maya	2 (4,16)
Miks Enfeksiyon	3 (6,25)
Etkenli	31 (64,58)
Etkensiz	17 (35,42)
Toplam mastitisli süt sayısı	48 (100)

KNS ve diğer patojenler arasında Vit C düzeyleri yönünden önemli bir farklılık belirlenmedi ($p>0,05$).

Mastitis 4. grup Vit C düzeyleri diğer mastitis gruplarına ($p<0,05$) ve kontrol grubuna ($p>0,05$) göre düşük olarak belirlendi.

Süt serumlarındaki Vit C düzeyleri ile süt somatik hücreleri arasında negatif bir korelasyon belirlendi ve Figür 2’de sunuldu.



Figür 2. Süt serumunda Vitamin C düzeyleri ile somatik hücre sayıları arasındaki korelasyon ($r=-0,420$, $p<0,01$ $n=60$)

Tartışma ve Sonuç

Mastitis süt sığırcılığının önemli problemlerinden birisini oluşturmakta ve etkilediği her bir meme lobunda süt üretimini baskılayarak ciddi ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Çalışmamızda süt hücrelerinin sonikasyonundan sonra elde edilen süpernatantta ve yağı ve hücreleri uzaklaştırılmış süt serumlarında Vit C düzeylerinin değişimi, Vit C ile somatik hücre sayıları arasındaki korelasyonlar belirlenmiştir. Sonuçta sağlıklı ve mastitisli sütlerin değerleri arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir.

Sağlıklı süt serumundan elde edilen Vit C düzeyleri sağlıklı inek sütlerinde bildirilen düzeyler ile uyum göstermiştir [8, -25]. Çalışmamızda mastitisli sütlerdeki Vit C düzeylerinin yalnızca 4. grupta grupta düştüğü belirlenmiştir. Weiss ve ark. [25] *Eschericia coli* ile deneysel olarak mastitis oluşturulan Holstein ırkı ineklerde 24 saat sonra alınan süt örneklerinde Vit C düzeylerinin mastitis derecesinin artması ile birlikte önemli düzeyde düştüğünü bildirmişlerdir. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalacia* ve *Echericia coli* ile mastitisli ineklerde kan serumu Vit C düzeylerinde de bir düşüş bildirilmiştir [10].

Somatik hücreler meme dokusundan süte karışan epitel hücreleri ve yangı veya travma durumlarında kandan meme bezine geçen lökositlerden oluşmaktadır. Süt somatik hücrelerinin %75'ini lökositler (lenfosit, nötrofil ve makrofaj) %25'ini de epitel hücreleri oluşturur [19]. Meme dokusunda enfeksiyon oluştuğunda sütteki lökosit ve epitel hücre sayıları artar [4]. Sağlıklı bir memede somatik hücre sayısı 200.000 hücre /ml'den az kabul edilirken [4, 18], meme içi bir enfeksiyon geliştiğinde enfeksiyona karşı artan immün yanıtı paralel olarak lökosit sayısı (özellikle nötrofiller) önemli ölçüde artar. Çalışmamızda süt hücrelerinde yapılan Vit C analizlerinde, µg/ml üzerinden değerlendirildiğinde özellikle 4. grupta yüksek Vit C düzeyleri belirlenmiştir. Somatik hücre sayısının çok fazla artması (4. grupta) ile nisbi bir Vit C artışı olduğu düşünülmektedir zira µg/106 hücre üzerinden değerlendirildiğinde, mastitis derecesi arttıkça Vit C düzeylerinde azalma görülmüştür ancak istatistiki fark sadece kontrol grubu ile gözlenmiştir. Yapılan literatür taramalarında sağlıklı ve mastitisli sütlerde somatik hücre Vit C düzeylerinin belirlendiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak Weiss ve Hogan [26] lipolisakkarit (LPS) uygulaması ile oluşturulan mastitiste, süt nötrofil hücrelerini izole ederek dondurma ve çözündürme yöntemi ile hücre lizisi sağlamış ve HPLC metodu ile Vit C düzeylerini belirlemişlerdir. Buna göre süt nötrofillerindeki Vit C düzeylerini 80-90 pmol/10⁶ hücre (yaklaşık 0,15-0,17 µg/106 hücre) olarak bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada Vit C düzeylerindeki farklılık metodolojinin farklı olmasının yanısıra hücre farklılığından da kaynaklanabilir zira elde edilen hücre pelleti tüm süt somatik hücreleri yanısıra mikroorganizma Vit C düzeylerini de içermektedir. LPS ile oluşturulan yangı sırasında süt nötrofillerindeki Vit C düzeyleri aynı hayvanlardaki kan nötrofillerinden 3 kat daha yüksek olarak belirlenmiştir [26]. İnsan nötrofilleri aktive edildiğinde nötrofillerin ortamdan Vit C alımı 10-30 kata kadar artmaktadır [24]. Vitamin C'nin özellikle lökositlerdeki düzeylerinin plazma düzeylerine göre oldukça yüksek olduğu da bildirilmiştir [7]. Vitamin C'nin nötrofillerce alımı, yangı sırasında hücre içinde meydana gelen oksidatif hasarın önlenmesi amacıyla olabilir [24]. Süt nötrofillerindeki Vit C düzeylerinin yüksekliği, meme yangısı sırasında sütteki nötrofillerin, kandakine göre daha fazla aktive olmasıyla ilgili olabilir [26].

Sunulan çalışmada hücre Vit C düzeyleri ve süt somatik hücre sayısı arasında pozitif bir korelasyon belirlenmiştir (p<0,001). Bu bulgular araştırmacıların bulguları ile uyumlu görülmektedir. Ayrıca süt serumu Vit C düzeyleri ile 1 ml sütteki somatik hücre sayısı arasında belirlenen negatif korelasyon da, Vit C'nin süt hücreleri tarafından ortamdan alındığını ve kullanıldığını gösterebilir. Başpınar ve ark. [3] in vitro kan lökositlerinin dış ortamdan Vit C alımının, dozun artışına bağlı olarak arttığını, ayrıca Vit C dozu yükseldikçe, aktive edilen lökositlerin, fagositik ve mikrobisidal aktivitelerinin arttığını bildirmişlerdir. Wiess ve Hogan [26] LSD ile oluşturulan mastitis modelinde dışarıdan Vit C takviyesinin süt hücrelerinde ve sütte Vit C düzeylerini etkilemediğini bildirmişlerdir. Diğer yandan E.coli ile oluşturulan mastitis olgusunda süt Vit C düzeylerinde düşüş bildirmişler ve bakteriyel ve bakteriyel olmayan mastitise memenin Vit C yanıtının farklı olduğunu düşünmüşlerdir [25].

Subklinik mastitis oluşumunda rol oynayan patojenler kontagiyöz (*S. aureus*, *S. agalactia* ve *S. bovis*) ve çevresel (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. uberis*, *S. chromogenes* ve diğer koagulaz negatif stafilkoklar) olarak sınıflandırılmaktadır [2]. Son yıllarda dünyada subklinik mastitis etkenleri arasında koagulaz negatif stafilkoklar (KNS) dikkat çekmektedir. *Stafilococcus aureus* gibi majör patojenlerden farklı olarak KNS'ler subklinik mastitise sebep olduğundan ayrıca antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiğinden son yıllarda birçok ülkede subklinik mastitisin önemli etkenlerinden biri olarak görülmektedir [14]. Subklinik mastitiste KNS'lerin diğer etkenlere göre daha baskın olduğu Yağcı [27] ile Türüt ve ark. [23] tarafından bildirilmiştir. Sunulan çalışmanın mikrobiyolojik sonuçları değerlendirildiğinde de KNS'lerin oranının (%41,6) diğer tüm patojenlere (%18,9) göre daha yüksek olduğu görülmüştür. KNS ve diğer patojenler arasında Vit C düzeyleri yönünden önemli bir farklılık belirlenmiştir.

Sonuç olarak subklinik mastitisin derecesi ile ilgili olarak somatik hücre sayısının arttığı, birim hücre başına düşen Vitamin C ve süt serumu Vit C düzeylerinin düştüğü belirlenmiş ve sütteki somatik hücre sayısı arttıkça hücrelerin Vit C ihtiyacının arttığı ve bu ihtiyacın süt serumundan hücre içine Vit C alımının artırılarak giderilmeye çalışıldığı düşünülmüştür.

Teşekkür

Sunulan çalışmada, Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunca (24.04.2014 tarih ve 2014-04/1 no'lu kararı) izin verilen ve Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen 12161 no'lu projenin artan numuneleri kullanılmıştır.

Kaynaklar

1. Alaçam E, (1988). Meme Hastalıkları, (in) Sığır Hastalıkları, E Alaçam, M Şahal. eds. Ankara, Medisan Yayınları, p. 389-425.
2. Albenzio M, Taibi L, Muscio A, Sevi A, (2002). Prevalence and etiology of subclinical mastitis in intensively anaged flocs and related changes in the yield and quality of ewe milk. *Small Rum Res.* 43: 219-226.
3. Başpınar N, Baş AL, Haliloğlu S, Elmas M, Yazar E (1998) The effects of intracellular Vitamin C concentrations on Bovine Neutrophils Functions In vitro, *Revue Med Vet.* 149:931-938
4. Baştan A, (2010). İneklerde Meme Sağlığı ve Sorunları. Ankara, Kardelen Ofset Matbaacılık, 1, p. 105-134.
5. Baştan A, Kaymaz M, Fındık M, Erünel N, (1997). İneklerde subklinik mastitislerin elektriksel iletkenlik, somatik hücre sayısı ve california mastitis test ile saptanması. *A.Ü. Vet. Fak Derg.* 44: 1-5.
6. Haag W, (1985). Zur methodik und praktischen Bedeutung der Vitamin C - Bestimmung bei im Rind in Vergangenheit und Gegenwart. Inaugural Dissertation. Justus Liebig Universität, Giessen.
7. Haliloğlu S, Başpınar N, Baş AL, Elmas M, (1999). Sığırlarda plazma, mononükleer ve polimorf nükleer lökosit vitamin c düzeyleri ile bazı biyokimyasal parametreler arasındaki ilişkiler. *Eurasian J Vet Sci.* 15: 83-88.
8. Hıdıroğlu M, Ivan M, Batra TR, (1995). Concentrations of Vitamin C in plasma and milk of dairy cattle. *Ann Zootech.* 44: 399-402.
9. Holtgrew-Bohling K, (2016). Large Animal Clinical Procedures for Veterinary Technicians. Third Edition, Elsevier Inc, Missouri, US. p:445.
10. Kleczkowski M, Klucinski W, Snaktur A, Sikora J, (2005). Concentration of ascorbic acid in the blood of cows with subclinical mastitis. *Pol J Vet Sci.* 8: 121-125.
11. Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E, Madsen FC, (1993). Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J Dairy Sci.* 76: 2812-2823.
12. Mohamed HE, Mousa HM and Beynen AC, (2005). Ascorbic acid concentrations in milk from Sudanese camels *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* 89: 35–37.
13. Mutluer B, (2001). Süt İnekçiliğinde Mastitis Sempozyumu, 04-05 Mayıs, Burdur. Akdeniz Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi. 2: 1.
14. Pyorala S and Taponen S, (2009). Coagulase-negative staphylococci - Emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology.* 134: 3-8.
15. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR, (1994). *Clinical Veterinary Microbiology.* Mosby-Year Book Europe Limited, Lynton House, London WC1H9LB, England. s: 209-236.
16. Ramos VA, Ramos PA, Dominguez MC, (2000). The role of oxidative stress in inflammation in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J Pediatr.* 76: 125-132.
17. Schultz R, Smith PJ, Hogan KL, Love JS, (2004). Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Veterinary Microbiology.* 102 : 33–42.
18. Sharma N, (2003). Epidemiological investigation on sub-clinical mastitis in dairy animals: Role of vitamin E and selenium supplementation on its control. *MVSc. Thesis, I.G.K.V.V., Raipur (C.G.) India.*
19. Sharma N, (2007). Alternative approach to control intramammary infection in dairy cows. A review. *Asian J Anim Vet Adv.* 2: 50-62.
20. Stahl W and Sies H, (1997). Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes,* 46: 14-18.
21. Şimşek H, Aksakal M, (2006). Subklinik mastitisli ineklerde E vitamininin plazma A vitamini, beta- karoten, glutatyon peroksidaz, redükte glutatyon ve süt A vitamini düzeylerine etkisi. *Fırat Üniv Sağlık Bil Derg.* 20: 199-203.
22. Tekeş Y, (2006). Streptozotosin ile diabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve E vitamininin dokularda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniv, Fen Bil Enst, Kahramanmaraş.
23. Turut N, Ergün Y, Doğruer G, Savaşan S, Yoldaş A, (2008). Türkiye'nin Güneyindeki Süt Sığırcılığı İşletmelerinde Subklinik Mastitisin Prevalansı, Etiyolojisi ve Etkenlerin Antibiyotik Duyarlılıkları. III. Veteriner Jinekoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Antalya: 18-19.
24. Wang Y, Russo TA, Kwon S, Chanock S, Rumsey SC, (1997). Ascorbate recycling in human neutrophils: induction by bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA,* 94:13816-13819.
25. Weiss WP, Hogan JS, and Smith KL, (2004). Changes in vitamin C concentrations in plasma and milk from dairy cows after an intramammary infusion of *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* 87:32-37.
26. Weiss and WP and Hogan JS, (2007). Effects of Dietary Vitamin C on Neutrophil Function and Responses to Intramammary Infusion of Lipopolysaccharide in Periparturient Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 90: 731–739.
27. Yağcı İP, (2008). Koyunlarda Subklinik Mastitis: Etiyoloji, Epidemiyoloji ve Tanı Yöntemleri. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* 14: 117-122.
28. Yang JN, Wei N and Wen LF, (2012). Month-wise prevalence of subclinical mastitis in dairy cows in guangdong province, China *Journal of Integrative Agriculture.* 11: 166-169.

Sığır ve Koyunlarda Eş Zamanlı Brusella ve Şap Aşısı Uygulamalarının Antikor Düzeylerine Etkisi

İbrahim Hancı¹, İ. Safa Gürcan², Ahmet Sönmez³

¹Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Şap Enstitüsü, Ankara

²Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyoistatistik ABD, Ankara

³TİGEM Altınova Tarım İşletmesi, Konya

Geliş Tarihi / Received: 09.02.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 30.05.2016

Özet: Buzağı ve kuzularda brusella ve şap aşılarının eş zamanlı, farklı noktalardan uygulanması ile farklı zamanlarda uygulanması arasında oluşan antikor titrelerinin karşılaştırmalı olarak araştırılması amaçlanmıştır. Parenteral brusella ve şap aşısı 23 adet buzağı ve 105 adet kuzuda çalışılmış ve 12 ay süre ile antikor titreleri izlenmiştir. Konjunktival brusella ve şap aşısı 91 adet buzağıda çalışılmış ve 2 ay süre ile antikor titreleri takip edilmiştir. Aşılama grupları, her çalışma grubunda hayvanlar üçe bölünerek elde edilmiş ve bu gruplara tek başına şap aşısı, tek başına brusella aşısı ve eş zamanlı 2 aşı uygulaması gerçekleştirilmiştir. Aşılamalardan önce ve aşılama sonrasında 14, 28, 60, 90, 180 ve 360. günlerde kan numunesi alınmıştır. Brusella antikor titresini serum aglütinasyon testi ile şap antikor titresini serum nötralizasyon testi ile saptanmıştır. Sonuç olarak brusella ve şap aşılarının simultane olarak uygulanmasında şap aşısı antikor titrelerinde düşme görülmezken brusella antikor titrelerinde genel olarak artış tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Antikor, aşı, beraber, brusella, şap hastalığı

The Effect of Simultaneous Application of Brucella and FMD Vaccines on Antibody Level in Cattle and Sheep

Abstract: The aim of this research was to investigate the antibody titers of brucellosis, foot and mouth disease (FMD) vaccines and compare differences of application site and application of different times in calves and lambs. Twenty three calves and 105 lambs were vaccinated by brucellosis and FMD vaccines and antibody titer was followed during 12 months. was 91 calves vaccinated by conjunctival brucellosis and FMD vaccines were examined antibody titers for 2 months. In vaccinated groups each group animals were divided 3 parts. First one was for FMD vaccination, second one was for brucellosis vaccination third one was for both vaccination. The blood samples were taken before vaccination and after vaccination in 14, 28, 60, 90, 180, 360 days. The antibody titers to brucellosis vaccine was determined by plate agglutination test. The antibody titers to FMD was determined with Serum Neutralization Test. Finally It was concluded that FMD antibody titers was not affected by simultaneous vaccination of Brucellosis and FMD.

Key words: Antibody, brucellosis, FMD, simultaneous, vaccine

Giriş

Şap hastalığı Picornaviridae familyasına bağlı *Aphthovirus genusuna* ait bir virus tarafından meydana getirilmektedir [12,15]. Virus zarsız olup tek zincirli RNA taşımaktadır [7,12,15].

Brusella, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı (FAO), Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi (OIE) tarafından dünyada en yaygın zoonoz olarak kabul edilmektedir.

Brucellosis, campylobacteriosis, salmonellosis ve chlamydiosis koyunlarda en çok tespit edilen atık etkenlerindedir [14,20]. 2003-2007 yılları arasında Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsüne gönderilen 463 adet aborte koyun fetüsünden en fazla oranda (% 30,02) Brucella izole ve identifiye edilmiştir [20]. Brusella insanlarda klasik olarak titreme ile yükselen ateş, aşırı terleme, baş ağrısı, halsizlik, bel ve yaygın vücut ağrıları ile seyreden kronik zoonotik infeksiyonlara neden olmaktadır [3,14].

*Çalışma aynı zamanda TAGEM/HS/11/01/02/181 nolu TAGEM Projesidir.

**Çalışma için Etik Kurul onayı alınmıştır.

Şap aşısı inaktif, adjuvantlı bir aşı iken brusella aşısı attenüe bir aşıdır. Ülkemizde 2012 Ocak ayı itibari ile sığırlara konjektival S19, koyunlara konjektival Rev.1 aşısı uygulanmaktadır.

Aşıların beraber uygulanmasında 3 yol kullanılmaktadır. Aynı anda farklı noktalardan simultane aşılama şeklinde uygulanmaktadır. Ya da kombine aşılama ismi ile nitelendirilen ya 2 aşının uygulamadan hemen önce birleştirilip tek enjeksiyonla verilmesi şeklinde ya da üretim esnasında 2 farklı aşının birleştirilerek tek şişeye konulması şeklinde olmaktadır.

Ülkemizde halen koyun-keçi vebası aşısı ve şap aşısı simultane olarak uygulanmaktadır.

1970 yılından sonra Fransa'da şap ve inaktif brusella aşıları geniş çapta kombine aşı şeklinde uygulanmıştır. Çalışmalarda beklenen titreler elde edilmiştir [9].

Garcia-Carillo ve ark. (1978), Kathuria ve ark. (1976) simultane aşılama canlı attenüe aşıların şap aşısına olan immun yanıtı azalttığını ileri sürmüşlerdir. Daha sonra Ortadoğu ve Afrika'da sığır vebasının tekrar görülmesi ile Hedger ve arkadaşları 1986 yılında Umman Sultanlığı'nda şap ve sığır vebası için simultane aşılama çalışması yapmıştır. Hedger ve arkadaşları hayvanları 3'e ayrılıp sadece şap, sadece sığır vebası ve şap+sığır vebası simultane şekilde uygulamıştır. Aşılama yapıldığı gün, 21. gün ve 42. günde kan numuneleri alınıp her iki titre tayini için nötralizasyon testi uygulanmıştır. Gruplar arası fark istatistiki çalışmalar yapılarak ortaya konulmuştur. Hedger ve arkadaşları 1986 yılında simultane aşılamanın titre kaybı olmaksızın güvenle kullanılacağı sonucunu bulmuşlardır. Afrika ve Ortadoğuda inaktif şap aşısı ve attenüe sığır vebası aşısı simultane olarak ülke hayvanlarına uygulanmıştır.

Mastan ve ark. [16] brusella ve şap hastalığına karşı kombine aşılamanın sonuçlarını görmek için bir çalışma yapmışlardır. Her grubun 5 adet kobaydan oluştuğu 8 grup oluşturmuşlardır. Gruplar; 1- Sadece canlı brusella S19 aşısı 2- Sadece şap aşısı 3- Canlı brusella S19 ve şap aşılması (simultane) 4- Canlı brusella S19 ve şap aşılması (kombine) 5- Sadece inaktif brusella S19 aşısı 6- İnaktif brusella S19 ve şap aşılması (simultane) 7- İnaktif brusella S19 ve şap aşılması (kombine) 8- Kontrol olarak

dizayn edilmiştir. Şap aşısı olarak formolle inaktive, alüminyum hidrokside adsorbe, saponinli trivalan aşı kullanılmıştır. Şap virusunun inaktivasyonunda kullanılan formolün canlı brusella aşısı üzerinde zararlı etkisi olup olmadığı ortaya konulmaya çalışılmıştır. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* deneylerde formolün kombine aşı içerisindeki brusella S19 üzerinde hiçbir zararlı etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Kobaylara aşılama sonrası epruvasyon çalışması uygulanmıştır. Canlı brusella S19 ve şap aşıları gerek simultane gerekse kombine olarak uygulandığında tek yapılan canlı brusella aşılmasına göre daha iyi epruvasyon sonuçları vermiştir. Canlı brusella S19 ile kombine şap aşılarının inaktif brusella S19 ile kombine şap aşılarına göre titre değerleri ve epruvasyon değerleri daha yüksek çıkmıştır. Bu durum canlı aşı ile inaktif aşığı kombine etmenin iki inaktif aşığı kombine etmeye göre daha iyi titre vereceği görüşüne katkı sunmuştur. Bu çalışmada dişi ve erkek kobaylar arasında herhangi bir fark tespit edilmemiştir.

İlk simultane aşılama çalışmalarından birini Castaneda ve ark. [6] yapmıştır. Şap aşısı ve canlı vesiculer stomatitis aşısı 4-6 aylık buzağılara simultane şekilde boynun iki yanından yapılmıştır. İlk aşılama 3-4 ay sonra aşılama tekrarlanmıştır. Sonuç olarak aşılar ayrı ayrı yapıldıklarında oluşan antikor titresini daha yüksek olmamıştır.

Ivanyi ve ark. [11] attenüe viral diare aşısı ile inaktif şap aşısını simultane uygulamışlardır. 18 sığır üç gruba ayrılarak bir gruba iki aşı beraber, bir gruba sadece attenüe viral diare aşısı, bir gruba sadece şap aşısı yapılmıştır. On haftalık sürede kan numunesi alınıp nötralizasyon testi yapılmış ve epruvasyon uygulanmıştır. Hem nötralizasyonda hem epruvasyon çalışmasında simultane aşılama yapılan grubun diğer gruplardan farkı bulunamamıştır.

Hedger ve ark. [10] 3 gruba ayrılan toplam 118 sığır üzerinde simultane aşılama çalışması yapmıştır. Bir gruba trivalan şap aşısı yapılmış, bir gruba attenüe doku kültürü sığır vebası aşısı yapılmış ve diğer gruba da her iki aşı simultane bir şekilde boynun farklı bölgelerinden yapılmıştır. Serolojik yanıt, virüs nötralizasyon testi ile gözlenmiştir. Simultane şekilde yapılan aşılama ayrı ayrı yapılanlara göre serolojik cevapta önemli derecede farklılık tespit edilmemiştir.

Domuz yavrularına De Clercq ve ark. [8] inaktif, adjuvantlı şap ve attenüe klasik domuz ateşi aşılarını simultane uygulamışlardır. Klasik domuz ateşi ile beraber şap aşısı yapılan domuzlarda yalnız şap aşısı yapılanlara göre antikor cevabında bir değişiklik olmaz iken simultane yapılan aşılama klasik domuz ateşine karşı oluşan antikor titresi tek aşı yapılan gruba göre daha yüksek elde edilmiştir.

Farklı bir çalışmayı ise Srinivas ve ark. [17] şap ve sığır vebası aşısı saha koşulları altında simultane şekilde yapılarak aşı hayvanlarda oluşan antikor üretiminin gelişmesinde interferens etkinin olup olmadığı araştırmıştır. Sonuç olarak aşılar yalnız veya simultane yapıldıklarında herhangi bir yan etki olmaksızın aynı serolojik cevabı oluşturmuştur.

Çalışmanın amacı 2 aşının aynı anda farklı noktalardan uygulanması ile oluşan antikor titresinin izlenerek, simultane aşılama zemini oluşturulmasıdır.

Materyal ve Metot

Aşı

Aşılamalarda Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü tarafından üretilen *Brucella abortus* S19 genç aşısı (buzağı için, deri altı ve konjuktival), *Brucella melitensis* Rev.1 genç aşısı (kuzu için, deri altı ve konjuktival) ve Şap Enstitüsü tarafından üretilen şap aşısı (sığır ve koyunlar için) kullanılmıştır. Şap aşısı olarak Turvac Oil Bivalan, 10/11 seri nolu aşı kullanılmıştır. *Brucella abortus* S19 aşısı olarak 2009/6 seri nolu aşı ve *Brucella melitensis* Rev.1 aşısı olarak 2010/1 seri nolu aşı kullanılmıştır.

Antijen

Brusella antikor titrelerini belirlemek için ticari olarak Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü tarafından üretilen *Brucella* tüp aglütinasyon antijeni; şap virus antikorları için BHK-21 An31 hücresi ve 100 TCID50 virus kullanılmıştır.

Hayvanlar

Parenteral brusella ve şap aşısı 23 buzağı ve 105 kuzuya uygulanmıştır. Konjuktival brusella ve şap aşılması 91 adet buzağıya uygulanmıştır. Parenteral çalışmaya alınan buzağılar 90-117 günlük, kuzular 3-6 aylıktır. Konjuktival çalışmaya alınan buzağılar 95-178 günlüktür. Çalışmada Montofon ırkı buzağı

ve Merinos ırkı kuzular kullanılmıştır. Gruplar oluşturulurken yaşlara göre dağılım yapılmıştır. Hayvanlar arasında bakım ve beslenme açısından fark bulunmamaktadır. Çalışmalar Konya'nın Kadınhanı İlçesi'nde bulunan TİGEM'e ait Altınova Tarım İşletmesi'nde yapılmıştır.

Serum

Aşılamalardan önce ve aşılama sonrasında 14, 28, 60, 90, 180 ve 360. günlerde alınan kan serumlarının antikor titre düzeyleri belirlenmiştir.

Deneme ve kontrol gruplarının seçimi

105 kuzu, 23 buzağı ve 91 buzağıdan oluşan 3 grup halinde çalışmalar yapılmıştır. Belirli günlerde alınan kan numunelerinde antikor titre tayini için testler yapılmıştır. Şap antikor titresi için serum nötralizasyon testi, brusella antikor titresi için serum aglütinasyon testi uygulanmıştır.

Deneme grupları

- 1 Nolu deneme grubu: buzağı, parenteral brusella ve şap aşısı uygulaması
- 2 Nolu deneme grubu: buzağı, konjuktival brusella ve şap aşısı uygulaması
- 3 Nolu deneme grubu: kuzu, parenteral brusella ve şap aşısı uygulaması

Kontrol grupları

- 1 Nolu kontrol grubu: buzağı, parenteral brusella aşısı uygulaması
- 2 Nolu kontrol grubu: buzağı, konjuktival brusella aşısı uygulaması
- 3 Nolu kontrol grubu: buzağı, tek doz şap aşısı uygulaması
- 4 Nolu kontrol grubu: buzağı, 2 doz şap aşısı uygulaması
- 5 Nolu kontrol grubu: kuzu, parenteral brusella aşısı uygulaması
- 6 Nolu kontrol grubu: kuzu, tek doz şap aşısı uygulaması
- 7 Nolu kontrol grubu: kuzu, 2 doz şap aşısı uygulaması
- 8 Nolu kontrol grubu: kuzu, 3 doz şap aşısı uygulaması

Şap aşısı prospektüsüne göre ilk aşılamaı takiben 1 ay sonra ikinci doz aşı uygulanmıştır. İkinci aşılamadan 5 ay sonra 3. doz aşı uygulanmıştır.

Aşı ve aşılama takvimi

Tablo1. Aşılama takvimi

	Aşılamalar					
	0. Gün	28. Gün	2. Ay	3. Ay	6. Ay	12. Ay
Şap+Br.	Ş + B	Ş			Ş	Ş
Şap	Ş	Ş	B		Ş	Ş
Br.	B	Ş	Ş		Ş	Ş

Brucella abortus S19 genç aşısı, dişi danalara boyundan deri altı, *Brucella melitensis* Rev.1 genç aşısı dişi ve erkek kuzulara scapulanın gerisinden deri altı tatbik edilmiştir. Konjunktival aşı konjunktiva ya da konjunktival keseye damlatılmıştır. Bivalan yağ adjuvantlı şap aşısı ise deri altı yolla tatbik edilmiştir. Sıfırinci gün ve aşılamalardan sonraki antikor titresinin artışını gözlemlemek için 14, 28, 60, 90, 180 ve 360. günlerde kan alınmıştır. Bağışıklık brusella aşısında aşılamadan 21 gün sonra, şap aşısında aşılamadan 28 gün sonra şekillenmektedir.

Serolojik testler

Serum aglütinasyon testi

Brusella antikor titre tayini için kullanılmıştır. Doksan altı gözlü U tabanlı plate'in serum dilüsyonu için 6 gözü kullanılmıştır. Reaksiyonların okunmasında göz aldanmalarını önlemek ve hataya düşmek için her testte bir kontrolle çalışılmıştır (Aslantaş, 2006).

Serum nötralizasyon testi

Şap antikor titre tayini için kullanılmıştır. 96 gözlü plate'lerde BHK-21 An31 hücresi %70-80 monolayer hale geldiğinde kullanılmıştır. Virusların 0,1 100 TCID50 olacak şekilde dilüsyonları yapılarak test protokolüne uygun şekilde titre tayini yapılmıştır (Şap Enstitüsü Protokolü).

İstatistik sonuçları

Önemlilik testlerine geçmeden önce veri setleri parametrik test varsayımlarından olan normallik ve varyansların homojenliği yönünden sırasıyla Shapiro Wilk ve Levene testi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ayrı ayrı her bir zamanda alınan ölçümler için gruplar arası farkın anlamlılığı parametrik test varsayımlarını sağlayan değişkenler için Student T testi ile sağlamayanlar için ise Mann Whitney U testi ile incelenmiştir. Sonuçlar minimum %5 hata payı ile değerlendirilmiştir. SPSS14.1 paket programından yararlanılmıştır.

Bulgular

Serum nötralizasyon testi sonuçları

Nötralizasyon testi ile şap antikor titresini belirlenmiştir. 1/22 ve üzeri titreye sahip hayvanlar hastalığa karşı bağışık kabul edilmektedir. Buzağılarda ve kuzularda 1/4 ve >1/44 arasında değişen maternal antikor titreleri bulunmaktadır. Gruplandırılmalar yaş göz önüne alınarak yapıldığından maternal antikorlu hayvanlar gruplara genelde homojen şekilde dağılım göstermiştir.

Tablo 2. Parenteral brusella ve şap aşısı uygulanan buzağılarda O tipi şap antikorlarının titre dağılımı

		<1/8	1/8	1/11	1/16	1/22	1/32	1/44	1/64	1/96	1/128	1/192	1/256	1/362	1/512	>1/512	n	
Şap O tipi antikor	14. Gün	Ş+B	1		2	1	1	2	1								8	
		Ş	1	1	4	1	1										8	
	28. Gün	Ş+B			1		1	1	3	1	1							8
		Ş	1	1	1		1	3		1								8
	2. Ay	Ş+B				1	1		1	2		2						7
		Ş			1			2	1	3	1							8
	3. Ay	Ş+B					1		2	1	1			1	1			7
		Ş				1		3	2	1		1						8
	6. Ay	Ş+B		3	2	1	1											7
		Ş	2	1	3				1		1							8

Açıklama: Nötralizasyon testinde 1/22 ve üzeri titreye sahip hayvanların hastalığa karşı korunduğu göz önüne alındığında 14. gün sonuçlarına göre simultane aşılama buzağuların 5/8'i bağışık iken sadece şap aşılması yapılan grupta buzağuların 2/8'i bağışıktır. 28. günde simultane grup 7/8 oranında bağışık iken sadece şap aşılması yapılan grup 5/8 oranında bağışıktır. 2. ayda simultane grup 6/7, şap grubu 7/8 oranında bağışık, 3. ayda simultane grup 7/7, şap grubu 7/8 oranında bağışık, 6. ayda simul-

tane grup 1/7, şap grubu 2/8 oranında bağışıktır. 6 ayda antikor titrelerindeki düşmeler O tipi virüs yapısından kaynaklanmakta olup genel bir durum olarak değerlendirilmektedir. Gruplardaki hayvanlarda korumayı sağlayan en düşük titre baz alınarak yapılan karşılaştırmalarda simultane grubun daha iyi titre verdiği sonucuna ulaşılmaktadır. İstatistiki olarak yapılan karşılaştırmalarda eş zamanlı aşılama yapılan gruptaki buzağuların O tipi antikor titresini ile yalnız şap aşılması yapılan grup arasında istatistiki olarak fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 3. Parenteral brusella ve şap aşısı uygulanan buzağularda A tipi şap antikorlarının titre dağılımı

		<1/8	1/8	1/11	1/16	1/22	1/32	1/44	1/64	1/96	1/128	1/192	1/256	1/362	1/512	>1/512	n		
Şap A tipi antikor	14. Gün	Ş+B		3	2	2		1										8	
		Ş		2	2	3	1												8
	28. Gün	Ş+B		1		1	4	1	1										8
		Ş		1	2	1	2	1	1										8
	2. Ay	Ş+B									1		1		1	3	1		7
		Ş										1			3	4			8
	3. Ay	Ş+B								2	2	1			1	1			7
		Ş					1		2		1	3						1	8
	6. Ay	Ş+B				1	2	1	1		1		1						7
		Ş						1	3		1	1	2						8

Açıklama: 14. gün sonuçlarına göre simultane aşılama buzağuların 3/8'i bağışık iken sadece şap aşılama buzağuların 4/8'i bağışıktır. 28. günde simultane grup 6/8 oranında bağışık iken, sadece şap aşılması yapılan grup 4/8 oranında bağışıktır. 2. ve 3. ayda simultane grup 7/7, şap grubu 8/8 oranında bağışık, 6. ayda simultane grup 6/7, şap grubu 8/8 oranında bağışıktır. Gruplardaki hayvanlarda

korumayı sağlayan en düşük titre baz alınarak yapılan karşılaştırmalarda grupların birbiri ile uyumlu sonuç gösterdiği düşünülmektedir. İstatistiki olarak yapılan karşılaştırmalarda eş zamanlı aşılama yapılan gruptaki hayvanlar ile yalnız şap aşılması yapılan grup arasında A tipi antikor titresini açısından istatistiki olarak fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4. Parenteral brusella ve şap aşısı uygulanan kuzularda O tipi şap antikorlarının titre dağılımı

		<1/8	1/8	1/11	1/16	1/22	1/32	1/44	1/64	1/96	1/128	1/192	1/256	1/362	1/512	>1/512	n		
Şap O tipi antikor	14. Gün	Ş+B	5	1		1	3	9	5	7	1	3						35	
		Ş		2	2	5	6	4	3	7	2	2	2						35
	28. Gün	Ş+B	6	2	4	3	4	6	2	8									35
		Ş	3	1	4	4	8	4	2	6	2	1							35
	2. Ay	Ş+B	1	5	6	4	5	3	4	4	2	1							35
		Ş		2	2		4	8	4	6	3	3	2						34
	3. Ay	Ş+B	3		3	3	6	5	3	2	4	2	1	3					35
		Ş	1	1	1	2	3	2	4	5	6	5	2		2				34
	6. Ay	Ş+B	5	1	2	6	3	4	4	2	2	1	2						32
		Ş	3	1	4	3	5	2	3	5	1	3	1	1					32

Açıklama: 14. gün sonuçlarına göre simultane aşılama kuzular 28/35 oranında bağışık iken sadece şap aşılama buzağuların 26/35 oranında bağışıktır. 28. günde simultane grup 20/35 oranında bağışık iken, sadece şap aşılması yapılan grup 23/35 oranında bağışıktır. 2. ayda simultane grup 19/35, şap grubu 30/34 oranında bağışık, 3. ayda simultane grup 26/35, şap grubu 29/34 oranında bağışık, 6. ayda simultane grup 18/32, şap grubu 21/32 oranında bağışıktır. Gruplardaki hayvanlarda korumayı sağlayan en düşük titre baz alınarak yapılan karşılaştırmalarda genel olarak şap grubunun titrelerinin yüksek olduğu görülmektedir. Bunun

sebebi olarak simultane grupta maternal antikor gösteren hayvan 1/35 oranında iken şap grubunda 32/35 olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmadaki kuzuları yetiştiren işletme kayıtlarında kuzuların doğum tarihi bulunmadığından gruplandırılmada yaş esas alınamamıştır. Bu sebeple şap grubuna maternal antikor yüksek kuzular istegimiz dışında denk gelmiştir. 2. ayda eş zamanlı grubun O tipi antikor titresini yalnız şap aşılması yapılan grubun antikor titresinden istatistiki olarak düşük çıkmıştır ($p<0.05$). Bu durumda maternal antikor sebebi ile kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tablo 5. Parenteral brusella ve şap aşısı uygulanan kuzularda A tipi şap antikorlarının titre dağılımı

		<1/8	1/8	1/11	1/16	1/22	1/32	1/44	1/64	1/96	1/128	1/192	1/256	1/362	1/512	>1/512	n	
Şap A tipi antikor	14. Gün	Ş+B	1		1	3	5	6	6	5	4	2	1				35	
		Ş	1	1	1	3	5	5	2	9	3	2	2				35	
	28. Gün	Ş+B	2	3		2	5	8	6	4	5						35	
		Ş	1	4	3	1	3	2	12	2	6		1				35	
	2. Ay	Ş+B						2	2		2	3	4	6	9	4	3	35
		Ş						1		2		2	5	6	7	9	2	34
	3. Ay	Ş+B		1		1	5	1	3	5	3	4	3	3	4	1	1	35
		Ş				1	1	1	6	6	6	3	1	4	1	4		34
	6. Ay	Ş+B	1		2		3	2	4	7	4	2	2	3	1		1	32
		Ş				2	1	1	4	3	6	4	7	2	1		1	32

Açıklama: 14. gün sonuçlarına göre simultane aşılama kuzuların 32/35'i bağışık iken sadece şap aşılması yapılan grupta kuzuların 31/35'i bağışıktır. Bu şekilde 28. günde simultane grup 28/35 oranında bağışık iken, sadece şap aşılması yapılan grup 26/35 oranında bağışıktır. 2. ayda simultane grup 35/35, şap grubu 34/34 oranında bağışık, 3. ayda simultane grup 33/35, şap grubu 33/34 oranında bağışık, 6. ayda simultane grup 29/32, şap grubu

30/32 oranında bağışıktır. Gruplardaki hayvanlarda korumayı sağlayan en düşük titre baz alınarak yapılan karşılaştırmalarda genel olarak birbirine yakın koruma düzeylerinin sağlandığı görülmektedir. İstatistiki olarak yapılan karşılaştırmalarda eş zamanlı aşılama yapılan gruptaki hayvanlar ile yalnız şap aşılması yapılan grup arasında A tipi antikor titresini açısından istatistiki olarak fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 6. Konjunktival brusella ve şap aşısı uygulanan buzağularda O tipi şap antikorlarının titre dağılımı

		<1/8	1/8	1/11	1/16	1/22	1/32	1/44	1/64	1/96	1/128	1/192	1/256	1/362	1/512	>1/512	n	
Şap O tipi antikor	14. Gün	Ş+B				1	1	2	3	1	3	4	5	3		8	31	
		Ş				1		1	1	2	2	3	3	4		12	29	
	28. Gün	Ş+B	4	3	5	6	2	3	1	3	2	1					30	
		Ş	7	3	3	4	3	2	5	1	1						29	
	2. Ay	Ş+B						1	2	3	2	9	5	5	1		2	30
		Ş				1	1	1	3	2	3	2	4	5			6	28

Açıklama: 14. gün sonuçlarına göre simultane aşılama buzağuların 31/31'i bağışık iken sadece şap aşılama buzağuların 29/29'u bağışıktır. 28. günde simultane grup 12/30 oranında bağışık iken, sadece şap aşılması yapılan grup 12/29 oranında bağışıktır. 28. günde şap aşısının rapeli yapılması ile 2. ayda simultane grup 30/30, şap grubu 27/28 oranında bağışık olmuştur. Gruplardaki hayvanlar-

da korumayı sağlayan en düşük titre baz alınarak yapılan karşılaştırmalarda genel olarak birbirine yakın koruma düzeylerinin sağlandığı görülmektedir. İstatistiki olarak yapılan karşılaştırmalarda eş zamanlı aşılama yapılan gruptaki hayvanlar ile yalnız şap aşılması yapılan grup arasında O tipi antikor titresi açısından fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 7. Konjunktival brusella ve şap aşısı uygulanan buzağularda A tipi şap antikorlarının titre dağılımı

		<1/8	1/8	1/11	1/16	1/22	1/32	1/44	1/64	1/96	1/128	1/192	1/256	1/362	1/512	>1/512	n
Şap A tipi antikor	14. Gün	Ş+B	3	3	4	2	5	3	1	2	3	1	1	1	1	1	31
		Ş	4	4	3	2	6	2	1	2	1	3		1			29
28. Gün		Ş+B	1	1	5	5	6	1	4		3	1	1			1	29
		Ş	2	1	1	3	5	5	1	3	3						29
2. Ay		Ş+B		1		1						3	2	10		14	31
		Ş							1	2	1		6	5		14	29

Açıklama: 14. gün sonuçlarına göre simultane aşılama buzağuların 21/31 oranında bağışık iken sadece şap aşılama buzağuların 18/29 oranında bağışıktır. 28. günde simultane grup 22/29 oranında bağışık iken, sadece şap aşılması yapılan grup 22/29 oranında bağışıktır. 2. ayda simultane grup 30/31 oranında şap grubu 29/29 oranında bağışıktır. Gruplardaki hayvanlarda korumayı sağlayan en düşük titre baz alınarak yapılan karşılaştırmalarda genel olarak birbirine yakın koruma düzeylerinin sağlandığı görülmektedir. Eş zamanlı grubun antikor titresi ile yalnız şap aşılması yapılan grubun

antikor titresi arasında istatistiki olarak fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$).

Serum aglütinasyon testi sonuçları

Aglütinasyon testi ile brusella antikor titresi belirlenmiştir. Bu testte 1/10 antikor titresi humoral immün yanıtın kabul edildiği en küçük titre değeri olarak kabul edilmiştir. Parenteral çalışmada brusella maternal antikor bulunmazken, konjunktival çalışmada 3 hayvanda 1/10 titrede maternal antikor tespit edilmiştir. Bu hayvanlar gruplara homojen şekilde dağılmıştır.

Tablo 8. Parenteral brusella ve şap aşısı uygulanan buzağularda brusella antikor titre dağılımı

		<1/10	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	≥1/320	n sayısı
14. Gün	Ş+B				1	4	2	1	8
	B				1	1	2	3	7
28. Gün	Ş+B			2	2	3	1		8
	B			1	2	4			7
2. Ay	Ş+B	1	4	2					7
	B		1	6					7
3. Ay	Ş+B	1	5	1					7
	Ş	1	6						7
6. Ay	Ş+B	7							7
	B	6							6
12. Ay	Ş+B	5							5
	B	5							5

Açıklama: 14. gün ve 28. gün sonuçlarına göre hem simultane hem brusella aşısı yapılan gruptaki hayvanların tamamında immün yanıt şekillenmiştir. 2. ayda simultane grup 6/7, brusella grubu 7/7 oranında immün yanıt vermiştir. 3. ayda simultane grup ve brusella grubu 6/7 oranında immün yanıt vermiştir. 6 ve 12. Aylarda hayvanlarda immün yanıt belirlenememiştir. Bunun sebebi çalışmada kullanılan buzağların 90-117 günlük olması ve brusella aşı-

sında genç hayvanlardaki humoral immün yanıtın kısa sürmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Gruplardaki hayvanlarda korumayı sağlayan en düşük titre baz alınarak yapılan karşılaştırmalarda genel olarak birbirine yakın koruma düzeylerinin sağlandığı görülmektedir. Sadece 2. ayda brusella grubu istatistiki olarak simultane gruptan daha yüksek titre değeri vermiştir ($p<0,05$).

Tablo 9. Parenteral brusella ve şap aşısı uygulanan kuzularda brusella antikor titre dağılımı

		<1/10	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	$\geq 1/320$	n sayısı	
Brusella antikor	14. Gün	Ş+B	1	2		1	9	15	7	35
		B	1	1		1	12	15	4	34
	28. Gün	Ş+B			5	17	10	3		35
		B	2	2	3	16	9	2		34
	2. Ay	Ş+B	9	11	11	3				34
		B	11	10	9	3				33
	3. Ay	Ş+B	11	13	10					34
		B	18	11	2	1				32
	6. Ay	Ş+B	14	16	1					31
		B	21	9	1					31
	12. Ay	Ş+B	18	9						27
		B	17	6						23

Açıklama: 14. gün simultane grup 34/35 oranında, brusella grubu 33/34 oranında ve 28. gün sonuçlarına göre simultane grup 35/35 oranında brusella grubu 32/34 oranında, 2. ay simultane grup 25/34 oranında brusella grubu 22/33 oranında, brusella grubu 22/33 oranında, 3. Ay simultane grup 23/34 oranında, brusella grubu 14/32 oranında, 6. Ay simultane grup 17/31 oranında brusella grubu 10/31 oranında, 12.ay simultane grup 9/27, brusel-

la grubu 6/23 oranında immün yanıt göstermiştir. İmmün yanıtın bu kadar uzun sürmesinin sebebi kuzuların 3-6 aylık olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Gruplardaki kuzularda immün yanıt baz alınarak yapılan karşılaştırmalarda genel olarak simultane grupta daha yüksek immün yanıt alındığı görülmektedir. Tüm karşılaştırmalarda eş zamanlı gruptan istatistiki olarak daha yüksek antikor titresini elde edilmiştir (tüm gruplarda $p<0,005$).

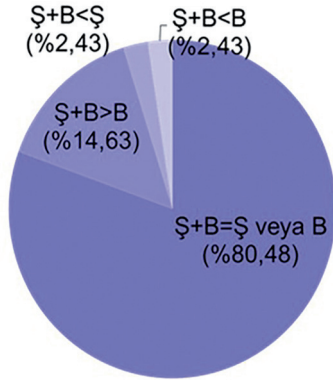
Tablo 10. Konjunktival brusella ve şap aşısı uygulanan buzağlarda brusella antikor titre dağılımı

		<1/10	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	$\geq 1/320$	n sayısı
Brusella antikor	14. Gün	Ş+B	19	9	2	1			31
		B	19	5	3	4			31
	28. Gün	Ş+B	22	4	3				29
		B	20	11					31
	2. Ay	Ş+B	6						6
		B	6						6

Açıklama: 14. gün simultane grup ve brusella grubu 12/31 oranında, 28. gün sonuçlarına göre simultane grup 7/29 oranında brusella grubu 11/31 oranında, 2. ay simultane grupta immün yanıt belir-

lenememiştir. Grupların immün yanıt değerleri birbirine pareldir. Aşının konjunktival olması ve buzağların 95-178 günlük olması sebebi ile immün yanıtın 28. günden sonra belirlenemediği düşünülmektedir.

Tüm gruplarda eş zamanlı grup ile tek aşılama yapılan grup arasında istatistiki fark bulunamamıştır ($p>0,005$).



Şekil 1. Grup karşılaştırmalarının yüzdesel değerleri.

Çalışmanın yapıldığı grupların 41 adet karşılaştırmasında istatistiksel olarak %80,48'inde (33 adet) simultane aşılama ile tek aşılama yapılan grup arasında farklılık tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Grupların %14,63'ünde (6 adet) Parenteral Brusella ve Şap aşısı uygulanan kuzularda 14. gün, 28.

gün, 2. ay, 3. ay, 6. ay ve 12. ayın kan numunelelerinde simultane grubun brusella antikor titresine sadece brusella aşısı yapılan grubun antikor titresine göre istatistiki olarak yüksektir ($p<0,05$). Grupların %2,43'ünde (1 adet) Parenteral Brusella ve Şap aşısı uygulanan kuzularda 2. ayda O tipi şap antikor titresine simultane aşılanan grubun antikor titresinden istatistiki olarak yüksektir ($p<0,05$). Bunun sebebi olarak simultane grupta maternal antikor gösteren hayvan 1/35 oranında iken şap grubunda 32/35 olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmadaki kuzuları yetiştiren işletme kayıtlarında kuzuların doğum tarihi bulunmadığından gruplandırmada yaş esas alınamamıştır. Gruplardan %2,43'ünde (1 adet) Parenteral Brusella ve Şap aşısı uygulanan buzağılarda 2. ayda Brusella grubunun antikor titresine simultane aşılanan grubun antikor titresinden istatistiki olarak yüksektir ($p<0,05$).

Karşılaştırmaların 33 adedinde $p>0,05$ bulunarak gruplar arası istatistiki fark bulunamamıştır. $p<0,05$ sonucu ile istatistiki fark olan 8 gruptaki istatistiki analiz sonuçları şu şekildedir:

Tablo 11. İstatistiksel sonuçlar

Brusella ve şap aşı grupları	Grup	Arit. ort.	Standart sapma	p değeri	Sonuç
Parenteral brusella ve şap buzağı	Ş+B	1,0429	0,20702	0,033	(B >Ş+B)
2. Ay brusella antikor titresini karşılaştırma	B	1,2571	0,11339	0,039	
Parenteral brusella ve şap kuzu	Ş+B	1,3403	0,39855	0,002	(Ş >Ş+B)
2. Ay O tipi şap antikor titresini karşılaştırma	Ş	1,6321	0,36231	0,002	
Şap ve parenteral brusella kuzu	Ş+B	2,1074	0,49476	0,000	(Ş+B >B)
14. Gün brusella antikor titresini karşılaştırma	B	2,0688	0,42758	0,000	
Şap ve parenteral brusella kuzu	Ş+B	1,6943	0,24964	0,003	(Ş+B >B)
28. Gün brusella antikor titresini karşılaştırma	B	1,6000	0,35420	0,003	
Şap ve parenteral brusella kuzu	Ş+B	1,0176	0,26568	0,007	(Ş+B >B)
2. Ay brusella antikor titresini karşılaştırma	B	1,0455	0,31927	0,007	
Şap ve parenteral brusella kuzu	Ş+B	0,9912	0,23915	0,000	(Ş+B >B)
3. Ay brusella antikor titresini karşılaştırma	B	0,8688	0,22781	0,000	
Şap ve parenteral brusella kuzu	Ş+B	0,8742	0,16925	0,000	(Ş+B >B)
6. Ay brusella antikor titresini karşılaştırma	B	0,8065	0,16520	0,000	
Şap ve parenteral brusella kuzu	Ş+B	0,8000	0,14412	0,000	(Ş+B >B)
12. Ay brusella antikor titresini karşılaştırma	B	0,7783	0,13469	0,001	

Tartışma ve Sonuç

Serum nötralizasyon test sonuçlarına göre buzağılarda uygulanan şap ve parenteral brusella aşılamaları

larında 6. ay sonuçları O tipi antikor titreleri A tipine sonuçlarına göre nispeten daha düşük çıkmıştır. Bu durum O tipi virüs yapısından kaynaklanan genel olarak O tipinde bağışıklığın kısa sürmesinden

kaynaklanmaktadır. Şap ve parenteral brusella aşırı uygulanan kuzulardaki O ve A tipi antikor titrelerinin buzağılardaki antikor titrelerinden nispeten yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum kuzuların 3-6 aylık yaşta olması, buzağuların 90-117 günlük olması ile kuzuların yaşları sebebi ile immun sistemlerinin daha gelişmiş olması ile izah edilebilmektedir. Keza aynı sebepten konjuktival brusella çalışmasında kullanılan buzağuların 95-178 günlük olması parenteral çalışmada kullanılan 90-117 günlük buzağılardan daha yüksek şap antikor titresi elde edilmesine yol açmıştır. Parenteral brusella ve şap aşısı uygulanan kuzuların 2. ayda O tipi şap antikor titresi sadece şap aşılması yapılan grubun antikor titresinden istatistiki olarak düşüktür. Bunun, simultane grupta maternal antikor gösteren hayvan 1/35 oranında iken şap grubunda 32/35 olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmadaki kuzularını yetiştiren işletme kayıtlarında kuzuların doğum tarihi bulunmadığından gruplandırma yaş esas alınmamıştır. İlk aşının yapıldığı gün aynı zamanda 0. gün kanları alındığından şap grubuna maternal antikor olan kuzular tesadüfi olarak bir araya gelmiştir.

Serum aglütinasyon test sonuçlarına göre buzağılardaki parenteral aşılama brusella antikorları 3. aydan sonra titre vermezken konjuktival aşılama 28. günden sonra titre vermemiştir. Bu konjuktival aşı içerisindeki CFU (colony forming unit) ile ilgili beklenen bir durumdur. Kuzulardaki parenteral brusella antikorlarının 12. ayda dahi tespit edilmesi çalışmaya alınan kuzuların 3-6 aylık olması ve yaşları sebebi ile daha güçlü immun yanıt oluşturabilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Parenteral brusella ve şap aşısı uygulanan kuzularda 14. gün, 28. gün, 2. ay, 3. ay, 6. ay ve 12. ayın kan numunelerinde simultane grubun brusella antikor titresi sadece brusella aşısı yapılan grubun antikor titresine göre istatistiki olarak yüksektir. Bu durumun şap aşısının yağ adjuvantı sayesinde olduğu düşünülmektedir. Adjuvantlar aşılar da depo etkisi oluşturarak immun sistemi daha fazla uyarmak için kullanılmaktadırlar. Adjuvantlar makrofajları stimule ederek elde edilen immunglobulin miktarını arttırmaktadırlar. Boersma ve arkadaşlarının [5] yaptığı çalışmaya göre yağlı adjuvantların uygulanmasında IL-1 en ön plana çıkan sitokindir. İnterlökinler hem humoral hem hücreselele immun yanıtın

artmasında etkili olmaktadır. Allison ve ark. [1] yaptığı çalışmaya göre yağlı adjuvantlar interlökinler üzerindeki etkisi ile humoral yanıtta IgG1 cevabını arttırmaktadır. Brusella antikor titre tespiti için yapılan aglütinasyon testinde simultane aşılama brusella antikor titresinin tek yapılan aşılama göre daha yüksek bulunmasının sebebi yağ adjuvantın interlökinler üzerindeki etkisi ile Ig oluşumunu artırması olarak düşünülmektedir. Ayrıca Mastan ve arkadaşlarının [16] kobaylarda yaptığı çalışmaya göre canlı brucella S-19 ve şap aşısı gerek simultane gerekse kombine olarak uygulandığında tek yapılan canlı brusella aşılama göre daha iyi epruvasyon sonuçları vermiştir. Ayrıca canlı brusella S19 ile kombine şap aşısının inaktif brusella S19 ile kombine şap aşısına göre titre değerleri ve epruvasyon değerleri daha yüksek çıkmıştır. Bu durum şap aşısı içerisindeki yağ adjuvantının interlökinler aracılığı ile hücreselele immunite üzerindeki etkisini göstermekte ve çalışmamız ile aynı sonucu paylaşmaktadır. Başka bir çalışmada De Clercq ve ark. [8] domuz yavrularına inaktif, adjuvantlı şap ve attenüe klasik domuz ateşi aşılarını simultane uygulamışlardır. Simultane yapılan aşılama klasik domuz ateşine karşı oluşan antikor miktarı tek aşı yapılan gruba göre daha yüksek elde edilmiştir. Bu çalışma da bulduğumuz sonucu desteklemektedir.

Sonuç olarak çalışmada brusella ve şap aşılarının simultane olarak uygulanmasında şap aşısı açısından bir titre kaybı olmadığı belirlenmiştir. Brusella ve şap aşılarının eş zamanlı uygulanmasında brusellaya karşı oluşan humoral yanıt olumlu etkilenip daha yüksek antikor titresi vermiştir. Brusella aşısı attenüe bir aşı olduğundan hücreselele immunite ile bağışıklık oluşturmaktadır. Humoral immunite de şekillenmektedir. Brucella aşısı ile elde edilen hücreselele immunite günümüzde herhangi bir test ile tespit edilememektedir. Aynı zamanda yeterli olanaklar olmaması nedeni ile brusella aşısının epruvasyon çalışması yapılamamıştır.

Teşekkür

Değerli destekleri için Şap Enstitüsü İdaresi'ne, Şap Enstitüsü Epidemiyoloji Ünitesi ve Kalite Kontrol Bölümü çalışanlarına, TAGEM'e, TİGEM'e, Altınova Tarım İşletmesi Müdürlüğü'ne ve Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Allison AC., Byars NE., 1991. Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects. *Mol Immunol*, 28, 279-84.
2. Altay G., 2008. Kültür pozitif 70 bruselloz hastasının klinik ve laboratuvar verilerinin değerlendirilmesi, Antibiyotik duyarlılıklarının e-test yöntemi ile incelenmesi. http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/pdf/enfeksiyon/dr_gulustan_altay.pdf Erişim Tarihi: 17.01.2010.
3. Anonim, 2010. Şap Hastalığı. http://www.kkgm.gov.tr/birim/hay_sagl/Hastaliklar/sapy.html Erişim Tarihi: 17.01.2010.
4. Aslantaş Ö., 2006. Sığır brusellozis'inin allerjik deri testleri ile teşhisi üzerinde çalışmalar. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 12, 57-61.
5. Boersma WJA., Bogaerts WJC, Bianchi ATJ., Claassen E., 1992. Adjuvant properties of stable water-in-oil emulsions: evaluation of the experience with Specol. *Res Immunol*, 143, 503-512.
6. Castaneda J., Espinoza M., Bernel C., Jimenez J., Aguirre L., 1976. Simultaneous vaccination of cattle with against foot and mouth disease and stomatitis live virus vaccines. *Dev Biol Stand*, 35, 429-36.
7. Davies G., 2002. Foot and mouth disease review. *Res Vet Sci*, 73, 195-199.
8. De Clercq K., Koenen F., Strobbe R., Debecq J., 1989. Simultaneous vaccination of piglets against foot-and-mouth disease and classical swine fever. *Vet Microbiol*, 20, 215-221.
9. Favre H., Valette L., Precausta P., Roulet C., Brun A., Terre J., Fontaine J., Stellmann C., 1976. Les vaccines antiaphteux associes a dautres vaccines bacteries ou viraux. *Dev Biol Stand*, 35, 409-428.
10. Hedger RS., Taylor WP., Barnett TR., Riek R., Harpham D., 1986. Simultaneous vaccination of cattle against rinder pest and FMD. *Trop Anim Hith Prod*, 21-25.
11. Ivanyi TS., Kucsera G., Tubaly S., Bogнар K., Kiss S., Bernath Z., 1981. Immunogenicity of attenuated VD and inactivated FMD vaccines applied alone or simultaneously. *Magyar Allotorvosok Lapja*, 36, 369-373.
12. Kitching RP., 2002a. Clinical variation in foot and mouth disease: Cattle. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 21, 499-504.
13. Kitching RP., 2002b. Future resarch on foot and mouth disease. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 21, 885-889.
14. Küçükayan U., Dakman A., Ülker U., Müştak K., 2007. Koyun kan serumları ve fetusların bakteriyel atık etkenleri yönünden incelenmesi. *Etlik Vet Mik Derg*, 18, 11-16.
15. Mahy BWJ., 2005. Foot and mouth disease virus. Springer Limited, Berlin, s. 133-135.
16. Mastan MB., Amighi M., Ardelan A., Bandpay MR., Ebadi A., Farsi J., 1976. Preliminary study of the combination of anti-foot-and-mouth disease and anti-brucellosis vaccines. *Dev Biol Stand*, 35, 437-43.
17. Srinivas K., Babu N., Kant R., Rahasekhar M., Kumar M., 1996. Simultaneous vaccination against foot and mouth disease. *Indian Jour of Vir*, 12, 33-7.
18. Stevens MG., Hennager SG., Olsen SC., Cheville NF., 1993. Serologic respons in diagnostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. *J Clinic Microbiol*, 1065-1066.
19. Şap Enstitüsü Protokolü p:D/9.1.
20. Ünver A., Erdoğan HM., Atabay Hİ., Şahin M., Güneş V., Çıtıl M., Gökçe Hİ., 2006. Sığır atıklarından izole edilen *Brucella* türlerinin RAPD-PCR ile genotiplendirilmesi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 12, 121-127.

Bakteriyofaj Tedavisi

Demet Yaman Aydoğan¹, H. Hüseyin Hadımlı²

¹Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, 34890, İstanbul

²Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya.

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

Özet: Bakterilerin paraziti olan bakteriyofajlar, keşfedildikten sonra bakteriyel hastalıklara karşı tedavide kullanılmaya başlanmış ancak antibiyotiklerin keşfiyle, özellikle Batı ülkelerinde, faj tedavisine ilgi azalmıştır. Günümüzde antibiyotiklere karşı bakteri direncinin oluşması önemli bir sorun haline gelmiştir. Bu durum, bakteriyel hastalıkların tedavisinde ve profilaksinde alternatif arayışları zorunlu kılmıştır ve faj tedavisi yeniden ele alınmıştır.

Anahtar kelimeler: Bakteriyofaj, faj, tedavi

Bacteriophage Therapy

Abstract: Bacteriophages are parasites of bacteria and they had been used in treatment against bacterial diseases since their discovery. However, the discovery of antibiotics, has been decreased interest in phage therapy, especially in Western countries. Nowadays, bacterial resistance against antibiotics has become an important issue. This necessitated the search for alternative therapy to bacterial diseases and prophylaxis so phage therapy has been reconsidered.

Key words: Bacteriophage, phage, therapy

Giriş

Bakteriyofaj (faj), Eski Yunanca'da bakteriyiyen anlamına gelir. Fajlar, 20-30 dakikalık kısa yaşam sikluslarıyla, DNA ya da RNA'ya sahip, basit yapıda virüslerdir. Genellikle sulak alanlarda olmakla beraber, konakçının olduğu her yerde bulunabilirler. Yeryüzünde 1031 faj partikülü olduğu tahmin edilmektedir [31,41].

Memeli hücrelerini enfekte etmeyen fajlar, yalnızca tek bir bakteri türüne, ya da serotipine patojendir [32]. Bakteriyofajlar identifiye edildikten sonra, mevcut bilgilere dayanılarak, patojenlere karşı antibakteriyel ajan olarak hızlı bir şekilde uygulanmaya başlanmıştır ve yaklaşık doksan yıldır farklı alanlarda da kullanılmaktadır [31].

Tarihçe

İlk olarak 1896'da Ernest Hankin tarafından *Vibrio cholerae*'ye karşı bir antibakteriyel aktivitenin varlığı bildirilmiştir. Nikolay Fyodorovich Gamaleya, *Bacillus subtilis* üzerine çalışırken benzer bir fenomenin varlığını gözlemlemiştir. Frederick Twort, 1915'te, bunun antibakteriyel bir virüs etkinliği

olabileceği hipotezini savunmuştur. D'Herelle, dizanterili hastaların dışkı örneklerinde, "invisible-microbe" (görünmez mikrop) olarak adlandırdığı, bakteri içermeyen filtratlar tespit etmiş, 1917'de "bakteriyofaj fenomeni"ni tanımlamış ve 1919'da fajları dizanteri tedavisinde kullanmıştır [17]. Bakteriyofajlar, elektronmikroskopta ise ilk kez 1940'ta Helmut Rushka tarafından görüntülenmiştir [43].

D'Herelle, bakteriyofajın tavuk ve tavşanlardaki gastrointestinal ve sepsis hastalıklarda etkinliği kanıtlandıktan sonra insanlar üzerinde çalışmış, Shigabakteriyofaj süspansiyonundan önce kendisine, ailesinden üç kişiye ve çalışma arkadaşlarına oral yola uygulayarak, bunun lokal ya da genel herhangi bir olumsuz reaksiyon oluşturmadığını kanıtlamıştır. Bu denemeler faj tedavisinin güvenilirliği konusunda o dönem yeterli kabul edilmiştir. D'Herelle, hıyarcıklı veba (*Yersinia pestis* enfeksiyonu) teşhisi konmuş dört hastanın enfekte aksiller ve inguinal lenf düğümlerine direkt olarak antiplak faj preparasyonu enjekte etmiş ve hastalar iyileşmiştir. Bilim adamı daha sonra, Hindistan, Gürcistan, ABD ve Fransa'da faj terapi ve araştırma merkezleri kurulmasına öncülük etmiştir [42].

Bazı şirketler 1930'dan itibaren farklı patojenlere karşı fajları ticarileştirmeye başlamıştır. Paris'te, çeşitli bakteriyel enfeksiyonlara karşı beş fajlı ticari preparat (Baktekolifaj, Baktorinofaj, Baktointestifaj, Baktopyofaj, ve Baktostafofaj) üretilmiş ve bu preparatlar daha sonra Fransa'nın en büyük şirketlerinden olacak L'Oreal tarafından pazarlanmıştır. Ayrıca ABD'de 1940'ta, insanlarda kullanılmak üzere yedi faj preparatı üretilmiştir. İkinci Dünya Savaşı sonrası antibiyotiklerin keşfiyle Batı'da terapötik amaçlı faj kullanımı azalmasına rağmen, özellikle eski SSCB (Sovyet Sosyalist Cumhuriyetler Birliği)'de, Gürcistan ve Polonya'daki çalışmalar istikrarlı bir şekilde devam etmiştir [1,41]. Gürcistan'da EIBMV (Eliava Institute of Bacteriophage Microbiology and Virology, 1923) ve Polonya'da HIIET (Hirszfild Institute of Immunology and Experimental Therapy, 1952) fajların araştırılmasında ve üretiminde aktif olmuştur [41].

Faj tedavisi yeniden 1982'de Smith ve Bob Huggins tarafından tekrar canlanmış. Batı'daki çalışmalar, Polonya ve eski SSCB'de yapılan çalışmaların tekrar ele alınmasıyla ivme kazanmıştır [31].

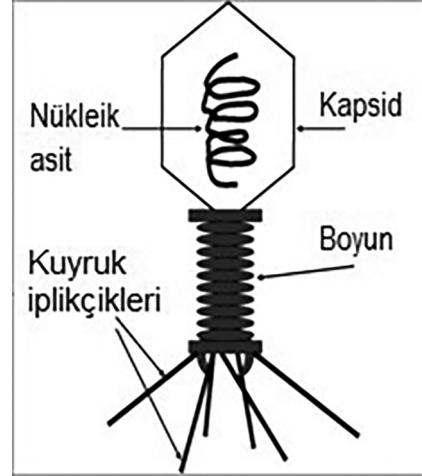
Günümüzde, faj lizinleri, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde tek başlarına potansiyel tedavi unsuru olarak incelenmiş ve dünya çapında, antibakteriyel ajan olarak fajlarla ilgili önemli sayıda araştırmalar yapılmıştır. Ayrıca FDA, 2006 yılından itibaren gıdalarda koruyucu olarak kullanılan bazı ticari faj preparatlarının üretimini onaylamıştır [31]. Moleküler biyolojinin pek çok sırrı fajlar sayesinde çözülmüştür ve bakteriyofajlar hâlen biyoteknoloji ve moleküler biyolojiye katkıda bulunmaktadır [17].

Fajın Morfolojisi ve Sınıflandırılması

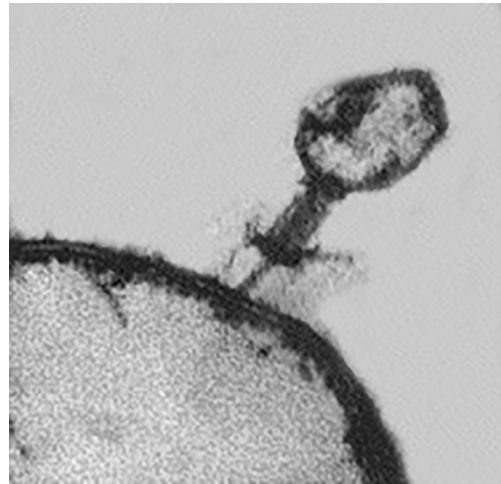
Büyüklikleri 20-200 nm kadardır. Ana yapılarını DNA ya da RNA karakterinde genetik materyal oluşturur.

Tanımlanmış fajlar genel olarak; morfolojik özellikleri, nükleik asit türü, zarf ya da lipidlerin varlığı-yokluğuna göre onüç familyaya ayrılmıştır. Bakteriyofajlar, morfolojik özellikleri bakımından farklılık göstermesine rağmen, %90'ı baş kısmında dsDNA (doublestranded) genomu bulunduran litik fajlardır ve ikozahedral (kübik) simetri gösterirler. Kapsid, bakteri hücresinin yüzeyindeki reseptörlere tutunmada kullanılan, iplikçiklerden oluşmuş bir

kuyrukla bağlanır (Şekil 1). Kuyruk, hedef bakteri reseptörlerine adsorbe olur ve faj DNA'sı bakteri hücrelerine aktarılır (Resim 1) [17]. Bu fajlar; *Myoviridae* (uzun, kasılabilen kuyruk), *Siphoviridae* (uzun, esnek, kasılmayan kuyruk), *Podoviridae* (kısa, kasılmayan kuyruk) olmak üzere morfolojik olarak üç temel aileye ayrılırlar [32].



Şekil 1. Fajın morfolojisi



Resim 1. *Myoviridae* familyasından T4 fajın elektron mikroskop görüntüsü [16]

Yaşam Döngüsüne Göre Fajlar

Fajlar, litik ve lizojenik siklus olmak üzere iki tür yaşam döngüsüne sahiptir. Litik (virulent) fajlar; sayılarının gittikçe artması (otodozajlama), normal florada minimal bozulma, düşük toksisite, antibiyotiklerle çapraz direnç oluşturmama, hızlı iyileşme

sağlama gibi bir dizi doğal özellikleri nedeni ile potansiyel antibakteriyeldirler [35].

Litik fajlar: Bakteriyolitik mekanizmalarına göre ikiye ayrılabilir;

Tek litik faktörle hücre duvarını yıkımlayanlar; bu litik fajlar, küçük, ssDNA veya ssRNA genomuna sahiptir ve hücre duvarı sentezi inhibisyonuyla bakteriyolizisi indükleyen tek bir litik faktörle kodlanmıştır.

Bakteri hücre duvarını virolizin-holin sistemle hidrolize edenler; en bilinenleri, bütün kuyruklu fajları içeren, virolizin-holin sistemle dsDNA kodlayan büyük litik fajlardır. Virolizin, bakteri hücre duvarındaki peptidoglikanı hidrolize eden bir muralitik enzimdir (endolizin) ve stoplazmada üretilir. Holin küçük bir peptit olup, fajın yaşam siklusunda belirlenen (programlanan) bir zamanda virolizinin hücre duvarına erişimine imkan vermek için membranda yıkım oluşturmak üzere oligomerize olur. Hücre lizisi ve projenlerin serbest hale gelmesi holin kontrolünde olur [16].

Tipik litik faj döngüsünde faj, bakteri hücresinin rastgele hareketi sırasında, konağa ait teikoik asit, lipopolisakkarit, oligosakkarit, peptidoglikan, protein gibi yüzey bileşenleri içeren reseptör bölgeleriyle karşılaştığında bağlanma gerçekleşir (adsorbsiyon). Bazı durumlarda kapsül, pili, flagella da reseptör olarak faj tarafından kullanılır. Bakteriyofaj genomunun bakteri hücrelerine enjeksiyon (penetrasyon) mekanizması, virüsün morfolojisine bağlı olarak farklılık göstermekle beraber, genellikle kuyruğın kasılıp bakteri hücre duvarında bir delik oluşturmasıyla açıklanır. Viral genomun, konakçı hücrenin RNA polimeraz enzimiyle transkripsiyonu, erken mRNA oluşumuna neden olur. Bakterinin metabolik mekanizması virüs tarafından ele geçirilir ve metabolik süreç, yeni virüs bileşenlerinin üretilmesine yönlendirilir. Bu komponentler daha sonra biraraya gelerek virionu oluşturur (latent dönem). Projen litik fajlar, serbest kalırken bakteri hücrelerini lize ederek onun hızlı bir şekilde ölümüne neden olur [16,32]. Bakteri lizisi, agar üzerinde plak adı verilen alanları oluşturur.

Enfekte bir bakteri hücrelerinden 100'den fazla faj serbest kalabilir ve bunların her biri yeni bir bakteri hücrelerine bulaşabilir. Enfeksiyon siklusu, tüm

duyarlı bakteri hücreleri ölene kadar devam etme potansiyeli taşır [16].

Lizojenik (ılımlı) fajlar: Konakçının yaşam döngüsünün bir bölümünde profaj adı verilen pasif bir halde yer alırlar. Lizojenik döngüde viral DNA genellikle konak hücre DNA'sına entegre olur, bakteriyel DNA replikasyona uğrarken aynı anda faj DNA'sı da çoğalır ve böylece her bir yavru hücre (profaj) viral DNA içerir. Faj, bazen de plasmid olarak yer alır. Konak hücre DNA'sı replike olduğunda profaj DNA'sı da çoğaltılır ve böylece bir sonraki nesle gen aktarılır. İlımlı fajlar, laboratuvar çalışmalarında kullanılmalarına rağmen faj tedavisinde nadiren kullanılır. Bunun nedeni, ılımlı fajların patojenleri %100 öldürmemesi ve "lizojenik fenomen" olarak bilinen ve bazı durumlarda bakterinin daha virulent hale gelmesine neden olan genleri içermesidir [16]. Ancak ılımlı bir faj, gen baskılama teknolojisi kullanılarak bakterinin patojenitesini düşürecek yönde tasarlanabilir [11].

Lizojenik fajlar kendiliğinden litik döngüye girmezler. Ancak bir lizojenik hücre popülasyonu, ortam koşullarının değişmesi ya da değiştirilmesiyle; mitomycin C vasıtasıyla, UV ışığına maruz bırakılarak ya da mutajenik ajanlar vasıtasıyla; lizise indüklenebilir, yüksek sıcaklık ve sabit fazın etkisi altında lizojenik ve litik gelişim arasında geçiş yapabilir [16,17,19,10]. Profaj, kendisinin ve yakın ilişkili fajların gen transkripsiyonunu engelleyen baskılayıcı bir proteini yönetir. Böylece bir profajın varlığı, bakteri hücrelerinde, diğer faj enfeksiyonlarına karşı bir tür bağışıklık kazandırır [16].

Flamentöz morfolojiye sahip bazı fajlar hücre duvarında yıkıcı etki yaratmadan, duvarın içinden geçerek konak hücreden ayrılırlar. Bu fajlar tedaviyle ilgili olarak dikkate alınmazlar [16].

Faj seçimi, İzolasyonu ve Saflaştırılması

Tüm faj tedavisi protokollerinde ilk adım, faj seçimi ve izolasyonudur. Uygulamada iki şekilde faj seçimi söz konusudur. İlki, tekli faj bileşenlerinden daha geniş bir etkinlik yelpazesine sahip (geniş spektrumlu) ve kısa sürede direnç oluşmasına imkân vermeyen Pyofaj ve intestifaj gibi çoklu faj kokteylleridir. İkincisi, enfeksiyondan ya da doğal ortamdan alınan, önceden iyi tanımlanmış fajla teste tabi tutulan faj seçimidir [1].

Faj izole edilecek örnekler, konağın sıklıkla bulunabileceği ortamlardan alınır; bunlar genellikle su, toprak, bitki artıkları, dışkı, atık su arıtma tesisleridir. Örneğin, enterik patojenlere karşı kullanılan fajlar, doğal olarak dışkı numunelerinden ya da kanalizasyon suyundan izole edilir. Faj izolasyonu yöntemlerinde farklar olsa da temelde aynı yol izlenir. Öncelikle toplanan örnekte faj varlığı tespit edilir.

Direkt izolasyon yönteminde örnek, filtreden geçirilir ve kontaminant mikroorganizma hücrelerinden arındırılır. Su ya da kanalizasyon atıklarında bu uygulanabilir; basit bir santrifüjden sonra, büyük partikül ve hücreleri geçirmeyen, fajların geçişine izin veren bir membran filtre ile filtrasyon uygulanır. Katı örneklerse, steril sıvı besiyeri ya da bufferle karıştırıldıktan sonra santrifüj ve filtrasyona tabi tutulur. Pleytler kaplanır (dilüe edilerek) ve oluşan plaklar incelenir. Konsantrasyon sağlamak isteniyorsa ya da gerekiyorsa, plaklama işleminden önce ultrasantrifüj, ultrafiltrasyon gibi yöntemler uygulanmalıdır [11].

Zenginleştirmeyle izolasyonda, uygun besiyerinde üretilmiş konakçıya örnekler ilave edilir, inkübasyonun ardından santrifüj edilir. Faj-Konakçı içerikli suspansiyon filtreden geçirilerek hedef bakteri bulunan agara farklı dilüsyonlarda yayılır, plaklar sayılır. Zenginleştirme, faj miktarının az olduğu durumlara karşı daha geçerli bir yaklaşımdır [11].

Sıvı besiyerinde, bakterilerin neden olduğu bulanıklık, fajlar bakterileri parçaladığında kaybolur. Katı besiyerinde ise fajların bakterileri parçaladığı alanlar açık kalır ve bu bölgeler plak olarak adlandırılır. Bir süspansiyondaki faj sayısı, agar üzerinde plak oluşturan titre ile (plaque forming unit, PFU) ifade edilir. Çift tabaka agar ekim ve Rutin Test Dilüsyon olmak üzere iki sayım yöntemi vardır [15]. Fajlar, liyofilize veya dondurularak kurutulmuş halde uzun yıllar stabil kalabilmektedir [9,11].

Fajların Kullanım Alanları

İnsan ve hayvanlarda tedaviye yönelik kullanımları dışındaki uygulamalar şu şekilde sıralanabilir;

Gıda ve tarımda biyolojik kontrol maddesi olarak: Bakteriyofajlar, karkas ve diğer işlenmiş ürünlerdeki ve taze sebze meyvelerdeki dekontaminasyonları azaltmak, ayrıca ekipmanlarda ve temas

yüzeylerinde dezenfeksiyonu sağlamak, bozulabilir gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmak amacıyla doğal koruyucu olarak kullanılabilir.

Biyoteknoloji: Çalışmalar, modern biyoteknolojide fajların kullanılabilceğini göstermiştir. Fajlar, gen terapisinde, aşı ve proteinlerin nakil aracı olarak, patojenik bakterilerin tespitinde, protein, peptit ya da antikor kütüphanelerinin taranmasında araç olarak kullanılabilir

Moleküler biyoloji: Günümüzde immun tekniklerle gen teknolojisinin değerlendirildiği faj gösterim teknolojisini (faj display), yeni kuşak rekombinant antikorların geliştirilmesinde kullanılmaktadır.

Bakterilerin identifikasyonu: Fajlar, gıda kaynaklı ve klinik bakteriyel patojenlerin direkt tespit ve identifikasyonunda araç olarak kullanılır.

Su ürünleri: Su ürünleri hastalıklarına karşı alternatif tedavi veya profilakside kullanılma potansiyeli taşırlar, ancak az sayıda çalışma yapılmıştır.

İnsanlarda Faj Kullanımı

İnsanlarda ilk faj çalışmaları, D'Herelle tarafından dizanterili ve vebalı hastalarda gerçekleştirilmiştir. Tiflis Eliava Enstitüsü'nde, gönüllülerde güvenlik çalışmalarını da içeren, sistemik uygulamalara yönelik faj preparasyonları geliştirilmiştir. Özellikle immun yetersizliği olan hastalarda, bebeklerde, pelvik inflamasyon vakalarında kullanılmıştır. Pyofaj ve İntestifaj gibi fajlar, gazlı gangrene karşı gerek profilaktik gerekse tedavi edici olarak ve askerlerin yara enfeksiyonlarında acil müdahalede başarılı bir şekilde kullanılmıştır [1]. SSCB'nin dağılmasının ardından başlayan Gürcistan Bağımsızlık Mücadelesi'nde (1991-92), savaş için özel olarak geliştirilmiş olan faj preparasyonları uygulanmış ve askerler tarafından Abazya'daki savaş bölgesine faj bidonları taşınmıştır. Fajlar, Rusya ve Gürcistan arasında 2008'de patlak veren savaşta askerlerde tedavi amacıyla yoğun bir şekilde kullanılmıştır [1].

Faj tedavisi, 1981-1986 yılları arasında 550 vakada uygulanmış; hastaların % 92,4'ünde iyileşme, % 6,9'unda belirtilerde gerileme görölmüş ve % 0,7'inde herhangi bir etki oluşmadığı bildirilmiştir.

Postoperatif ya da başka nedenlerden oluşan kronik deri enfeksiyonlarında etken olan *Staphy-*

lococcus ve Gram negatif bakterilere (*Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*) karşı uygulanan faj tedavisinde, hastaların %77'sinde iyileşme olmuş, kalan %23'ünde ise yan etkilerin gelişmesine ya da iyileşme belirtisi olmamasına bağlı olarak tedavi durdurulmuştur [1,31].

Oftalmoloji alanında da başarılı faj çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Dautova ve ark, 16'sında prulent kornea ülseri de bulunan travmatik bakteriyel keratitisi 30 hastayı "Pio" bakteriyofajla tedavi etmiştir. Eşit sayıdaki kontrol grubu gentamisin göz damlası ile tedavi edilirken, faj uygulanan hastalar, gentamisin uygulananlardan erken taburcu edilmiştir [1].

Antibiyotiğe dirençli bakteriyel akut konjunktivit olan otuz çocuğa faj uygulanmış, hastaların tamamı yedi günde iyileşmiş, sonraki ay yapılan kontrolde enfeksiyonun nüks etmediği gözlenmiştir [1].

Kanserle eş zamanlı olarak; *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* ve *E. coli*'ye bağlı bakteriyel enfeksiyona yakalanmış, antibiyotikle tedaviye yanıt alınmamış, 20 kanser hastasına faj terapisi uygulanmıştır. Oral yolla günde üç kez faj verilen hastaların tamamı, tedaviyi izleyen 2 ila 9 hafta arasında (ort. 32 gün) tamamen iyileşmiştir [45].

Antibiyotiğe dirençli, 94 septisemi olgusu fajla tedavi edilmiş, vakaların 71'inde antibiyotik tedavisi ile faj tedavisi birlikte uygulanmış, kalan 23'üne sadece faj tedavisi uygulanmıştır. Bu tedavide 94 olgunun %85.1'inde iyileşme olurken, %14.9'unda etki görülmemiştir (Weber-Dabrowska ve ark., 2003).

Çeşitli firmalar tarafından, kulak enfeksiyonları, bacak ülserleri ve yanık yaralarının tedavisi için insanlarda klinik faj çalışmaları başlatılmıştır [10]. Stafilokokkal perfore osteomyelit, akut-kronik cerrahi yara enfeksiyonları, inatçı deri ülseri olgularında antistafajlar kullanılarak iyileşme sağlandığı belirtilmiştir (Summers, 2001).

Faj tedavisinde elde edilen başarı ortalama olarak %85'tir ve antibiyotik tedavisinin etkili olmadığı durumlarda, bakteriyel patojenlerle mücadelede faj tedavisinin yüksek etkinliği olduğunu göstermiştir [31].

Hayvanlarda Faj Kullanımı

Antibiyotiklerin keşfinden sonra ilk önemli çalışmalar 1982-87'de Smith ve Huggins (Institute for Animal Disease Research, Cambridgeshire) tarafından yapılmıştır. Bu deneylerden birinde, potansiyel letal doz olan 3x10⁸ CFU (colony forming unit) mL-1 *E.coli* K1 enjekte edilmiş farelere, İntramuskuler yoldan tek doz, 3x10⁸ PFU (plaque forming unit) faj enjekte edilmiş, farelerde tam bir iyileşme sağlanmıştır. Deneyde bazı *E. coli* izolatlarının dirençli olduğu ancak bunların virülensinin daha az olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, tek doz faj tedavisinin; tetrasiklin, ampicilin, trimetoprim, sulfafurazol ve kloramfenikolün çoklu dozlarından daha etkin olduğunu gösterilmiştir. Buzağı, domuz yavrusu ve kuzularda *E. coli* kaynaklı yeni doğan ishalini önlemek için faj başarıyla kullanılmıştır (Smith ve Huggins, 1982). Fare ölümlerinin, Smith ve Huggins'in kullandığı faj oranına bağlı olarak değişkenlik göstermesi çok önemli bir bulgu olmuş ve bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde fajları başarıyla kullanma umudunu yeniden canlandırmış, Batı'da pek çok araştırmacı bu konuya yönelmiştir [31].

Smith ve Huggins (1983,1987) keçilere uygulanan faj tedavisinden sonra faj dirençli (phage-resistant) *E.coli* mutant oluşumunu tanımlamıştır. Faj tedavisinde mutantların ortaya çıkması olası bir sorun olarak ele alınmıştır. Ancak, çok sayıda çalışmada, karakterize edilmiş olan faj rezistans mutantların, virülensinin daha az olduğu veya hiç olmadığı görüşü ağırlık kazanmıştır. Faj rezistans mutantların, etkinliği en fazla olan fajın tespitinde kullanılabileceği düşünülmüştür [23].

Merril ve ark (1996), farenin kan dolaşımında normalden uzun süre dolaşımında kalan bazı faj spesifik suşları izole etmiştir. Longcirculating denilen bu faj türevleri, farelerde λvir (w60) (*E.coli* spesifik faj) ve P22vir (R34) (*Salmonella typhimurium* spesifik faj) olarak belirlenmiştir. Çalışma, Longcirculating λ mutantların, asıl suşlardan daha fazla anti bakteriyel etkinlik kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir [28].

E.coli K1 suşunun neden olduğu septisemi ve menenjit benzeri bir enfeksiyonda tavuklara, hastalık belirtileri görülmeye başladığında faj uygulanmış ve koruma sağlanmıştır. Aynı çalışmada, kolostrom almamış buzağılar oral yolla *E coli* ile enfekte

edilmiş, sekiz saat sonra İM. faj inokule edilmiştir. Sonuç olarak septisemi oluşumu gecikmiş ve bakterinin yaşam süresi kısalmıştır [2].

Köpeklerde *P. aeruginosa*'nın neden olduğu otitis externaya karşı faj tedavisi üzerine klinik çalışma yapılmış ve sonuçlar, uygulanan faj karışımı tedavisinin etkili olduğu göstermiştir [40].

P. aeruginosa'ya bağlı kronik otit gelişen 10 köpekte; kulak içine *P. aeruginosa*' karşı aktif 6 bakteriyofaj süşunun her birinden yaklaşık 105 PFU içeren topikal preparatlar uygulanmıştır. Uygulamadan 48 saat sonra swap alınarak bakteri ve faj sayımı yapılmıştır; faj sayısının arttığı, hedef bakteri sayısının azaldığı, ayrıca tedaviden önce yüksek olan klinik skorların düştüğü tespit edilmiştir. Bu tedavi, fajla enfeksiyon tedavisinde rapor edilmiş ilk klinik veteriner çalışması olmuştur [18].

Broylarlerdeki bir *E. coli*'ye bağlı septisemi tedavisinde fajın, İM ve solunum yolu ile uygulandığında etkinliği incelenmiş, kas içi enjeksiyonlarda ölüm oranının azaldığı gözlenmiştir [20].

Broylarlerdeki Kolibasilozise karşı bakteriyofaj-Enroflaksasin kombine tedavide mortalite görülmemiştir [22].

Koyun ve sığırlarda *E.coli* O157:H7 sayısını kontrol altına alabilmek amacıyla fajların kullanıldığı çalışmada, rektoanal bölgeye direkt olarak SH1 ve KH1 (spesifik litik fajlar) birlikte uygulandığında *E.coli* O157:H7 sayısında azalma tespit edilmiştir [36].

S. aureus' tan kaynaklanan subklinik mastitis olgusunda, *S. aureus* faj K, intramamillar yoldan 5 gün uygulanmış, istatistiksel olarak önemli bir sonuç elde edilememiştir. *S. aureus* izolatları, faj K lizisine duyarlı oldukları halde etkinlik elde edilememiş olması, süt proteinleri ya da meme bezlerindeki enzimatik aktivitenin, faj-hedef bakteri bağlanmasına engel oluşturabileceği üzerinde durulmuştur [12,13].

Tavuklarda *Salmonella typhimurium*'a karşı *Salmonella* spesifik faj kokteyli uygulanan hayvanların ileum ve sekumlarında *Salmonella* sayısının azaldığı, aynı zamanda tavuklarda kilo artışı görülmüştür [31].

Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* (VRE) ile enfekte (109 CFU) fareler üzerinde yapı-

lan çalışmada, tek doz İP (intraperitoneal) ve iki yüksek doz (109 ve 108 PFU) olmak üzere litik ENB6 ve C33 fajları kullanılmış ve VRE bakteriyemik farelerin tamamı iyileşmiştir. Bu bakterinin, linezolid, quinupristindalfopristin gibi yeni antibiyotiklere dahi direnç oluşturabilen süşları bulunmaktadır ve alternatif tedavi olarak önemli bir yere sahip olmuştur [3].

Farelerde, MRSA (Metisilin rezistans *S. aureus*) süşları da içeren *S. aureus*'a karşı bakteriyofaj ΦMR11 ile koruma çalışması yapılmıştır. İntraperitoneal olarak 8X10⁸ CFU *S. aureus* enjekte edilmiş farelerde bakteriyemi oluşmuş ve enfeksiyon ölümle sonuçlanmıştır. Periton içine ayrı bölgelerden bakteri ve saflaştırılmış faj suspansiyonu verilen farelerde ise ölümlerin baskılandığı gözlenmiştir. Bakteri eradike edilene kadar ΦMR11'in kanda önemli düzeylerde bulunduğu tespit edilmiştir [27].

İlaça dirençli bakteriler, su ürünleri yetiştiriciliğinde de problem olmuş ve balık patojenleriyle mücadele etmek için de fajlar kullanılmıştır. Aynı cinsi balıklardaki *Pseudomonas plecoglossicida* enfeksiyonuna karşı balıkların faj yoluyla korunması üzerine çalışılmıştır [33]. Sarıkuyruk cinsi balıklardaki *Lactobacillus garvieae* enfeksiyonuna karşı intraperitoneal ve oral faj uygulanmış, kontrol grubunda sadece %10 sağkalım, tedavi grubunda %100 iyileşme gözlenmiştir [30].

Fajın Uygulanma Şekilleri

Oral: Oral bakteriyofaj uygulamasının gastrointestinal hastalıkların ve bazı durumlarda sistemik hastalıkların tedavisinde başarılı olduğu gösterilmiştir. Bu uygulamada faj, yiyecek ve içeceklere ilave edilebilir ve kullanımı kolaydır. Patojenik hedef bakteriler, bağırsağa lokalize olduklarından oral yolla verilen fajlar bağırsaklara ulaşabilir. Yüksek mide asiditesi ve proteolitik aktiviteye karşı faj etkinliğinin korunması için polimer mikrokapsülleme, anti-asit uygulaması gibi metotlar kullanılabilir. Son zamanlarda, oral verilen bazı fajların dolaşım sistemi tarafından absorbe edilebildiği gösterilmiştir [35].

Lokal, topikal: Lokal ve topikal faj uygulamalarının başarılı olduğu, birçok çalışmayla literatürlerde yer almıştır. *Staphylococci*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus* ve *Escherichia*'dan kaynaklanan; konjunktivit, otit, gingivitis, furunkulozis, dekubitis

ülseri, açık yara enfeksiyonu, yanık, ostit (kırıklardan kaynaklanan), kronik suppuratif fistül gibi enfeksiyonların tedavisinde pyofaj gibi faj kokteylleri ile lokal ve/veya topikal uygulamalar yapılabilmektedir. *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *Streptococcus spp*'yi hedef alan, fajların yanı sıra siproflaksasin de içeren PhagoBioDerm adlı ticari ürün, doğrudan enfekte yaraların üzerine örtülerek, küçük parçalar ya da toz halinde yara üzerine dökülerek veya enfeksiyon bölgesinin içersine yerleştirilerek kullanılabilen bir üründür. Faj preparatındaki temel bir bileşen, yarayı iyileştirmenin yanı sıra, ölü dokuların uzaklaştırılmasını da sağlayarak fajın hızlı üreyen bakterilere erişimini kolaylaştırma özelliğindedir [14,37].

Aerosol: Genellikle sprey formunda kullanılmak üzere, kanatlılarda solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan etkenlere karşı faj tedavi çalışmaları yapılmıştır. Yakın zamanda beşeri tıpta invitro yapılan çalışmada bakteriyofaj solüsyonu nebulizatör kullanılarak uygulanmış ve iyi sonuçlar alınmıştır. Faj titrasyonunun aerosol faj uygulamasının başarısında önemli olduğu anlaşılmıştır [35].

Rektal: *E. coli* spesifik KH1 ve SH1 fajları sığırlara rektal yolla verildiğinde bağırsaklardaki O157 sayısında azalma olduğu tespit edilmiştir. Rusya'da rektal supozituar preparatları marketlerde satılmakla birlikte, rektal faj uygulamasının farmakokinetiği, daha fazla araştırılması gereken bir konudur [25].

Parenteral: İM (intramusküler), İP (intraperitoneal) ve SC (supkutane) uygulamalar, özellikle hayvan deneyi çalışmalarında en iyi sonuç alınan uygulama yöntemleri olmuştur. Pek çok çalışmada kullanılmıştır. Fajın, İV verildiğinde bağışıklık sistemi tarafından hızlı bir şekilde elimine edildiği anlaşılmıştır. Bu yöntemle ilgili çok az yayın bulunmaktadır [7].

Fajların Antibiyotiklerle Karşılaştırılması

1. Bakteriyofajlar, sadece bağırsaktaki patojenleri hedef alır, doğal mikroflorayı etkilemez. Bakteri türüne spesifiktirler.
2. Bakteriyofajların etki mekanizmalarının, tüm antibiyotiklerden farklı olması nedeniyle, çoklu antibiyotik direnci gösteren bakterilere karşı bile etkilidirler.
3. Bakteriyofajların sayıları, hedef hücre içersinde kendiliğinden üstel olarak çoğaldığından (otodozaj-

lama) optimum terapötik etki oluşturmak için, çoğu zaman tekrar dozuna gerek yoktur.

4. Fajların, damar yapısı bozuk olan dokulara nüfuz edebileceği ve kan-beyin bariyerini aşabileceğine dair kanıtlar vardır.
5. Bakteriyofajlar yan etki oluşturmazlar. Lizis sırasında ortaya çıkan endotoksinlerin neden olduğu hafif yan etkiler bildirilmiştir.
6. Litik fajla enfekte olan bakteri, canlılığını sürdürmeyeceğinden, bakterinin direnç oluşturma olasılığı azdır. Faj direnci geliştiğinde yeni bir fajın seçilmesi hızlı işleyen bir süreçtir, birkaç gün veya hafta sürer. Faja dirençli bakteriler, benzer hedef aralığındaki diğer fajlara duyarlı kalır.
7. Tedavi dışında profilaktik olarak da kullanılabilir.
8. Özellikle kronik enfeksiyonlarda antibiyotiklere tercih edilmeleri daha az maliyetli olabilir [1,5,16,29,31],

Önemli Kriterler

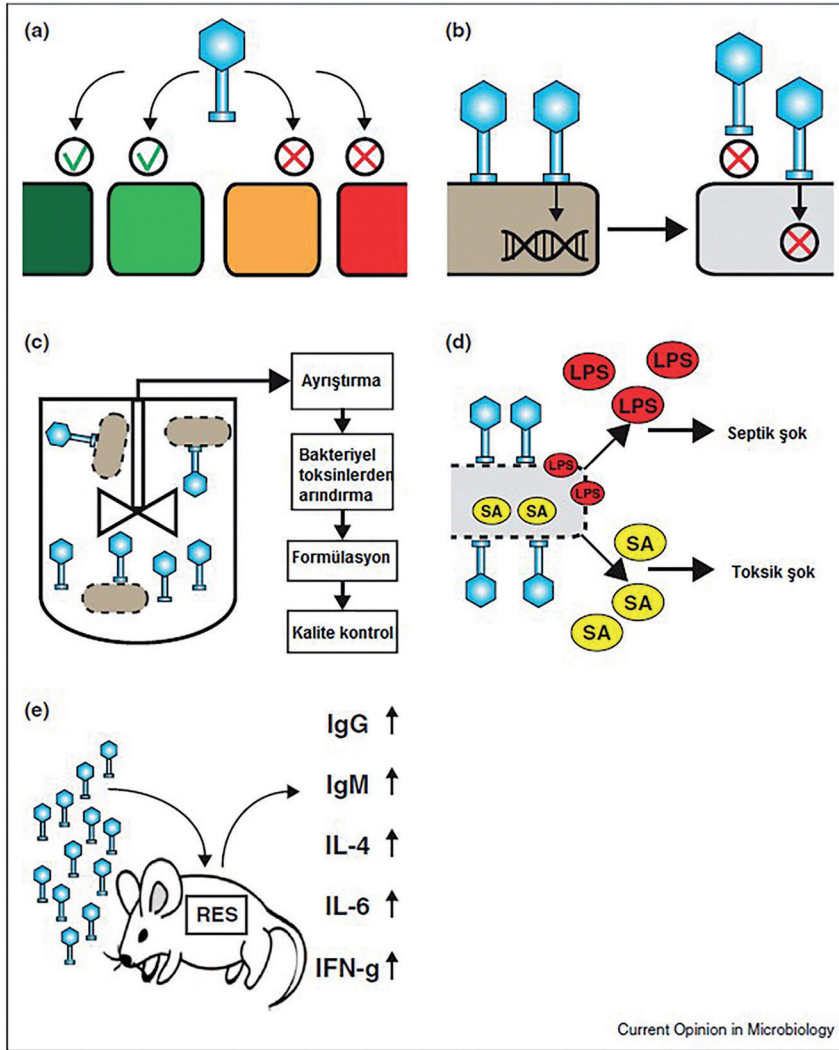
Faj seleksiyonu: Tüm fajlar tedavide kullanmaya uygun değildir. Bu nedenle doğru faj seçimi önemlidir. Tedavide kullanılacak faj(lar) kolay sağlanabilir ve hedef bakteriyi öldürecek kombinasyonda olmalı, normal koşullar altında ve sıcaklıkta stabilitesini korumalıdır. Konuyla ilgili etkinlik ve zararsızlık çalışmaları yapılmalı, hatta ideal olanı, tam sekansı belirlenerek, toksigen gibi istenmeyen genlerin olmadığı kesinleştirilmelidir. İlimli ve toksin taşıyan, hedef bakteriye karşı öldürme yeteneği zayıf olan fajlar tedaviye dahil edilmemeli ve seçilecek fajın bakteriler arasında gen transfer (transdüksiyon) potansiyeli düşük olmalıdır. Faj karakterizasyonu için, virion morfolojisine (elektron mikroskop ile), protein profiline, genotip özelliklerine bakılabilir. Sonuç olarak seçilecek fajın ilimli faj olmaması, hastayı etkileyecek virülens faktörleri taşımaması ve antibakteriyel virülensinin olması önemlidir ve bu tespitler için ideal olanı tam-genom sekans analizidir [1,5].

Konakçı Aralığının Darlığı: Yapılacak tedavi öncesinde, konakçı aralığı minimum seviyede tutularak patojenin spesifik faja duyarlılığı tespit edilmelidir. Fajlar, diğer antibakteriyellerle veya faj kokteylleri olarak kullanılırsa litik faj spektrumu genişletilebilir.

Fajların Farmasötik Özellikleri

Farmasötik olarak fajlar, protein temelli ve canlı ajanlar olduğundan hastanın immun sistemiyle etkileşime girme potansiyeli taşır. Bakteri hücrelerinin lize edilmesiyle serbest kalan bakteriyel toksinler, immun sistemle etkileşime girebilir (Şekil 2) . An-

cak protein bazlı ilaçlar, bakteriyel lizis oluşturabilecek kimyasal antibiyotikler, zayıflatılmış canlı aşılarda vücutta benzer etkiler gösterme potansiyeli taşımalarına rağmen kullanımlarına izin verilmiştir. Bu nedenle faj bazlı farmasötikler de değerlendirme dışı bırakılmamalıdır [1,5].



Şekil 2. Klinik faj tedavisinde karşılaşılabilecek engellere genel bakış [46]

- (a) Fajlar dar spektrumlu antimikrobiyal ajanlardır, bu nedenle geniş bir hedef bakteri spektrumuna karşı etkinlikleri olmayabilir.
- (b) Bakteriler, çeşitli intra ve ekstraselüler mekanizmalarla faja karşı direnç geliştirebilir.
- (c) Bakteriyofaj elde etme süreci; üretim, saflaştırma, formülasyon ve kalite kontrol olmak üzere çok basamaklıdır. Bu süreç, endotoksin ve lizisle ortaya çıkan diğer hücrel toksinlerin varlığı ve multifaj kokteyllerine ihtiyacın olması gibi nedenlerle karmaşıklaşır.
- (d) İn vivo hücre lizisi sırasında serbest kalan toksinler, sistemik inflamatuvar bir yanıtı tetikleyerek sepsis ve toksik şoka neden olabilir.
- (e) Bakteriyofaj konağın immun sistemi tarafından ortadan kaldırılabilir.

Sonuç

Yıllardır yapılan faj tedavi çalışmalarının geldiği noktada, etkin olmayan fajların, faj Yıllardır yapılan faj tedavi çalışmalarının geldiği noktada, etkin olmayan fajların, faj rezistans bakterilere karşı daha etkili olan mutant fajlar oluşturularak ya da yeni fajlarla güncellenmesi önem kazanmaktadır. Gürcistan ve Polonya’da, faj terapi merkezlerindeki faj bankalarında, düzenli olarak güncellenen çok sayıda farklı faj bulunmaktadır. Bazı durumlarda faj hastadan izole edilmekte (otofaj) ve bu prosedür birkaç gün ya da hafta sürmektedir. Ancak bu uygulamalar, geçerli ruhsatlandırma süreçlerine uygun bulunmamaktadır. Avrupa İlaç Ajansı (EMA - European Medicines Agency) bakteriyofajları, “Tıbbi Biyolojik Ürün” olarak kayıtlarına almıştır. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi’nin (US FDA- Food and Drug Administration) öne sürdüğü gerekli test sayısı ve araştırmalar, faj tedavisinin canlanmasını ciddi şekilde etkilemektedir. Otoritelerin yaklaşımına karşın, bazı firmalar pahalı lisanslama koşullarıyla ürünlerini pazarlamaktadır [34].

Gün geçtikçe küresel bir sorun haline gelen antibiyotik direnci ve antibiyotik kullanımının maliyetli olması; insanlarda ve evcil hayvanlarda, su ürünleri yetiştiriciliğinde, bazı bitkilerde patojen bakterilere karşı korunma-tedavide faj ve diğer alternatiflerin kullanılması konusunu zorunlu kılmaktadır. Fajlar, modern teknolojiler kullanılarak ve plasebo kontrollü çalışmalara devam edilerek, ilaç rezistans bakterilere karşı ve hâlâ duyarlı olan bakterilere karşı antibiyotiklerle birlikte kullanıldığında başarı şansı yüksektir. Veterinerlik ve kamu sağlığı alanında bu konuyla ilgili gelişmeler sağlanması, araştırma projelerinin mali olarak desteklenmesine bağlıdır [26].

Kaynaklar

1. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM, (2011). Phage treatment of human infections. *Landes Bioscience Journals, bacteriophage*,1, 66-85.
<http://www.landesbioscience.com/journals/bacteriophage/article/15845>
2. Barrow P, Lovell M, Berchieri AO Jr, (1998). Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 5, p. 294-98.
3. Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, B. Powell, Carlton R, Merril CR, (2002). Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun*.70, 204-210.
4. Bruttin A, Brussow H, (2005). Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents*. 49, 2874-2878
5. Carrillo CL, Abedon ST, (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1, 111-14 <http://www.landesbioscience.com/journals/bacteriophage/LocCarrilloBP1-2.pdf>
6. Chanishvili N, Chanishvili T, Tediashvili M, Barrow PA, (2001). Phages and their application against drug resistant bacteria, *J Chem Technol Biotechnol*.76, 689-699.
7. Clark JR, March JB, (2006). Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends in Biotechnology*. 24, 212-218.
8. Connerton PL, Loc CarrilloCM, Swift C, Dillon E, Scott A, Rees CED, Dodd CER, Frost J, Connerton IF, (2004). Longitudinal study of *Campylobacter jejuni* bacteriophages and their hosts from broiler chickens. *Appl environ microbiol*. 70, 3877-3883.
9. Fortier LC, Moineau S, (2009). Phage production and maintenance of stocks, including expected stock lifetimes. Martha R. J. Clokie, Andrew M. Kropinski (eds.), *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, characterization, and interactions*, humana press, a part of springer science,business media. 501, 203-219
10. Fortuna W, Międzybrodzki R, Dąbrowska B, Dąbrowska W, Górski A, (2008). Bacteriophage therapy in children: Facts and prospects. *Med Sci monit*. 14, 126-132.
11. Gill JJ, Hyman P, (2010). Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. 11, 2-14
12. Gill JJ, Pacan JC, Carson ME, Leslie KE, Griffiths MW, Sabour PM, (2006a). Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. *Antimicrob agents chemother*. 50, 2912-2918
13. Gill JJ, Sabour PM, Leslie KE, Griffiths W, (2006b). Bovine whey proteins inhibit the interaction of *Staphylococcus aureus* and bacteriophage K J. *Appl Microbiol*. 101, 377-386
14. Goodridge LD, (2010). Designing phage therapeutics, 11, 15-27.
15. Gürgün V, Halkman K, (1990). Mikrobiyolojide sayım yöntemleri. Gıda Teknolojisi Derneği. Yayın no 7. <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAAF6AA849816B2EF10F86F55954CBB47>
16. Hanlon GW, (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *IJAA*. 30, 118-128.
17. Haq UI, Chaudhry WN, Akhtar MN, Andleeb S, Qadri I, (2012). Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virology Journal*. (9), 1-9.
18. Hawkins C, Harper D, Burch D, Anggard E, Soothill J, (2010). Topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* otitis of dogs with a bacteriophage mixture: A before/after clinical trial. *Veterinary microbiology*. (146) 309-313.
19. Hudson JA, Billington C, Carey-Smith G, Greening G, (2005). Bacteriophages as biocontrol agents in food. *Journal of Food Protection*, 68, 426-437

20. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM, (2003). Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an Escherichia coli respiratory infection. Poultry science. 82, 1108-1112.
21. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Xie H, Moore PA, Donoghue AM, (2002). Prevention of Escherichia coli respiratory infection in Broiler chickens with bacteriophage (SPR02). Poultry Science. 81, 437-441.
22. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM, (2004). Therapeutic efficacy of bacteriophage and Baytril (Enrofloxacin) individually and in combination to treat Colibacillosis in broilers. Poultry science. 83, 1944-1947.
23. Johnson RP, Gyles CL, Huff WE, Ojha S, Huff GR, Rath NC, Donoghue AM, (2008). Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs. Cambridge University Press ISSN 1466-2523, Animal Health Research Reviews. 9, 201-215
24. Kramberger P, Honour RC, Herman RE, Smrekara F, Peterka M, (2010). Purification of the Staphylococcus aureus bacteriophages VDX-10 on methacrylate monoliths, 166, 60-64
25. Letarov AV, Golomidova AK, Tarasyan KK, (2010). Ecological basis for rational phage therapy. Acta naturae. 2, 60-72.
26. Levin BR, Bull JJ, (2004). Population and evolutionary dynamics of phage therapy. Nature Reviews Microbiology. 2, 166-173.
27. Matsuzaki S, Yasuda M, Nishikawa H, Kuroda M, Ujihara T, Shuin T, Shen T, Jin Z, Fujimoto S, Nasimuzzaman MD, Wakiguchi H, Sugihara S, Sugiura T, Koda S, Muraoka A, Imai S, (2003). Experimental protection of mice against lethal Staphylococcus aureus infection by novel bacteriophage ϕ MR11. JID. 2003, 187, 613-624.
28. Merrill CR, Biswas B, Carlton R, Jensen NC, Creed GJ, Zullo S, Adhya S, (1996). Proc. Longcirculating bacteriophage as antibacterial agents. Natl Acad Sci USA. 93, 3188-3192.
29. Międzybrodzki R, Fortuna W, Dąbrowska BW, Górski A, (2007). Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment. Postepy Hig Med Dosw. 61, 461-465.
30. Nakai T, Park SC, (2002). Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. Research in Microbiology. 153, 13-18.
31. O'Flaherty S, Ross RP, Coffey A, (2009). Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. FEMS. 33, 801-819.
32. Parisien A, Allain B, Zhang J, Mandeville R, Lan CQ, (2007). Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. J Appl Microbiol. 104, 1-13.
33. Park SC, Shimamura I, Fukunaga M, Mori K-I, Nakai T, (2000). Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, Pseudomonas plecoglossicida, as a candidate for disease control. APPL environ microbiol. 66, 1416-1422.
34. Pirnay JP, De Vos D, Verbeken G, Merabishvili M, Chanishvili N, Vaneechoutte M, Laire MZG, Lavigne R, Huys I, Mooter GV, Buckling A, Debarbieux L, Pouillot F, Azeredo J, Kutter E, Dublanchet A, Górski A, Adamia R, (2011). The phage therapy paradigm: prêtàporter or surmesure? Springer Science Pharm Res. 28, 934-937.
35. Ryan EM, Gorman SP, Donnelly RF, Gilmore BF, (2011). Recent advances in bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 63, 1253-1264.
36. Sheng H, Knecht HJ, Kudva IT, Hovde CJ, (2006). Application of bacteriophages to control intestinal Escherichia coli O157:H7 levels in ruminants. APPL Environ Microbiol. 72, 5359-5366.
37. Slopek S, Weber-Dabrowska B, Dabrowski M, Kucharewicz- Krukowska A, (1987). Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. Arch Immunol Ther Ex. 35: 569-583.
38. Smith HW, Huggins MB, (1982). Successful treatment of experimental Escherichia coli infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. J gen microbiol. 128, 307-318.
39. Smrekar F, Ciringer M, Peterka M, Podgornik A, Strancar A, (2008). Purification and concentration of bacteriophage T4 using monolithic chromatographic supports. J Chromatogr AnalytTechnol Biomed LifeSci. 861, 177-180.
40. Soothill J, Hawkins C, Anggård E, Harper D, (2004). Therapeutic use of bacteriophages. The Lancet Infectious Diseases. 4, 544-545.
41. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris Jr JG, (2001). Bacteriophage therapy. ASM Antimicrob Agents Chemother. 45, 649-659.
42. Summers WC, (2001). Bacteriophage therapy. Annu Rev Microbiol. 55, 437-451.
43. Ustaçelebi Ş, Okuyan M, Odabaşıoğlu N, (1968). T4 R mutant bakteriyofajları ile serolojik deneyler ve normal insan serumlarının faj enfeksiyonunda stimulan etkisi. Mikrobiyoloji Bülteni. 4, 131-141.
44. Weber-Dabrowska B, Mulczyk M, Gorski A, (2003). Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man. Transplant Proc. 35, 1385-1386
45. Weber-Dabrowska B, Mulczyk M, Gorski A, (2001). Bacteriophage therapy for infections in cancer patients. Clin Applied Immunol Rev. 1, 131-134.
46. Yoshida K, Nasau Y, Shitami N, Toyoda H, Takemura H, Oomori K, (2009). A novel convenient method for high bacteriophage titer assay. Oxford University Press, Nucleic Acids Symposium Series. 53, 315-316.
46. Lu TK, Koeris MS, (2011). The next generation of bacteriophage therapy. Current opinion in microbiology. 14, 524-31.

MikroRNA'lar ve Atlarda MikroRNA'lar ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Seda Ekici¹, Özge Özmen²

¹ Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Gıda Kontrol Laboratuvarı, Ankara

² Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Genetik AD, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 03.09.2015, Kabul Tarihi / Accepted: 10.02.2016

Özet: MikroRNA'lar (miRNA) 18-25 nükleotit (nt) uzunluğunda genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgelerindeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan, fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, fonksiyonel RNA molekülleridir. Tüm canlılarda çeşitli fiziksel ve patolojik kondisyonlarda post-transkripsiyonel gen düzenleyici olarak miRNA'ların rolü evcil hayvanlar da dahil birçok organizmanın incelenmesiyle aydınlanmaktadır. miRNA'ların gen ekspresyonunda, fenotipik değişkenliğin şekillenmesinde ve hastalık gelişiminde regülatör olarak önemli rollerinin olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmaların ışığı altında miRNA'ların önemi son zamanlarda Veteriner Hekimlikte de fark edilmiştir. Taşıma ve eğlence için kullanılan, aynı zamanda ekonomik değere sahip evcil at (*Equus caballus*), insan uygarlığının çok önemli bir parçası olmuştur. Tıbbi açıdan at ile insan arasında alerji ve osteoartrit gibi 90'dan fazla kalıtsal hastalık ortaklıktır. Biyomekanik ve egzersiz fizyolojisi çalışmalarında en iyi model organizma attır. İnsanlık tarihi için at bu kadar önemli bir organizma olmasına rağmen, atlarda miRNA'lar ve miRNA'ların klinik kondüsyonlar üzerine etkisi hakkındaki çalışmalar oldukça azdır. Bu derleme miRNA'lar ve atlarda miRNA'lar ile ilgili yapılan çalışmalar hakkında bilgi vermek amacıyla hazırlanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Equus caballus*, mikroRNA, mRNA

MicroRNA's and Studies Performed on Horses Concerning MicroRNA's

Abstract: MicroRNA's (miRNAs) are the functional RNA molecules consisting of about 18- 25 nucleotides (nt), transcribed but not translated to proteins through genes those are at the protein coding introns or exons on the genom. The role of miRNAs as a post-transcriptional regulator in all organisms on various physical and pathological conditions as enlightening through examining the organisms including domestic animals. miRNA's have been found to play critical roles on gene expression, occurrence of phenotypic variations and as regulators on disease development. In scope of the studies performed recently, the importance of miRNA's were realized on Veterinary Medicine *Equus caballus* (domestic horse) has been a very important part of the human civilization since it is used for transportation and fun in addition to its economic value. Medically, over 90 hereditary diseases such as allergies and osteoarthritis are common between horse and human. The best model organism for studying biomechanics and exercise physiology are the horses. In spite of being such and important organism for the human history, studies related to miRNA's at horses on effect of miRNA's on clinical conditions of horses are very few. This review is prepared in order to give information about miRNA's and limited in horses miRNA studies performed on horses

Key words: *Equus caballus*, mikroRNA, mRNA

Giriş

Memeli genomunun sadece %3' lük kısmı protein kodlayan mRNA'ları ifade etmektedir. Geri kalan % 97' lik kısım ise uzun ve kısa protein kodlamayan RNA' lardan oluşmaktadır [6]. Proteine çevrilemeyen RNA'lara kodlamayan RNA (ncRNA) adı verilmektedir [3,10]. Evrimsel açıdan korunmuş dizilere sahip ncRNA'lar biyolojik reaksiyonların katalizlenmesinden, hücrel savunmaya, gelişimsel süreçlerden hücrel cevaba kadar pek çok göreve sahiptirler [26]. ncRNA'ların diğer işlevleri arasında transkripsiyonel ve post transkripsiyonel

gen susturumu ve kromozomların yeniden modellenmesi de yer almaktadır. Çok sayıda tipi bulunan ncRNA'lar, yaşam için gerekli ve düzenleyici ncRNA'lar olarak iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Yaşam için gerekli ncRNA'lar canlıların bütün dokularında bulunarak çok sayıda işlevleri yerine getirirken, gen ifadesinin düzenlenmesinde işlevleri olan düzenleyici ncRNA'lar ise nt sayılarına göre uzun ncRNA (>200 nt) ve kısa ncRNA (<200 nt) olarak iki alt sınıfa ayrılmaktadır [21]. X kromozomunun inaktivasyonundan sorumlu Xist ve Tsix RNA, embriyonik pluripotent hücrelerinin üreme hücrelerine

farklılaşmasında ve transkripsiyonunda işlev gören Long intergenic non-coding RNA (LincRNA) ve mRNA'nın post transkripsiyonel düzenleyicisi olan circular RNA (circRNA)'lar uzun ncRNA sınıfına, mRNA'nın transkripsiyonel düzenleyicisi olarak işlev yapan short interfering RNA (siRNA), mikroRNA (miRNA) ve eşey hücrelerinde transpozon ve retroelementlerin baskılanmasından sorumlu olan P-element induced wimpy testis RNA (piwiRNA)'lar ise kısa ncRNA sınıfına girmektedirler [21,39].

miRNA'ların Genomik Organizasyonu

miRNA'ların kromozomal yerleşimleri kendilerinin anlatımını ve işlevlerini etkilemektedir. Bu nedenle miRNA genomik organizasyonunun bilinmesi önemlidir [27]. miRNA'ların yaklaşık yarısı küme yerleşimi gösterir. Küme şeklinde olan miRNA'lar operon benzeri bir yapıya sahip olup, polisistronik (Birden fazla proteinin genetik koduna sahip) olarak transkripsiyona uğrar [33,34]. Kümelenmiş miRNA'ların önemli bir özelliği de türler arasında korunmuş olması, homolog miRNA'ların tüm türlerde gözlenmesidir [28]. miRNA'lar genler arası/gen içi ve intronik/ekzonik yerleşime göre gruplandırılmaktadır [14,40].

miRNA Biyogenez

miRNA'lar işlevlerini çoğunlukla mRNA'nın 3' ucuna edilmeyen bölgesine (3' UTR) bağlanarak, daha azınlıkta 5'-UTR, ORF (open reading frame) ya da promotör bölgelerine bağlanarak yapmaktadırlar [13,31,32]. DNA'dan ilk olarak çoğunlukla RNA polimeraz II veya azınlıkta RNA polimeraz III enzimleri tarafından >1000 nt uzunluğunda olgun miRNA'nın öncül transkripti olan birincil-miRNA (pri-miRNA) sentezlenir [8,34]. Karakteristik mRNA gibi pri-miRNA'ların 5' ucunda 7 metilguanozin başlığı ve 3' ucunda poli A kuyruğu bulunmaktadır [36,38,42]. Tek zincirden oluşan pri-miRNA'lar kendi üzerinde kıvrılarak saç tokası yapısını oluştururlar. Çekirdek RNAaz III endonükleaz ailesinden olan Drosha enzimi, alt ünitesi ile birleşerek pri-miRNA'yı keser ve kesilen miRNA'lar 70-100 nt uzunluğunda olup öncü miRNA'ya (pre-miRNA) dönüşürler [13,19]. pre-miRNA nükleer transport reseptör (Exportin 5) ile çekirdekte sitoplazmaya geçerek sitoplazmada RNAaz III ailesinden Dicer

enzimi, alt ünitesi ile birleşir ve pri-miRNA'nın saç tokası yapısını keser. Dicer enzimi tarafından kesilen RNA'lar 3' uçlarında 2 nt'lik çıkıntı kalacak biçimde 18-25 nt uzunluğunda kısa çift iplikli olgun miRNA'lara dönüşürler [14]. Çift iplikli miRNA'ların bir ipliği Argonuate-2 (Ago-2) bağlı RISC enzim kompleksine bağlanarak hedef mRNA'nın 3'UTR, 5'UTR, ORF bölgelerine ya da promotör bölgelerine bağlanarak ya da mRNA'yı parçalayarak translasyonu engeller [21,23]. miRNA'ların tipik yolaklarının dışında atipik yolaklar da tanımlanmış ve bu yolakların ortaya çıkış nedeni henüz belirlenmemiştir. Bu yolaklar Drosha- bağımsız yolaklar ve Dicer bağımsız yolaklar olmak üzere ikiye ayrılırlar [15,22,30,43]. Atipik miRNA yolaklarını seçen bu RNA'lar kırılma yapmaksızın henüz belirlenemeyen bir mekanizma ile kısa pre-miRNA benzeri saç tokası yapısı oluştururlar ve doğrudan Dicer enzimi ile kesime uğramaktadırlar. Ayrıca tRNA benzeri yapılar, pre-tRNA ve endo-siRNA yapıları da Drosha enzimine gerek duymadan olgun miRNA'yı oluşturmaktadırlar [13,18,20,24].

Atlarda Belirlenen miRNA'lar

miRNA'ların gen ekspresyonunda, fenotipik değişkenlik şekillenmesinde ve hastalık gelişmesinde regülatör olarak önemli rollerinin olduğu tespit edilmiştir [7,9,11]. Atlarda miRNA'lar ile ilgili ilk çalışma Zhou ve ark. (2009) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada; 354 olgun at miRNA'ları belirlemek ve tanımlamak için in silico (RNA veri tabanları) analitik yöntem kullanılmıştır. At sperminde 82 adet yeni miRNA'nın varlığı tespit edilmiştir ve sperm fonksiyonları, fertilitate ve üremenin düzenlenmesinde miRNA'ların rolünün olduğu düşünülmüştür [44,45].

Barrrey ve ark. (2010) tarafından direkt klonlama teknolojisi kullanılarak sağlıklı ve miyopatik atlarda kas dokusunda miRNA'ların ifade profili belirlenmiştir [5]. Kalıtsal kas hastalığı olan atların kan örneklerinde kas-spesifik miRNA'ların varlığını tespit edilmiş ve atlarda kas patoloji tanısı için minimal invazif metodoloji ile yeni miRNA'ların geliştirilmesine olanak sağlanmıştır [5,9].

Kim ve ark. (2014) Yeni Nesil Sekans (YNS) teknolojisi kullanarak iskelet kasları, kolon ve karaciğer dâhil normal at dokularından elde ettikleri örnekler ile yaptıkları çalışmada; 292 adet bilinen

ve 329 adet yeni miRNA identifiye etmişlerdir. Sekiz safkan attan aldıkları iskelet kasında, karaciğerde ve kolonda yüksek verimlilikte miRNA'ların 21838589 ile 11973300 arası değişen sayılarda kısa okuma sekanslarının sonucu ile elde edilen % 100 yüksek kalitede cDNA kütüphanesini oluşturmuşlardır. Kim ve ark. (2014) tarafından atlarda kas, kolon ve karaciğer dokularında bulunan miRNA'ların uzunlukları ve dağılımları belirlenmiş ve bu miRNA'ların yaklaşık % 83'ünün sekansları 20-24 nt aralığında yoğunlaştığı bulunmuştur. Ayrıca elde edilen miRNA'larda en sık rastlanan uzunluğun tüm dokularda 23 nt olduğu tespit edilmiştir [29].

Atlarda miRNA'ların dokulara göre profili

Organ veya dokular için miRNA'nın ekspresyon profili göz önüne alındığında organ spesifik miRNA'ların alt kümelerini keşfetmek klinik olarak hastalıklar açısından önemlidir. Atlarda, karaciğer, iskelet kası ve kalın bağırsak dâhil olmak üzere başlıca organlarda miRNA'ların karakterizasyonunun yapılması önemli at hastalıkları ile yakından ilişkilidir. Kim ve ark. (2014) tarafından at dokularında bilinen miRNA'ları analiz edilmiş ve alt kümeler şeklinde dokuya özel miRNA'lar (kas dokusunda 36, kolon örneklerinde 99 ve karaciğerde 31) tespit edilmiştir. İkincil yapılarda, Dicer bölünme mevkilerinin ve bilinmeyen miRNA'ların minimum serbest enerjileri de belirlenmiştir. Bu analizler ile atlarda 329 adet bilinmeyen miRNA sekansı yeni aday miRNA olarak belirlenmiştir. Atlarda miRNA'lar dokuya özel bir biçimde eksprese edilip; kas örneklerinde 31, kolon örneklerinde 123 ve karaciğer örneklerinde 45 yeni miRNA tespit edilmiştir. Kolona özgü miRNA'ların kolonun düzenleyici sisteminde daha karmaşık rolleri olduğu ortaya koyulmuştur [17,29].

Atlarda miRNA'ların Kromozomal Dağılımı

Atlarda toplam 292 bilinen miRNA, 29. ve 31. kromozomlar hariç diğer kromozomlar arasında haritalanmıştır [35]. Yaklaşık 160 adet miRNA'nın 3 kb büyüklüğündeki bir bölgede bir arada lokalize olduğu tespit edilmiştir. At genomunda miRNA'ları kodlayan genler 51. farklı küme halinde bireysel kromozomlar üzerinde değişik bölgelerde lokalize olmuştur. Örneğin, 24. Kromozomda 4 miRNA kümesinde 40 miRNA geni bulunurken 6, 12, 14, 16, 18 ve 20. kromozomlarda sadece 2 miRNA geni bulunmaktadır.

At miRNA'larında Nükleotid Dağılım Eğilimleri

miRNA'nın 5' uç dizilerinin karakterizasyonu önemlidir çünkü miRNA'nın çekirdek sekansı miRNA'nın hedef mRNA'ya bağlanmasında kritiktir [1, 14]. Ökaryotlarda miRNA'ların nükleotid sekans analizi 5' pozisyonu açık bir şekilde "U" ve "A" için eğilimlidir [16]. Kim ve ark. (2014) at genomunda dokuya özel miRNA'ların 5' ucunda en sık nükleotidin "U" olduğunu ve ardından A'in geldiğini ortaya koymuştur ve bu bulgular diğer organizmalar ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile tutarlıdır [2]. Atlarda tüm doku miRNA'larının üçüncü ve altıncı pozisyonlarda "C+G" yüzdelerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. miRNA çekirdek dizisindeki 6. pozisyondaki "C+G" içeriği miRNA için fonksiyon düzenleyici ve uyarıcı etkisi vardır. Kolondaki miRNA'lar farklı organlara göre bütün miRNA çekirdek nükleotidlerinde daha yüksek "C+G" oranına sahip olması kolonun fonksiyonlarındaki farklılıktan kaynaklanabilir [2]. Organ-spesifik miRNA'ların 5' ucundaki ilk nükleotidi kas, kolon ve karaciğer dokularında sırasıyla % 40, % 35 ve % 43 sıklıkla "U"dir. Aynı şekilde, atlarda 18-19 nükleotid uzunluktaki miRNA'lar az olmasına rağmen sadece kolonda 18 ve 19 nükleotid uzunluğundaki miRNA'ların 5' ucunda "G" ve "A" bulunur. miRNA'ları oluşturan nükleotidler arasında "A+U" dağılımı, ortalama % 72 olarak hesaplanmıştır. Ancak; tüm dokularda 3'ten 6'ya kadar olan nükleotid pozisyonunda "C+G" oranı "A+U" oranından daha fazladır. Ayrıca kolon miRNA'sında 2'den 8'e kadar olan miRNA çekirdeğine sahip olan nükleotid pozisyonlarında "C+G"nin, "A+U"e göre daha fazla olduğu belirlenmiştir [12,37].

Atlarda Polisistronik miRNA'ların Kromozomal Lokalizasyonları

miRNA'ların biyogenezi ya monosistronik (tek bir gene ait) ya polisistronik (birden fazla gene ait) lokusların transkripsiyonu ile başlatılır [4,8,25]. miRNAların yaklaşık yarısı küme yerleşimi gösterir [34]. Kümelenmiş miRNA'ların önemli bir özelliği de türler arasında korunmuş olması, homolog miRNA'ların tüm türlerde gözlenmesidir. Bu nedenle miRNA'ların kromozomlar üzerinde polisistronik dağılımı önemlidir [28].

Kim ve ark. (2014) ve Zhou ve ark. (2009) at genomunda kromozom 17 üzerinde miR-17-92 kü-

mesini saptamıştır. Bu kümenin miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a ve miR-92'yi barındıran ve insan dâhil tüm omurgalılarda iyi korunan bir küme olduğu bilinmektedir. Memelilerde miR-17-92 kümesi iki miR-106b-25 ve miR-106a-363 adında paraloglara (bir tek genomda gen ikilenmesi ile oluşmuş ve işlevleri farklılaşmış) ayrılmıştır. Ayrıca 13. kromozom üzerinde lokalize olmuş eski küme ve X kromozomunda lokalize olmuş son kümeler tespit etmişlerdir.

Kim ve ark. (2014) bilinen miRNA'ların yaklaşık % 53'ünün bir polisistronik birimin bir parçası olarak gözlemlendiğini ortaya koymuştur. İnsan verileri ile karşılaştırıldığında atta kromozomal konumda kısmi farklılık olsa da miRNA'ların kümelene özelliğinin korunmuş olduğu ortaya çıkmıştır. Atlarda polisistronik birimlerdeki miRNA'ların oranı (% 50) zebrabalıklarının miRNA'ları ile benzerdir ve miRNA kümelerinin yaklaşık % 72'si hesaplama analizi ile tespit edilmiş at miRNA'ları ile aynıdır [41]. Ancak polisistron pozisyonlarda olduğu düşünülen 160 adet miRNA'nın 45'i in silico yapılan çalışmalarda ortolog pozisyonda tespit edilememiştir. Bunun nedeni olarak farklı miRNA kümelenemeleri gösterilmektedir. İn silico analizde BLAST tarafından belirlenen limitli miRNA'lardan faydalanılırken bu çalışmada miRNA kümeleme, YNS teknolojisi dizi verilerine dayanarak yapılmıştır. Zhou ve ark. (2009) 2. kromozom üzerindeki miR-302a, -302b, -302c, -302d ve -367 ve X kromozom üzerindeki miR-1912 ve -1264'i, polisistronik miRNA'lar olarak bildirmiştir. Kim ve ark. (2014) tarafından bulunan polisistronik miRNA'lar Zhou ve ark. (2009) tarafından rapor edilmemiştir. Elde edilen bulgular at miRNA'ları için kümelene özelliğinin ortaya çıkarılması için daha fazla çalışma yapılmasının gerekliliğini göstermektedir.

Sonuç

Bu bilgiler ışığında at genomunda miRNA üzerine yapılan çalışma sayısının oldukça sınırlı olduğu belirlenmiştir. YNS teknolojisi kullanılması ile atta normal dokularda bilinen 292 ve yeni 329 miRNA tespit edilmiş ve önemli ölçüde at miRNA veritabanını zenginleştirdiği ve at miRNA'ları için değerli bir referans oluşturduğu ortaya çıkmıştır. Buna ek olarak, at dokularında genel miRNA ifade profili miRNA'ların birbirinden ayrı bir doku-spesifik bir

şablonda ifade olduğu bulunmuştur. miRNA'nın sekansı, kromozomlar üzerindeki dağılımı ve kümelene özellikleri atta miRNA'ların biyolojik işlevlerinin aydınlatılmasında önemlidir. miRNA'lar doku gelişimi ve spesifik dokuların işlevinde önemli bir rol oynamaktadır ve bu nedenle, çeşitli patofizyolojik durumlarda çok değerli bir biomarker olarak geliştirilebilir.

Kaynaklar

1. Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, Li K, Yu B, Li Z, Wang R, Wang L, Li Q, Wang N, Shan H, Li Z, Yang B, (2009). Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun.* 391(1):73-7.
2. Ai L, Xu M, Chen M, Zhang Y, Chen S, (2012). Characterization of microRNAs in *Taenia saginata* of zoonotic significance by Solexa deep sequencing and bioinformatics analysis. *Parasitol Res* 110: 2373–2378.
3. Akkaya Z, Dinçer P, (2013). Tedavi yaklaşımlarında yeni bir dönem: Kodlamayan RNA'lar ve hastalıklar. *Marmara Medical Journal*; 26: 5-10
4. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9: 277-99.
5. Barrey E, Bonnamy B, Barrey E, Mata X, Chaffaux S, (2010). Muscular microRNA expressions in healthy and myopathic horses suffering from polysaccharide storage myopathy or recurrent exertional rhabdomyolysis. *Equine Vet J* 42: 303–310.
6. Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot Project. *Nature*.447: 799-816.
7. Boggs RM, Wright ZM, Stickney MJ, Porter WW, Murphy KE, (2008). MicroRNA expression in canine mammary cancer. *Mamm Genome* 19: 561–569.
8. Borchert GW, Davidson BL, (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13:1097-101.
9. Buza T, Arick M, Wang H, Peterson DG, (2014). Computational prediction of disease microRNAs in domestic animals. *BMC Research Notes* 7: 403.
10. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*. 309:1559-63.
11. Carrington JC, Ambros V, (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Sci Signal* 301: 336–338.
12. Creighton CJ, Reid JG, Gunaratne PH, (2009). Expression profiling of microRNAs by deep sequencing. *Brief Bioinform* 10: 490–497.
13. Curtis HJ, Sibley CR, Wood MJA, (2012). Mirtrons, an emerging class of atypical miRNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3: 617-32.

14. Engels B, Hutvagner G, (2006). Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* 25: 6163–6169.
15. Fan P, Chen Z, Tian P, Liu W, Jiao Y, Xue Y, (2013). miRNA biogenesis enzyme drosha is required for vascular smooth muscle cell survival. *PLoS ONE*. 8: 1-11.
16. Frank F, Sonenberg N, Nagar B, (2010). Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* 465: 818–822.
17. Galuppo L, Snyder J, Pascoe J, (1995). Laparoscopic anatomy of the equine abdomen. *Am J Vet Res* 56: 518–531.
18. Griffiths-Jones S, (2004). The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res.*, Database issue 32: D109-11.
19. Grishok A, Pasquinelli A E, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, (2001). Genes and Mechanisms Related to RNA Interference Regulate Expression of the Small Temporal RNAs that Control *C. elegans* Developmental Timing. *Cell* 106: 24-34.
20. Guo L, Lu Z, (2010). The Fate of miRNA* Strand through Evolutionary Analysis: Implication for Degradation As Merely Carrier Strand or Potential Regulatory Molecule. *PLoS One*. June 30; 5(6):e11387
21. Güzelgöl F, Aksoy K, (2015). Bir Gen İfade Düzenleyicisi miRNA. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 24(4): 472-493.
22. Havens MA, Reich AA, Duelli DM, Hastings ML, (2012). Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Res* 40: 4626-40.
23. He L, Hannon GJ, (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5: 522-31.
24. Hentze MW, Preiss T, (2013). Circular RNAs splicing's enigma variations. *EMBO J*. 32: 923-5.
25. Jha A, Mehra M, Shankar R, (2011). The regulatory epicenter of miRNAs. *J Biosci*. 36: 621-8.
26. Kaikkonen MU, Lam MT, Glass CK, (2011). Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc Res* 90: 430-40.
27. Kim, YK, Kim VN, (2007). Processing of intronic microRNAs. *EMBO J*. 26: 775–783.
28. Kim, VN, Han J, Siomi MC, (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Rev. Mol. Cell Biol* 10:126–139
29. Kim MC, Lee SW, Ryu DY, Cui FJ, Bhak J, Kim Y, (2014). Identification and Characterization of MicroRNAs in Normal Equine Tissues by Next Generation Sequencing. *PLoS ONE* 9(4): e93662.
30. Ladewig E, Okamura K, Flynt AS, Westholm JO, Lai EC, (2012). Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. *Genome Res*. 22: 1634-45.
31. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP, (2001). An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:858-62.
32. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with anti-sense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75: 843-54.
33. Lee RC, Ambros V, (2001). An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 862-64.
34. Lee Y, Kim M, Han J., Yeom KH., Lee S. And Baek SH. et al, (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 23:4051-60.
35. Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C, (2007). Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 8: 166.
36. Lund E., Güttinger S., Calado A., Dahlberg JE., Kutay U, (2004). Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* 303:95-8.
37. Olena AF, Patton JG, (2010). Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol*. Mar;222(3):540-5.
38. O'toole AS, Miller S, Haines N, Zink MC, Serra MJ, (2006). Comprehensive thermodynamic analysis of 3' double-nucleotide overhangs neighboring Watson-Crick terminal base pairs. *Nucleic Acids Res*. 34: 3338-3344.
39. Pauli A, Rinn JL, Schier AF, (2011). Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis. *Nat Rev Genet* 12: 136-49.
40. Ruvkun G, (2001). Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 294: 797–799.
41. Thatcher EJ, Bond J, Paydar I, Patton JG, (2008). Genomic organization of zebrafish microRNAs. *BMC Genomics* 9: 253.
42. Treiber T, Treiber N, Meister G, (2012). Regulation of microRNA biogenesis and function. *Tromb Haemotology* 107:605-10.
43. Westholm JO, Lai EC, (2011). Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie* 93: 1897-904.
44. Zhou M, Wang Q, Sun J, Li X, Xu L, (2009). In silico detection and characteristics of novel microRNA genes in the *Equus caballus* genome using an integrated ab initio and comparative genomic approach. *Genomics* 94: 125–131.
45. Zhou M, Wang Q, Sun J, Li X, Xu L, Yang H, Shi H, Ning S, Chen L, Li Y, He T, Zheng Y, (2013). MicroRNA-mediated gene regulation: potential applications for plant genetic engineering. *Plant Mol Biol*. 83(1-2):59-75.

Su Samurlarında (*Lutra lutra*) Görülen Hastalıklar

Banur Boynukara¹ Timur Gülhan²

¹Namık Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun

Geliş Tarihi / Received: 25.02.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 03.05.2016

Özet: Su samuru (*Lutra lutra*) yarı-sucul yaşayan, etçiller takımının sansargiller familyasında yer alan avcı bir hayvandır. Ekolojik dengenin göstergesi konumundaki bu hayvanlar dünyanın pek çok ülkesinde olduğu gibi ülkemizde de nesli tükenme noktasına geldiği için koruma altına alınmıştır. Su samurlarının mikrobiyal florası çok değişkenlik göstermesine rağmen, viral, bakteriyel, mantar ve paraziter hastalıklardan etkilenebilmektedirler. Pek çok evcil ve yabani hayvan türünde olduğu gibi insan popülasyonları ile zaman zaman temas halinde oldukları için, özellikle taşıdıkları zoonoz etkenler açısından bu hayvanlarda görülen hastalıkların detaylı olarak incelenmesi önem arz etmektedir.

Anahtar kelimeler: Hastalık, Su samuru (*Lutra lutra*)

Diseases in Otters (*Lutra lutra*)

Abstract: The otter (*Lutra lutra*) is a hunter animal living a semi-aquatic in located Mustelidae family of carnivorous order. Indicator positions in the ecological balance of these animals as well as in many countries of the world in our country are also protected because it came to the point of extinction. Although the microbial flora of the otters much variability, they may be affected from viral, bacterial, fungal and parasitic diseases. It is important detailed examination of diseases in these animals, especially in terms of zoonotic agents; because of they are sometimes in contact with human populations as well as many domestic and wild animals.

Key words: Disease, Otter (*Lutra lutra*)

Giriş

Türkiye’de bilinen 160 memeli türü vardır. Bunların yaklaşık 120’si yasalar kapsamında koruma altına alınmış ve 11’i de belirli dönemlerde avına izin verilen yaban hayvanları arasında yer almaktadır. Ülkemizdeki memeli hayvan türü sayısı pek çok Avrupa ülkesinden daha fazladır. Ancak ekosistemdeki olumsuz gelişmeler nedeniyle bazı türlerin nesilleri tükenme noktasına gelmiştir. Nesli tükenme noktasına gelen memeli türlerinden bir tanesi de su samuru (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758)’dur [28].

Su samurları, etçiller (Carnivora) takımında, sansargiller (Mustelidae) familyasında, yer alan yarı-sucul avcı hayvanlardır. *Lutra lutra*’nın bilinen on altı türü bildirilmektedir (Tablo 1). Ayrıca, kesin olarak bilinmeyen *Angustifrons*, *Roensis*, *Splendida*, *Stejnegeri* olmak üzere 4 alt tür daha tanımlanmıştır [21].

Sucul ekosistemin en üst basamağında yer alan, biyolojik çeşitliliğin ve ekolojik-dengenin bir göstergesi olan bu hayvanlar, dünya çapında tehli-

ke altında olan diğer hayvanlar gibi kırmızı listede (IUCN/WCMC Red Data List) yer almaktadır [25]. Su samuru popülasyonlarındaki azalma, su kirliliği, poliklorinat bifenil (PCB) konsantrasyonları, besin yetersizliği, kıyasal habitatın tahribi, kaçak avcılık, trafik kazaları ve balık tuzaklarına bağlı ölümler gibi çok çeşitli faktörlere bağlıdır [28]. Ancak bazı ülkelerde gerçekleştirilen yeniden kolonize edilme çalışmaları ile su samuru sayısında artış sağlanmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır [29]. Dünyanın pek çok ülkesinde 1900’lü yıllardan beri sıkı kanunlarla korunsalar da, İrlanda’da köpek eğitimi, Arnavutluk gibi bazı ülkelerde kürkü için, Finlandiya, Macaristan, Norveç, Polonya gibi ülkelerde de balık yetiştiricileri tarafından zaman zaman avlanılmasına izin verilmektedir [21]. Ülkemizde ise su samuru, 1/7/2003 tarihli ve 4915 sayılı Kara Avcılığı Kanununun 2 ve 4. maddelerine dayanılarak Orman ve Su İşleri Bakanlığınca koruma altına alınan yaban hayvanları arasındadır [10]. Su samurları fırsatçı hayvanlardır. Böcek, balık, kurbağa, kuş, küçük sürüngenler, küçük memeli hayvanlar, tatlı su mid-

yeleri ve meyve gibi geniş bir yelpazede beslenme listesine sahiptirler [25]. Ancak, besin sınırlaması yaşadıkları bölgedeki çeşitlilikle doğrudan ilişkilidir. Bu durum somon balıkları ve su samuru ilişkisini inceleyen bir çalışmada ele alınmıştır [28]. Çalışma sonuçları somon balık seviyelerindeki artış ya da azalışın su samuru diyetini etkilemediğini ve beslenmede somon balığı dışındaki balıkların da tercih edilebildiğini göstermiştir. Çalışma bölgesindeki nehir ve göl sistemleri arasında belirgin bir ayrımın olmaması nedeniyle, gölde yaşayan yılan balıklarının da tüketildiği gözlenmiştir. Su samurlarının beslenme alışkanlıkları temiz su kaynaklarının istilacı türlerce biyolojik invazyonu sonucu oldukça değişmiştir. Bazı ülkelerde belirli bölgelerde sınırlı yayılım gösterirken, beslenme alışkanlıklarına göre yayılım alanları sınır tanımamaktadır [28]. Su samuru populasyon yoğunluğu ve biyolojik/ekolojik karakteri hakkında Türkiye’de [10] ve pek çok Avrupa ülkesinde [25,28,29] çalışmalar yapılmıştır. Su samuru populasyonlarının izlenmesi oldukça zordur. Pek çok bölgede insan yaşantısından uzak ve ürkek bir hayat sürmektedirler. Bu nedenle gerek ülkemizde gerekse diğer ülkelerdeki verilerin populasyon yoğunluğunu ve ülkedeki dağılımını net olarak ortaya koymaması doğaldır [34].

Tablo 1. *Lutra lutra*’nın alt türleri [21]

Alt tür ismi	Dağılımı
<i>L. lutra</i>	Yaygın
<i>L. aurobrunnea</i>	Nepal
<i>L. barang</i>	Tayland, Vietnam, Malezya, Sumatra, Java
<i>L. chinensis</i>	Çin
<i>L. kutab</i>	Kaşmir
<i>L. meridionalis</i>	İran, Güney Rusya
<i>L. monticola</i>	Nepal, Sikkim, Assam
<i>L. nair</i>	Sri Lanka, Güney Hindistan
<i>L. seistanica</i>	Afganistan, Rusya, Pamir
<i>L. whiteleyi</i>	Japonya

Su samurlarının doğadaki yayılımını izlemede dışkı, ayak veya belirleyici iz ve işaretlerin incelenmesi kullanılmaktadır. Demografik ve yaşam hikayeleri hakkında detaylı bilgi edinmek için genetik metotlardan da yararlanılmaktadır. Dışkıdan DNA analizi ile bireysel moleküler isimlendirme, kullanılabilir metotlar arasında gösterilmektedir. Dışkıdan DNA ekstraksiyon şansını arttırmak için top-

lanan dışkıların taze olmasını sağlamak adına gün doğumunda ve tekrarlayan günlerde örnek alınması gerekmektedir. Taze dışkı aynı zamanda fekal mikrofloranın mikroskopik ve makroskopik karakteri hakkında da sağlıklı bilgiler vermektedir [29].

Memeli hayvanlarda bağırsak mikroflorası beslenme alışkanlığı ve besin kaynağına göre değişkenlik gösterse de, su samurlarında beslenme ile mikroflora arasında ilişki olmadığı bildirilmektedir. Su samuru fekal mikroflorası ve potansiyel patojenlerin identifikasyonu, su samuru populasyon sağlığı öneminin anlaşılması ve izlenmesi açısından oldukça önemlidir. Su samurlarının mikroflorasını belirlemek için yapılan bir çalışmada [25], 31 adet dışkı örneği aerobik, anaerobik sporlu bakteri izolasyonu ve PCR ile viruslar (Coronavirus, Parvovirus, Adenovirus, Parainfluenza virus) yönünden incelenmiştir. Araştırma sonuçları su samurlarının mikroflorasında çok farklı bakteri olduğunu göstermiştir. 88 adet Gram negatif (23 sınıf) ve 44 adet Gram negatif (10 sınıf) bakteri izole edilmiştir. Dört izolat kesin olarak tanımlanamamış ve hayvan izolatları ile ilgili biyokimyasal testlerin optimizasyonu sonucu 16S rRNA sekansı gerçekleştirilmiştir (Tablo 2 ve 3). Hiçbir örnekte incelenen virus tipleri tespit edilememiştir. Araştırmacılar, farklı örnekleme alanlarından daha fazla hayvandan sağlanan kapsamlı verilerle fekal flora ve geçici bakterilerin ayrıt edilebileceğine işaret etmişlerdir.

Evcil hayvanlar ve insanlar birçok benzer patojeni paylaşırlar. Evcil veya yabani hayvan orijinli ve insanlarda hastalığa neden olan patojenler zoonotik organizmalar olarak bilinmektedir [2]. İnsanları etkileyen hastalıkların yaklaşık %61’i zoonoz karakterde olduğu için dünya çapında yaygın bir insan sağlığı sorunudur. İnsanlardan hayvanlara geçen hastalıklar antropozoonoz hastalıklar olarak isimlendirilmektedir. Global insan populasyonundaki artışa paralel olarak antropozoonoz oranlarında belirgin bir artış görülmektedir. Bazı insan hastalıkları yaban hayatının korunması ile doğrudan bağlantılıdır. Evcil hayvan patojenlerinin çoğu (%77) ve evcil etçil hayvan patojenlerinin daha fazlası (%91) yaban hayatı dahil pek çok konakçıyı enfekte edebilmektedir. Bu grup patojenleri tanımlamak, insan ve evcil hayvanlarda yeni enfeksiyonların ortaya çıkmasını önlemek adına insan sağlığı açısından çok önemlidir [6].

Tablo 2. Su samuru dışkı örneklerinden izole edilen Gram pozitif bakteriler [25]

Sınıf	Tür	İzolat sayısı (%)	Pozitif örnek sayısı
Aerococcus	<i>A. viridans</i>	2(1.5)	2
Bacillus	<i>B. brevis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>Bacillus</i> sp.	12(9.1)	8
Cellulomonas/ Microbacterium	<i>Cellulomonas/Microbacterium</i> sp.	2 (1.5)	2
Clostridium	<i>C. beijerinckii/butyricum</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. sordelii</i> , <i>Clostridium</i> sp.	12 (9.1)	10
Corynebacterium	<i>C. aquaticum</i> , <i>C. diphtheriae mitis</i>	3 (2.3)	2
Enterococcus	<i>E. durans</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	5 (3.8)	5
Paenibacillus	<i>P. alvei</i>	1 (0.8)	1
Propionibacterium	<i>P. avidum</i>	3 (2.3)	3
Staphylococcus	<i>S. simulans</i>	1 (0.8)	2
Streptococcus	<i>S. porcinus</i>	1 (0.8)	1
İsmlendirilmeyen		2 (1.5)	2
Toplam		44 (33.3)	

Tablo 3. Su samuru dışkı örneklerinden izole edilen Gram negatif bakteriler [25]

Sınıf	Tür	İzolat sayısı (%)	Pozitif örnek sayısı
Acinetobacter	<i>A. lwoffii</i>	1 (0.8)	1
Aeromonas	<i>A. hydrophila</i> , <i>A. hydrophila/caviae</i> , <i>A. sobria</i>	18 (13.6)	15
Agrobacterium	<i>A. tumefaciens</i>	1 (0.8)	1
Burkholderia	<i>B. cepacia</i>	4 (3.0)	4
Buttiauxella	<i>B. agrestis</i>	1 (0.8)	1
Chryseomonas	<i>C. luteola</i>	1 (0.8)	1
Citrobacter	<i>C. amalonaticus</i> , <i>C. braaki</i> , <i>C. youngae</i> , <i>Citrobacter</i> sp.	7 (5.3)	6
Empedobacter	<i>E. brevis</i>	1 (0.8)	1
Enterobacter	<i>E. amnigenus</i> , <i>E. cancerogenus</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. gergoviae</i> , <i>E. sakazakii</i> , <i>Enterobacter</i> sp.	7 (5.3)	7
Escherichia	<i>E. coli</i> , <i>E. vulneris</i>	3 (2.3)	3
Hafnia	<i>H. alvei</i>	2 (1.5)	2
Klebsiella	<i>K. oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. ozaenae</i>	3 (2.3)	3
Moraxella	<i>Moraxella</i> sp.	2 (1.5)	2
Morganella	<i>M. morganii</i>	1 (0.8)	1
Pantoea	<i>P. agglomerans</i> , <i>Pantoea</i> spp.	13 (9.8)	12
Pasteurella	<i>Pasteurella</i> sp.	1 (0.8)	1
Pseudomonas	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i>	5 (3.8)	5
Rahnella	<i>R. aquatilis</i>	1 (0.8)	1
Salmonella	<i>S. arizonae</i> , <i>S. pullorum</i>	4 (3.0)	3
Serratia	<i>S. fonticola</i> , <i>S. plymuthica</i> , <i>Serratia</i> sp.	3 (2.3)	2
Shigella	<i>Shigella</i> sp.	1 (0.8)	1
Vibrio	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. metschikovi</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	5 (3.8)	5
Yokenella	<i>Y. regensburgei</i>	1 (0.8)	1
İsmlendirilmeyen		2 (1.5)	2
Toplam		88 (66.7)	

Yaban hayatı ve evcil hayvanların paylaştıkları hastalıklar açısından hastalık ekolojisini etkileyen faktörleri araştırmak gerekmektedir. Şüphesiz hayvan yetiştiriciliği ve yaban hayatı arasında bağlantı kuran çiftlikler, tarım alanları ve demografik değişimler ve hayvan hareketleri hastalıkların yayılışında önemli rol oynamaktadır. Su samurları zaman zaman yerleşim merkezlerine gelerek, insanlarla doğrudan temas kurabilmektedir [28].

Su samurlarında geçerli mikroflora karakterizasyon çalışmaları yetersizdir, dışkı izolatlarının klinik önemi ve çevresel kontaminant ilişkili hastalıklar hakkında az sayıda bilgi mevcuttur. Su samurları viral, bakteriyel, mantar ve paraziter hastalıklardan etkilenebilmektedir [29].

Su Samuru Hastalıkları

Bakteriyel Hastalıklar

Tüberküloz: Tüberküloz, çok bulaşıcı ve kronik seyrettiği için, su samurları açısından en önemli hastalıktır. Hastalık, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* veya *M. avium* tarafından oluşturulmaktadır. Çoğu Avrupa ülkesinde sığır tüberkülozu eradike edilmişken ve *M. humanus* ve *M. microti* çok nadir izole edilirken, *M. avium* nedenli vakalar bildirilmektedir. Hastalık tüberkülozlu kanatlıların tüketilmesiyle meydana gelmektedir [21].

M. tuberculosis enfeksiyonu egzotik etçil hayvanlarda çok nadiren rapor edilmektedir. Avrupa'da hayvanat bahçesinden getirilen bir su samurunda tüberküloz vaka takdimi yapılmıştır [16]. Su samurlarında ilk doğrulanmış *M. bovis* enfeksiyonu Lee ve ark. [15] tarafından yapılmıştır. Önceki yıllarda da tüberküloz bildirim yapılmıştır. Ancak, mikobakteriyel enfeksiyon bakteriyolojik kültür ve moleküler metotlarla doğrulanmamıştır [5]. Çeşitli mantar sporlarının solunması sonucu görülen akciğer granulomatöz lezyonları, tüberküloz lezyonlarına benzerlik gösterdiği için *M. bovis* izolasyonu ve doğrulanması yapılmalıdır [19].

Kuzey İrlanda'da 2008 yılı Ocak ayında ölü olarak bulunan yetişkin bir erkek su samuru post-mortem incelenmiştir. Karaciğer, akciğer, dalak ve ince barsak örnekleri histolojik olarak incelenmiş ve Ziehl-Neelsen (ZN) yöntemiyle boyanmıştır. Akciğer örneklerinde kapsüllenmemiş makrofaj ve lenfosit yığınlarından oluşan fibrinoid nekroz odak-

ları belirlenmiştir. ZN boyamada akciğer ve böbrek lezyonlarındaki makrofajlar içinde çok sayıda aside dirençli basiller saptanmıştır Böylece *M. bovis*'in su samurlarında enfeksiyon yapabildiği gösterilmiştir. Örneklerden izole edilen ve moleküler olarak da karakterize edilen *M. bovis* alt tipi sığırlarda tüberküloz vakalarından izole edilen suşlarla yakından ilişkili bulunmuştur. Bu nedenle, su samurlarının enfeksiyonu direkt veya indirekt olarak sığırlardan ya da aynı etkenle enfekte olduğu bilinen porsuk (*Meles meles*) gibi ortak bir yabancı kaynaktan alabileceğine işaret edilmektedir [15].

İngiltere'de gerçekleştirilen bir araştırmada, çoğunluğu trafik kazaları (%80) ve daha azı septik ısırik yaralanmaları (%10) sonucu ölmüş 690 su samuru incelenmiştir. Nekropsi sonucunda tüberküloz şüpheli lezyonlar histolojik ve doku örnekleri de kültürel yöntemlerle analiz edilmiştir [36]. Ayrıca 2000 yılı boyunca 18 su samuruna ait akciğer ve lenf düğümleri mikobakteriler yönünden kültüre edilmiştir [35]. Her iki çalışmada da organlarda makroskobik olarak tüberküloz lezyonları izlenmemiş ve incelenen tüm örnekler mikobakteriler açısından histolojik ve kültürel yönden negatif bulunmuştur [35,36].

Çek Cumhuriyetinde 2002-2007 yılları arasında gerçekleştirilen bir çalışmada [13] incelenen 4 su samurunun tamamı *M. avium* subsp. *paratuberculosis* yönünden negatif bulunmuştur. Benzer şekilde, İspanya'da yabancı karnivorlarda gerçekleştirilen retrospektif bir araştırmada [20] farklı türlerden alınan kan serumları *M. bovis* proteinine (MPB70) karşı antikor yönünden incelenmiş ve örnek alınan su samuru ELISA ile serolojik olarak negatif bulunmuştur.

Salmonella Enfeksiyonları: Salmonella türleri insan, evcil ve yabancı hayvanları etkileyen önemli zoonotik enteropatojenlerdir. İnsan ve yaban hayatındaki hayvanlardan benzer türlerin izole edilmesi, Salmonella türleri için yabancı hayvanların birer rezervuar olabileceğini göstermiştir. Hayvanlar etkeni asemptomatik olarak taşıyabilirler ve aralıklı olarak yayabilirler. Hayvanlarda enteritis, septisemi ve abort gelişebilir. Etkenler çevrede çok uzun süre canlı kalabildiği için, fekal-oral yolla veya kontamine su ya da gıda ile bulaşabilmektedir. Su samurları, Salmonella türlerini kontamine su, gıda, hayvansal atıklar veya yabancı kuşlardan alabilmektedir [26].

Koruma alanlarındaki rehabilitasyon merkezinde [3] ve yabani hayatta [11] su samurlarından *Salmonella* türleri izole edilmiştir. Su samurlarında *Salmonella anatum*'un böbrek hasarı oluşturduğu bildirilmiştir [8]. Portekiz'de yapılan bir çalışmada [26] incelenen 67 su samuru dışkı örneğinin 5'inde (%7.6) *Salmonella* izolasyonu yapılmıştır. İzolatların 3'ü *S. enterica* ssp. *arizonae*, 2'si de *S. Gallinarum* olarak tanımlanmıştır. Araştırmada izolatların tamamı amoksisilin-klavulanik asit, ampisilin, sefhaleksin ve penisiline dirençli bulunmuştur. Çoklu antibiyotik dirençliliğine sahip *Salmonella* türleri açısından su samurlarının taşıyıcı olabileceğine vurgu yapılmıştır. Su samurlarında doğal yaşam alanlarında antibiyotik tedavisi görmedikleri halde, antibiyotik dirençli bakterilerin izole edilmesi dirençliliğin çevresel olarak aktarılabilceğini göstermektedir. Bu hayvanlar, evcil hayvanlarda ve insanlarda tedavi veya koruyucu amaçla kullanılan antibiyotiklerle yaşam alanlarında karşı karşıya kalabilmektedirler [29].

Enterokok Enfeksiyonları: Enterokoklar pek çok hayvan türünde olduğu gibi, su samurlarının da bağırsak mikroflorasını oluşturan bakterilerdir. Portekiz'de gerçekleştirilen bir çalışmada [31] su samurlarına ait dışkı örneklerinden, konvansiyonel/moleküler metodlarla izole edilen 29 Enterokok suşu virülens faktör ve antibiyotik dirençliliği açısından incelenmiştir. İzolatların 19'u *E. faecalis*, 9'u *E. faecium* ve 1'i de *E. durans* olarak isimlendirilmiş ve PCR-fingerprinting sonucu yüksek düzeyde genomik çeşitlilik saptanmıştır. İzolatların 3'ünde sitolizin ve 6'sında jelatinaz belirlenmiştir. İzolatların 5'i *ace* ve *acm*, 7'si *ebpABC*, 14'ü *gelE* ve 3'ü de *cylA* genleri açısından pozitif bulunmuştur. Tüm izolatlarda antibiyotik dirençlilik saptanmıştır. 17 izolatta *tet(M)* ve *pbp5*, 13 izolatta *vanB* ve 5 izolatta *vanD* direnç geni tespit edilmiştir. Tüm gentamisin dirençli enterokok suşlarında gentamisin dirençliliğini kodlayan *aac(60)-Ieaph(200)* geni saptanmıştır. Tüm izolatlar virülens ve/veya antibiyotik direnç özelliklerine sahip oldukları için, serbest yaşayan su samurlarının virulent/dirençli enterokokların aynı ekolojik alanı paylaşan diğer hayvanlar arasında yayılışındaki ve direkt olarak etkileşim halinde oldukları insanlar açısından potansiyel sağlık riski oluşturmasındaki rolleri göz ardı edilmemelidir. Antibiyotik dirençliliğinin düşük seviyelerde olma-

sı, örnek toplanan hayvanların önceleri antibiyotik tedavisi görmemesi nedeniyle beklenen bir sonuç olarak yorumlanmıştır. Bununla birlikte, su samuru orijinli 5 izolatın vankomisine ve 11 izolatın da gentamisine dirençli olması özellikle bu antibiyotiklerin klinik öneminden dolayı dikkat çekicidir. Tüm izolatlar amoksisilin+klavulanat ve ampisiline duyarlı bulunmuştur. Diğer yandan, gentamisin insanlarda yaygın bir şekilde enterokokal enfeksiyonların tedavisinde kullanıldığı için bu direncin ortaya çıkması ve yayılışı insan sağlığı açısından risk teşkil edebilmektedir [31].

Stafilokok Enfeksiyonları: Stafilokoklar su samurlarında apse olgularında izole edilmiştir [8]. Ayrıca, stafilokoklarla ilişkili hepatik hematom, akciğer, böbrek, dalak ve subkutanöz apseleri içeren sekonder enfeksiyonlar bildirilmiştir [11]. Başka bir çalışma Avusturya yaban hayatında oksasilin dirençli Stafilokok türlerinin belirlenmesi amacıyla 2012-2013 yılları arasında gerçekleştirilmiştir. 40 farklı yaban hayvanına ait burun ve perineal svap örneği incelenmiş ve bir su samurundan *S. aureus* izolasyonu yapılmıştır. Hayvanda makroskobik olarak şiddetli purulent pnömoni ve leptomeningitis tespit edilmiştir. Böylece, su samurlarından ilk kez *mecC* geni pozitif MRSA saptanmıştır [17].

Yersinia Enfeksiyonları: *Yersinia enterocolitica* ve *Y. pseudotuberculosis* insanlar için önemli enterik patojen etkenler arasında yer almaktadır. Enfektif insan suşları kontamine gıda, enfekte hayvanlarla temas ve kişiden kişiye temas ile bulaşabilmektedir. Yabani hayvanlar *Yersinia* türlerinin bulaştırılmasında önemli bir potansiyel araç olarak görülmektedir. Su samurlarının, yersiniozisin epidemiyolojisinde önemli rol oynayan *Y. enterocolitica* ve *Y. pseudotuberculosis* bakımından muhtemel doğal rezervuar olduğu gösterilmiştir. Patojenik *Yersinia* türleri, su samurlarının da içinde olduğu 37 farklı yabani hayvan türünde incelenmiş ve 3 su samuruna ait akciğer örneğinin 1'inden *Y. pseudotuberculosis* serotip O:2 izole edilmiştir [24].

Klostridiyal Enfeksiyonlar: İskoçya'da rehabilitasyon merkezinde, ölü bir su samuruna ait doku örneklerinde *Clostridium piliforme* izole ve tanımlanmıştır. Genellikle laboratuvar hayvanlarında Tyzzer hastalığına neden olan etken, ilk kez su samurlarında bildirilmiştir [35]. Su samurlarında toksijenik *C. perfringens*'in varlığı Kimber ve Kollias

[11] tarafından bildirilmiştir. Ayrıca gazlı kangren etkenlerinden *C. welchii*, su samurlarından izole edilmiştir [21].

Leptospirozis: Leptospirozis, hayvanlardan insanlara bulaşan zoonoz bir hastalıktır. Hastalık, belirti göstermeyen taşıyıcı kemirgenler, vahşi hayvanlar, çiftlik ve evcil hayvanların idrarları ile kirletilmiş gıda ve sular ile bulaşabilmektedir [9]. İnkübasyon periyodu 2 gün-3 ay arasında değişmektedir. Su samurlarında *Leptospira* enfeksiyonu nadiren rapor edilmekle birlikte, inaktif aşılama ve yıllık tekrarı önerilmektedir [21]. Farklı türlerden 201 yabancı ve evcil etçil hayvan üzerinde yapılan bir çalışmada [22] serum, idrar ve böbrek örnekleri leptospirozis açısından incelenmiştir. Su samurları hariç tüm hayvanların etkenle temas ettikleri bildirilmiştir.

Diğer Bakteriyel İnfeksiyonlar: Su samurlarında *Proteus mirabilis* kökenli ürogenital sistem enfeksiyonları bildirilmiştir [3,8]. Böyle enfeksiyonlar genellikle Streptokok enfeksiyonları ve Kolibasillosis ile ilişkilendirilmiştir [21].

Acinetobacter ve Pasteurella türlerinin su samurlarındaki potansiyel patojenik rolleri hakkındaki literatür verileri sınırlıdır. Kimber ve Kollias [11] Acinetobacter türlerini su samurlarında tanımlamışlar, ancak klinik önemi hakkında bilgi vermemişlerdir. Fransa'da su samuru rehabilitasyon merkezinde yapılan bir çalışmada [4], ısırık ve çeşitli nedenlerle yaralanan su samurlarında yüksek oranda (%62.5) ölümlerin görüldüğü bildirilmiştir. İncelenen örneklerin ikisinden *Pasteurella multocida* izole edilmiştir.

Klebsiella pneumoniae kökenli retrofarengial apse ve ağır pnömoni olguları sonrası su samurlarında ölümler olduğu bildirilmiştir. Ayrıca araştırmacılar, patojenik *E. coli* nedenli ürogenital sistem enfeksiyonlarından bahsetmişler ve beta-hemolitik streptokoklarla ilişkili ürogenital sistem enfeksiyonlarına dikkat çekmişlerdir [8].

Pseudomonas türlerinin potansiyel patojenik rolleri araştırılmış, sadece *P. putrefaciens* ile ilişkili su samuru hastalıkları belirlenmiştir [11].

İngiltere'de trafik kazası sonucu ölmüş su samurundan izole edilen Gram pozitif katalaz negatif kok morfolojisine sahip bir bakterinin isimlendirilmesi fenotipik ve filogenetik incelemelerle araştırılmıştır. Karşılaştırmalı 16S rRNA gen sekansı so-

nucunda bu bakteri *Vagococcus* sınıfı ile yakından ilişkili, ancak *Vagococcus fluvialis* ve *V. salmoninarum*'dan farklı, yeni bir alt tür olarak tanımlanmıştır. Bilinmeyen bu bakteri, biyokimyasal testler ve tüm hücre proteinlerinin elektroforetik analizleri ile iki *Vagococcus* türünden ayrılmıştır. Filogenetik ve fenotipik esaslara göre bu yeni tür *V. lutrae* olarak isimlendirilmiştir [14].

Plesiomonas shigelloides tarafından şekillendirilen su samuru abort vakası bildirilmiştir [21].

Viral Hastalıklar

Su samurlarında bazı köpek ve kedi viral patojenlerine karşı duyarlılık belirlenmiştir. Köpek ve kedi parvovirusları, coronavirüsleri, köpek herpes virusları ve köpek adenovirus tip 2'ye karşı antikolların varlığından söz edilmesine rağmen [11,12], su samurlarının virusların yayılmasında rezervuar olarak potansiyel rolleri yeterince net değildir [21].

Su samurlarına ait dışkı örneklerinin Adenovirus, Parvovirus, Parainfluenza virus yönünden PCR ile analiz edildiği bir çalışmada [25] tüm örnekler negatif bulunmuştur. Araştırmada, örnek alınma zamanına dikkat çekilerek doğru örnekleme yapmak için farklı sezonlarda örnek alınması gerekliliğine vurgu yapılmıştır.

Diğer yandan Kore Cumhuriyeti'nde gerçekleştirilen bir çalışmada, ölü olarak bulunan bir su samurunda Canin adenovirus tip 1 (CAV-1) tespit edilmiştir. Nekropside karaciğerde büyüme ve nekroz, böbrekte atrofi belirlenmiştir. Mikroskopik olarak plazma hücreleri ve lenfositlerden oluşan mononükleer hücre infiltrasyonu ile multifokal karaciğer nekrozu saptanmıştır. Karaciğerde, elektron mikroskobu ile hepatositlerin çekirdeğinde karakteristik, 70 nm çapında, adenovirus partikülleri görülmüştür. Araştırmacılar, CAV-1 için su samurlarında ilk tespit olduğuna dikkat çekmişlerdir. Ayrıca, hayvanın etkene karşı aşılama yapıldığını, su samurları için hastalığın ölümcül olabileceğini bu nedenle inaktif bir aşı ile aşılama yapılması, ek olarak diğer etçil hayvanlarla temasın önlenmesi için etkili hijyenik tedbirlerin alınması gerekliliğine işaret etmişlerdir [27].

Kuduz: Avustralya ve bazı küçük adalar dışında dünyanın pek çok kısmında Kuduz hastalığı görülmektedir. Su samurlarında kuduz vakaları bil-

dirilmiş [30] ve insanlar için risk oluşturduklarına dikkat çekilmiştir. Hastalığın inkübasyon süresi bir hafta ile birkaç ay arasındadır. Su samurlarında kuduz karşı inaktif aşı ile her yıl aşılama bağışıklık için önerilmektedir [21].

Köpek Gençlik Hastalığı (Distemper): Su samurlarında köpek gençlik hastalığı virüsü belirlenmiştir [7]. İnaktif bir aşı ile yıllık aşılama önerilmektedir. Ancak, inaktif aşılama yeterince uzun süre bağışıklık sağlamadığı için attenüe canlı aşıların kullanılmasının daha doğru bir yaklaşım olduğu dikkat çekilmektedir [21].

Parvovirus Enfeksiyonu: Su samurlarının hastalığa duyarlı olduğu bildirilmiş, bazı su samuru türlerinde hastalığa karşı seropozitiflik saptanmış ve inaktif köpek aşıları ile yıllık aşılama tavsiye edilmiştir [21].

Mantar Hastalıkları

Su samurlarında mantar hastalıkları oldukça nadiren görülmektedir. Rapor edilen ilk mantar vakasından *Monilia* türü izole edilmiştir. Söz konusu mantar türünün normal deri mikroflorasında kommensal olarak bulunan fırsatçı patojen olduğu belirlenmiştir. Hastalığın şekillenmesinde çevresel etkenler, kondisyon kaybı ve stres faktörleri etkili bulunmuştur. Ancak su samuru kürkünün sağlam olduğu ve mantarın yayılmadığı saptanmıştır [21].

İtalya'da gerçekleştirilen güncel bir çalışmada [17], trafik kazası sonucu ölen bir su samurundan *Emmonsia* türü mantar izole edilmiştir. *Emmonsia* türlerine ait mantarların solunması sonucu ortaya çıkan hastalık *Adiaspiromikozis* olarak tanımlanmaktadır. Diğer yandan, *Coccidiodes immitis*, *Microsporium* spp ve *Trychophyton* spp. türü mantarların su samurlarında potansiyel olarak klinik öneme sahip oldukları bildirilmektedir [6].

Paraziter Hastalıklar

Su samurları çok sayıda zoonotik potansiyele sahip parazite konakçılık etmektedir. Yarı sucul yaşayan bu hayvanlar, kara, tatlı su ve deniz habitatları arasında patojenlerin taşınmasında önemli rol üstlenmektedirler. Buna rağmen, su samurlarının taşıdığı parazitler fazlaca incelenmemiştir [21].

Su samurlarında kene ve bit dışında ektoparazit bildirimini yapılmamıştır. Ektoparazitler hastalıkların

dağılımı, yayılışı ve görülme sıklığı biyolojik yaşam evrelerine bağlı olarak mevsimsel değişkenlik göstermektedir. Su samurlarında bulunan ektoparazitlerin ve bunların biyotik veya abiyotik değişkenlerden etkilenip etkilenmediğini araştırmak için yapılan bir çalışmada, incelenen hayvanlarda ektoparazit olarak sadece *Ixodes hexagonus* türünde kene tespit edilmiştir. İncelenen hayvanlarda başka kene türlerinin tespit edilmemesi, su samurların gece avlanması ve yarı sucul bir yaşam sürmesi ile bağlantılı olabileceği ifade edilmiştir. Kondisyonu iyi olan hayvanlarda kötü kondisyonlu olanlara göre daha az kene gözlenmiştir. Su samurlarının çok sayıda kene taşınması nedeniyle bu hayvanların *I. hexagonus* türü kenelerce taşınan zoonoz etkenlerin yayılmasında potansiyel rollerinin araştırılması sonucuna varılmıştır [32].

Diğer yandan, hastalıkların nakledilmesinde önemli olan, *Amblyoma americanum*, *Dermacentor variabilis*, *Ixodes banisi*, *I. cookie* ve *I. uriae* gibi kene türlerinin de su samurlarında tespiti yapılmıştır [6].

Su samurlarında sestod, nematod, trematod ve protozoon türlerini içeren, çok sayıda endoparazit türü tespit edilmiş, ancak pek çoğunun klinik ve patolojik önemi ortaya konulamamıştır. *Spirometra mansonioides* (sestod), *Dracunculus insignis*, *Strongyloides lutrae*, *Capillaria aerophilus*, *Capillaria hepatica*, *Gnathostoma miyazakii*, *Dioctophyme renale* (nematod) ve *Paragonimus kellicoti* (trematod)'nin su samurlarında hastalık yaptığı bilinmektedir. Ayrıca, *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Isospora* spp., *Sarcocystis* spp. ve *Toxoplasma gondii* gibi protozoonlarla ilgili nadir de olsa, daha çok serolojik olmak üzere hastalık vakaları rapor edilmiştir [6]. Diğer yandan, *Isthmiophora melis*, *Opisthorchis felineus*, *Eustrongylus gigas*, *Erythelms*, *Molineus*, *Heterophyidae* alt türleri yaygın olarak saptanan endoparazitlerdir. *I. melis* ve *O. felineus* türleri zoonoz potansiyele sahiptirler. Su samurlarının karın boşluğunda ve pelvis renalisinde yaşayan *E. gigas*, böbrek doku hasarı, üreterlerde hipertrofi ve peritonitis oluşturabilen bir nematottur [21]. Genç bir su samurunun kalbinde *Dirofilaria immitis* belirlenmiş ve su samurlarının bu parazit için belirleyici konakçı olduğuna dikkat çekilmiştir [18].

Pseudamphistomum truncatum insanlar dahil balıkla beslenen memelileri de içeren geniş bir ko-

nakçı spektrumuna sahip ve safrada yaşayan fırsatçı trematodtur. *P. truncatum* salyangoz ve tatlı su balıkları olmak üzere iki ara konakçılı karmaşık bir yaşam döngüsüne sahiptir. Enfekte balıkların tüketilmesi ile memelilere bulaşabilen bu parazit, 249 su samurunun 7'sinde (%2.8) belirlenmiş ve vakaların çoğunun ölümle sonuçlandığı rapor edilmiştir [23].

Belarus'ta 18 yıllık periyotta farklı yabani hayvanlara ait 151 karkasın helmintolojik incelemesi amacıyla yapılan bir çalışmada [33], 25 su samuru örneğinin sadece 1 (%4)'inde *Fasciola hepatica* tespit edilmiştir. Araştırmacılar ortak yaşam alanlarının *F. hepatica* yumurtalarını içeren dışkıları taşıyan yabani hayvanlarca kontamine edilmesinin arakonakçı olan yumuşakçaların enfeksiyonuna neden olabileceğine ve hastalığın diğer duyarlı konakçılara bulaştırılabileceğine dikkat çekmişlerdir.

Toksoplazmozis, hem insan hem de evcil ve yabani hayvanları etkileyen, dünya çapında öneme sahip zoonotik bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü, henüz yabani/evcil hayvanlar ve insanlar arasında kesin olarak enfeksiyon bağlantısı kurulamamasına rağmen, *Toxoplasma gondii* hakkında detaylı epidemiyolojik verilerin toplanmasını önermektedir. Yabani hayvanlarda hastalığın seroprevalansı yeterince çalışılmamıştır. İngiltere'de gerçekleştirilen bir araştırmada [4], çeşitli nedenlerle ölmüş 271 su samuruna ait göğüs boşluğundaki kan örneklerinin 108 (%39.9)'inde *T. gondii*'ye karşı seropozitiflik belirlenmiştir. Çalışmada ölüm nedenlerinin bu hastalıktan olup olmadığının net olarak bilinmediğini, ancak su samurlarında seropozitifliğin yüksek bulunmasının hastalığın epidemiyolojisi açısından önemli olduğuna vurgu yapılmıştır. İspanya'da yapılan benzer bir çalışmada [37], farklı türden 282 yabani etçil hayvan *T. gondii* açısından serolojik olarak incelenmiş ve 6 su samurunun tamamında seropozitiflik saptanmıştır.

Su samurlarında, parazitlerin önemi diğer etçil hayvanlara göre daha azdır. Sosyal temas eksikliği, düşük nüfus yoğunluğu ve genellikle büyük "ev aralığı" parazitlerin yayılışı için ekolojik engellerdir. Özellikle dışkılama alanlarına seyrek ziyaretler ve su ile sık temas dışkı ile enfeksiyon tehlikesini sınırlamaktadır. Ayrıca su, yumurta ve larva konsantrasyonunun seyreltilmesinde etkili olmaktadır. Ancak özellikle yaşam alanlarına yeni katılan hayvanlarda dışkıların parazitler açısından periyodik

taranması gerekli görülmektedir. Bazı bölgelerde düzenli aşılamalara ilave olarak, endoparaziter ilaç uygulamaları önerilmektedir [21].

Neoplastik Hastalıklar

Su samurlarında neoplastik hastalıklar çok nadir görülmektedir. Ancak çeşitli ülkelerde zaman zaman bildirim yapılmaktadır. Malignant melanom [38], hepatosellüler adenom [1] ve testis örneklerinde sertoli hücre tümörü [3] saptanmıştır.

Aşılama

Su samurları bazı viral hastalıklara (Kuduz, Distemper) karşı 1900'lü yıllarda aşılanmaktayken, günümüzde yaygın aşılamalar yapılmamaktadır. Bununla birlikte Parvoviral enteritis, Distemper, Kuduz ve Leptospirozise karşı aşılamalar önerilmektedir [6].

Sonuç

Bu makalede, su samurlarında görülen hastalıklara ait güncel literatür verileri özetlenmiştir. Su samuru popülasyonu bilinçsiz pestisit kullanımı, akarsular da balık stoklarını etkileyen çeşitli düzenlemeler, barajlar, akarsu vejetasyonunun kaldırılması, orman alanlarının açılması, yol yapımı, kaçak avcılık, istilacı türlerin çoğalması, kıyı alanlarının tahrip edilmesi, evsel ve endüstriyel atıkların akarsulara bırakılması gibi nedenlerle dünyanın pek çok ülkesinde tükenme noktasına gelmiştir.

Biyolojik çeşitliliğin ve dengenin bir göstergesi olarak kabul edilen bu hayvanların eski popülasyonlarına ulaşmaları adına sıkı tedbirlerin alınması gerekmektedir. Pek çok ülkede su samurlarının yayılışı ve yaşam alanlarını belirlemeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Geçmişte ülkemizde geniş bir yayılış alanının olduğu bilinmekle birlikte, su samurlarının dağılımı ile ilgili detaylı bilgiler yetersizdir. Ülkemizin değişik bölgelerinde yapılacak araştırmalarla su samurları hakkında önemli veriler elde edilebilecektir.

Pek çok ülkede kurulmuş ve aktif olarak faaliyet gösteren su samuru hastalık takibi ve rehabilitasyon merkezlerinin ülkemizde de kurulması gerekmektedir. Su samurlarının mikroflorası ve taşıdığı hastalıklar yönünden incelenmesi, bu hayvanların taşıdığı zoonotik hastalıkları ortaya çıkarabileceği için insan sağlığı açısından da önemlidir.

Kaynaklar

- Bae IH, Pakhrin B, Jee H, Shin NS, Kim DY, (2007). Hepatocellular adenoma in an Eurasian otter (*Lutra lutra*). J Vet Sci. 8(1), 103-105.
- Boynukara B, Gülhan T, (2011). Kedi Zoonozları. Tabiat ve İnsan Dergisi. 45(4), 38-45.
- Capber F, (2007). Veterinary care of Eurasian otters (*Lutra lutra*) at the otter breeding centre of Hunawähr (France). IUCN Otter Spec Group Bull. 24(1), 47-62.
- Chadwick EA, Cable J, Chinchin A, Francis J, Guy E, Kean EF, Paul SC, Perkins SE, Sherrard-Smith E, Wilkinson C, Forman DW, (2013). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the Eurasian otter (*Lutra lutra*) in England and Wales. Parasite Vector. 6(75), 2-5.
- Delahay RJ, De Leeuw AN, Barlow, AM, Clifton-Hadley RS, Cheeseman CL, (2002). The status of *Mycobacterium bovis* infection in UK wild mammals: a review. Vet J. 164, 90-105.
- Gaydos JK, (2014). Diseases of river otters, a recovering species. Proceedings of the 2014 North American Veterinary Conference, Orlando, Florida. <http://www.seadocsociety.org/wp-content/uploads/Diseases-of-River-Otters-J.-Gaydos.pdf>.
- Geisel O, (1979). Staupe bei Fischottern (*Lutra lutra*). Berl Münch Tierärztl Wschr. 92(15), 304.
- Hoover JP, Tyler RD, (1986). Renal function and fractional clearances of American river otters (*Lutra canadensis*). J Wildlife Dis. 22, 547-556.
- Kanat Ö, Gülcü Y, Akpınar Y, Kesler K, Doğan M, Yüzbaşıgil F, (2014). Leptospirozis, Zoonoz Hastalıklar. Olgun-Çelik Ofset Matbaa, Konya. 5-8.
- Karakaş MM, Albayrak İ, (2014). Bioecology of the otter (*Lutra lutra*) in Kızılırmak River in Kırıkkale Province. Hacettepe J Biol Chem. 42(3), 313-321.
- Kimber KR, Kollias GV, (2000). Infectious and parasitic diseases and contaminant-related problems of North American river otters (*Lutra canadensis*): A review. J Zoo Wildlife Med. 31, 452-472.
- Kimber KR, Kollias GV, Dubovi EJ, (2000). Serologic survey of selected viral agents in recently captured wild North American river otters (*Lutra canadensis*). J Zoo Wildlife Med. 31,168-175.
- Kopecna M, Trcka I, Lamka J, Moravkova M, Koubek P, Heroldova M, Mrlik V, Kralova A, Pavlik I, (2008). The wildlife hosts of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Czech Republic during the years 2002–2007. Vet Med-czech. 53(8), 420-426.
- Lawson PA, Foster G, Falsen E, Ohlen M, Collins MD, (1999). *Vagococcus lutrae* sp. nov., isolated from the common otter (*Lutra lutra*). Int J Syst Bacteriol. 49, 1251-1254.
- Lee J, Hanna R, Hill R, McCormick CM, Skuce RA, (2009). Bovine tuberculosis in an Eurasian otter. Vet. Rec. 164, 727-728.
- Lepper AWD, Corner LA, (1983). Naturally occurring mycobacterioses of animals. Ratledge C. & Stanford J. eds. Biology of Mycobacteria, Academic press Inc, London. p.418-444.
- Loncaric I, Kübber-Heiss A, Posautz A, Stalder GL, Hoffmann D, Rosengarten R, Walzer C, (2013). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. carrying the *mecC* gene, isolated from wildlife. J Antimicrob Chemother. 68, 2222-2225.
- Malatesta D, Simpson VR, Fusillo R, Marcelli M, Bongiovanni L, Romanucci M, Palmieri C, Salda LD, (2014). First description of adiaspiromycosis in an Eurasian otter (*Lutra lutra*) in Italy. Vet Ital. 50(3), 199-202.
- Martin-Atance P, Leon-Vizcaino L, Palomares F, Revilla E, Gonzalez-Candela M, Calzada J, Cubero-Pablo MJ, Delibes M, (2006). Antibodies to *Mycobacterium bovis* in wild carnivores from Donana National Park (Spain). J Wildlife Dis. 42(3), 704-708.
- Matos AC, Figueira L, Martins MH, Loureiro F, Pinto ML, Matos M, Coelho AC, (2014). Survey of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in road-killed wild carnivores in Portugal. J Zoo Wildlife Med. 45(4), 775-781.
- Melissen A, (2000). Eurasian otter *Lutra lutra*. Husbandry guidelines, EEP/Studbook for *Lutra lutra*. The Netherland, p.1-66.
- Millán J, Candela MG, López-Bao JV, Pereira M, Jiménez MA, León-Vizcaino L, (2009). Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural areas in Andalusia, Spain. Vector-Borne Zoonot. 9(5), 549-554.
- Neimanis A, Bäcklin BM, Roos A, Moraeus C, Ågren E, Höglund J, (2013). The biliary trematode *Pseudamphistomum truncatum*: an emerging parasite in Swedish wildlife? 21st NWDA Meeting at Torsö, May 30-31. Lake Vänern, Sweden.
- Nikolova S, Tzvetkov Y, Najdenski H, Vesselinova A, (2001). Isolation of pathogenic Yersiniae from wild animals in Bulgaria. J Vet Med B. 48, 203-209.
- Oliveira M, Sales-Luis T, Duarte A, Nunes SF, Carneiro C, Tenreiro T, Tenreiro R, Santosreis M, Tavares L, Vilela CL, (2008). First assessment of microbial diversity in faecal microflora of Eurasian otter (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758) in Portugal. Eur J Wildlife Res. 54, 245-252.
- Oliveira M, Pedroso NM, Sales-Luis T, Santos-Reis M, Tavares L, Vilela CL, (2010). Antimicrobial-resistant *Salmonella* isolated from Eurasian Otters (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758) in Portugal. J. Wildlife Dis. 46(4), 1257-1261.
- Park NY, Lee MC, Kurkure NV, Cho HS, (2007). Canine adenovirus type 1 infection of a Eurasian river otter (*Lutra lutra*). Vet Pathol. 44, 536-539.
- Reid N, Thompson D, Hayden B, Marnell F, Montgomery WI, (2013). Review and quantitative meta-analysis of diet suggests the Eurasian otter (*Lutra lutra*) is likely to be a poor bioindicator. Ecol. Indic. 26, 5-13.
- Romanowski J, Brzeziński M, Żmihorski M, (2013). Habitat correlates of the Eurasian otter *Lutra lutra* recolonizing Central Poland. Acta Theriol. 58, 149-155.
- Rubel A, Hauser B, Baumgartner R, Isenbügel E, (1987). Veterinärmedizinische Prophylaxe bei der Haltung

- des Europäischen Fischotter (*Lutra lutra*). Int Symp Erkrankungen Zootiere. 29, 285-291.
31. Semedo-Lemsaddek T, Nobrega CS, Ribeiro T, Pedrosa NM, Sales-Luis T, Lemsaddek A, Tenreiro R, Tavares L, Vilela CL, Oliveira M, (2013). Virulence traits and antibiotic resistance among enterococci isolated from Eurasian otter (*Lutra lutra*). Vet Microbiol. 163, 378-382.
 32. Sherrard-Smith E, Chadwick E, Cable J, (2012). Abiotic and biotic factors associated with tick population dynamics on a mammalian host: *Ixodes hexagonus* infesting otters, *Lutra lutra*. PLoS ONE 7(10), e47131. doi:10.1371/journal.pone.0047131.
 33. Shimalov VV, Shimalov VT, (2000). Findings of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 in wild animals in Belorussian Polesie. Parasitol Res. 86, 527.
 34. Simpson VR, (2007). Health status of otters in southern and south west England, 1996-2003. Science Report SCO10064/SR1. Environment Agency.
 35. Simpson VR, Hargreaves J, Birtles RJ, Marsden H, Williams DL, (2008). Tyzzer's disease in a Eurasian otter (*Lutra lutra*) in Scotland. Vet Rec. 163, 539-543.
 36. Simpson V, (2009). Bovine tuberculosis in Eurasian otters. Vet Rec. 164, 789.
 37. Sobrino R, Cabezon O, Millan J, Pabon M, Arnal MC, Luco DF, Gortazar C, Dubey JP, Almeria S, (2007). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild carnivores from Spain. Vet Parasitol. 148, 187-192.
 38. Weber H, Mecklenburg L, (2000). Malignant melanoma in a Eurasian otter (*Lutra lutra*). J. Zoo Wildl. Med. 31(1), 87-90.

Gen İdentifikasyonu ve DNA Kütüphanelerinin Oluşturulması

Gülseren Yıldız Öz¹, Vahdettin Altunok²

¹Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, İstanbul

²Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya AD, Konya

Geliş Tarihi / Received: 09.02.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 30.05.2016

Özet: Genetik çalışmalar 1865 yılında Gregor Mendel tarafından başlatılmıştır. Günümüzde de tüm dünyada bilim adamları tarafından büyük bir hızla devam ettirilmektedir. Genetik bir çalışma, üzerinde çalışılacak gen bölgesinin izolasyonu ile başlamaktadır. Bir gen bir kere izole edildikten sonra o gen üzerinde yapılacak işlemlerin sınırı yoktur. DNA ve RNA düzeyinde yapılan genetik çalışmalarda, genler tek başına ya da genlerin birbirleri ile olan etkileşimleri incelenerek tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bilim adamları, izole edilen genler veya DNA parçaları için saklama yöntemleri araştırmaktadır. Bu yöntemlerden biri de DNA kütüphanesi oluşturmaktır. DNA kütüphanelerinin kurulmasıyla, kütüphanelerdeki kitaplar gibi DNA koleksiyonu ve deposunun oluşturulması amaçlanmaktadır. DNA kütüphaneleri; kanserde, nöroloji ve göz hastalıkları gibi alanlarda gen tedavisi çalışmalarında kullanılmaktadır. Ayrıca, rekombinant ilaçların bulunmasında, besin maddesi olarak ihtiyaç duyulan bazı proteinlerin üretilmesinde, çeşitli genlerin moleküler düzeyde tanımlandığı biyoteknolojik çalışmalarda, gen izolasyonu ve DNA kütüphanesi oluşturma yöntemine başvurulmaktadır.

Anahtar kelimeler: DNA kütüphanesi, gen izolasyonu, klonlama

Gene Identification and Construction of DNA Libraries

Abstract: Genetic studies were firstly started in 1865 by Gregor Mendel. Also the studies are continued at a great pace by the scientists on the world. A genetic study starts by isolation of the studied gene from the whole genom. When a gene is isolated from DNA, there is no limit of transactions on the gen. In the genetic studies on DNA and RNA have been studied the genes are single or genes interact with each other analyze and the treatment methods to developing. In present researches study on preserving methods of isolated genes or DNA fragments. One of these methods is to constitute a library of the DNA. It is aimed to collection and archive the DNA in a DNA library by similar the books on the library. DNA libraries are frequently utilized for gene therapy in oncology, neurology, eye diseases and etc. Furthermore, method of DNA libraries are used in recombinant pharmaceutical manufacturing, production of some proteins as a nutrient and in biotechnological studies that different genes are defined on molecular level.

Key words: DNA library, gene isolation, cloning

Giriş

Günümüzde kalıtımın esas fonksiyonel ünitesi olan, bir polipeptidi kodlayan kromozomal DNA dizisi olarak tanımlanan gen kavramı, ilk olarak 1865 yılında Gregor MENDEL tarafından ortaya çıkarılmıştır. Mendel, yaptığı hibritleme çalışmalarında ebeveynlerden yeni döllere aktarılan bazı karakteristik özelliklerin olduğuna dikkat çekmiştir [7]. Bu tarihten sonra genlerin bir nesilden diğerine geçişi, genlerin fiziksel yapıları, genlerdeki varyasyonlar ve genlerin bir türün özellikleri üzerindeki etki yolları tüm dünyadaki bilim adamları tarafından araştırılmaya başlanmıştır [14].

Genetik alanında biyoteknolojik çalışmalar yürütülürken birtakım zorluklarla karşılaşmaktadır.

Genetik bir çalışmanın başlangıcı, üzerinde çalışılacak gen bölgesinin izolasyonu ile yapılmaktadır. Daha sonra bu gen bölgesi üzerinde çeşitli metotlarla farklı işlemler uygulanmaktadır. Uzun bir gen bölgesi üzerinde yapılan çalışmalarda DNA'nın küçük parçalara ayrılarak çalışılmasının daha pratik olacağı düşünülmektedir. Örneğin; insan genom uzunluğu 3 milyar 289 milyon bp uzunluğundadır ve yaklaşık 25 bin gen kodlar. Genetik kusuru olan ya da ilgilenilen DNA kısmını bulmak, samanlıkta iğne aramak gibidir. DNA'nın manipüle edilebilecek büyüklükte kısımlara ayrılarak çalışılması, her seferinde DNA'nın diğer kısımlarıyla uğraşma zorunluluğunu ortadan kaldıracaktır [8]. Ayrıca göz hastalıkları gibi birden fazla genin kontrolünde oluşan hastalık sebeplerinin moleküler düzeyde araştırılması

rılması gerekmektedir. DNA ve RNA düzeyinde yapılan bu çalışmalarda, hastalıkla ilgisi olduğu düşünülen genler izole edilerek ve genlerin birbirleri ile etkileşimleri moleküler düzeyde incelenerek tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır [6].

DNA'nın manipüle edilecek kısımlara ayrılarak saklanması işlemi DNA kütüphanelerinin oluşturulması ile mümkün olabilmektedir. DNA kütüphanelerinin oluşturulması için ilk basamak ilgilenilen gen bölgesinin diğer DNA kısımlarından ayrılmasıdır. DNA'yı manipüle edebilmek için iki çeşit gen izolasyon tekniği kullanılır: ilki, her alanda yaygın olarak kullanılan PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tekniğidir. Bu işlem saf gen numunesini elde etmek için kullanılabilir. Primerler ilgili genin her iki tarafına bağlanabilirse genin birçok kopyası sentezlenebilir [5,13]. Gen izolasyonunda kullanılan diğer bir işlem gen klonlama yöntemidir. Bu işlem, ilgilenilen gen bölgesinin vektör denilen halkasal bir DNA molekülüne sokulması ve vektörün bir konakçıya aktarılması ile gerçekleştirilmektedir. Vektör molekülü konak hücrede genin sayısız kopyalarını üretir ve üretilen kopya DNA molekülleri döllere geçer. Bu şekilde oluşan çok sayıda kopyadan sonra özdeş konağın bir kolonisi üretilmiş olur. Bu işlem tüm genoma yapılırsa o DNA'ya ait değişik koloniler yani DNA kütüphaneleri oluşturulmuş olur [8]. İzole edilen bir gen üzerinde yapılabilecek işlemlerin sınırı yoktur. Mevcut teknolojik şartların izin verdiği ölçüde araştırmalar yapılmaktadır. İzole edilen genler veya DNA parçaları için saklama yöntemi geliştirildiğinde ise gelecekte var olacak yeni teknolojilerle de çalışmalara farklı boyutlarda devam edilebilecektir. Geçmişte yaşayan insanlar, ölen kişileri mumyalayarak korumaya, sonraki nesillere aktarabilmek için saklamaya çalışmışlardır. Gelişen teknolojiyle birlikte günümüzde mumyalama işlemine benzer şekilde kişilerin DNA'ları saklanmaya çalışılmaktadır. Sadece insanlar için değil, hayvanlar, bitkiler, hastalık etkenleri ve daha birçok canlı DNA'sı için saklama yöntemleri geliştirilmiştir. Bu amaçla geliştirilen yöntemlerden biri de DNA kütüphaneleri oluşturmaktır.

Gen izolasyonu ve DNA kütüphanelerinin oluşturulması

DNA kütüphanesi; saflaştırma, saklama ve analiz kolaylığı için bir vektör içine klonlanmış her bir organizmaya ait farklı DNA sekansları koleksiyonu

olarak tanımlanabilmektedir. DNA kütüphanesi oluşturabilmek için öncelikle DNA'nın ilgili dokudan izole edilmesi gereklidir. DNA'nın ortamdaki diğer moleküllerden ayrımlanarak izolasyon işlemi tamamlandıktan sonra DNA derişimleri ultraviyole absorpsiyon spektrofotometresi ile hassas olarak ölçülebilir [10]. İzole edilen DNA'ya ilk manipülatif girişim, DNA'nın küçük parçalara ayrılması işlemidir. DNA'nın restriksiyon enzimleri ile parçalara ayrılmasının ardından DNA parçalarının jel elektroforezde yürütülmesi ve otoradyografi ile görüntülenmesi sağlanır [4]. Hedeflenen gen bölgesinden DNA'nın geri kazanımı için jelden gen bölgesinin izolasyonu işlemi gerçekleştirilir. DNA geri kazanımı için geliştirilmiş yöntemlere, ticari olarak üretilen küçük "sepharacyl" kolonlarla yapılan saflaştırma, düşük sıcaklıkta eriyebilen agaroz kullanılarak saflaştırma, elektroelüzyon ve "gene clean" yöntemi örnek olarak gösterilebilir [12]. Bu yöntemlerle istenilen boyuttaki DNA fragmanını saf olarak elde etmek ve DNA'yı herhangi bir aşamada saflaştırmak olasıdır.

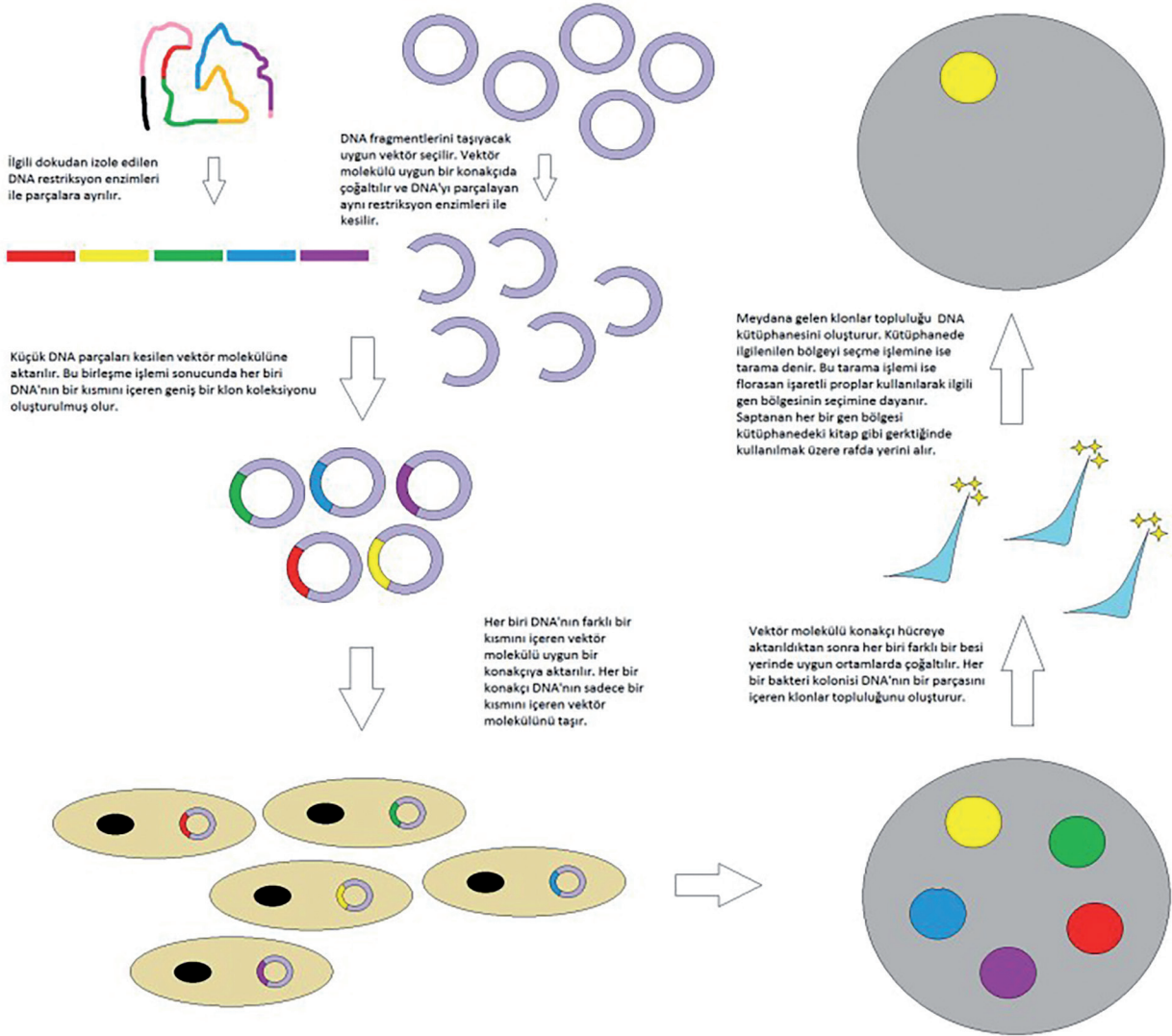
Restriksiyon enzimleri ile kesilen bu küçük DNA parçalarının her biri uygun bir vektöre klonlanır. Hedef bölgenin elde edilmesinin ardından gen kütüphanesi yapımında istenen verimin sağlanabilmesinde kullanılacak vektör seçimi önemli yer tutmaktadır. Vektörler doğal ya da yapay olabilirler. Doğal vektörlerden biri, bakteri içerisinde çok sayıda bulunan ve hem bakteri DNA'sı hem de diğer hemcinsleri ile uyumlu yaşayan plazmit DNA'sıdır. Diğer bir doğal vektör ise bakterileri enfekte eden ve bir bakteri kültüründe koloninin etrafından bolca izole edilebilen faj DNA'sıdır. Bunların haricinde yapay vektör olarak, üzerlerinde oynanarak yetenekleri daha uzun DNA parçalarını içerecek şekilde geliştirilen yapay kromozomlar oluşturulmuştur. Bunlara örnek olarak; BAC (Bakteri Yapay Kromozomu), YAC (Maya Yapay Kromozomu), MAC (Memeli Yapay Kromozomu), HAC (İnsan Yapay Kromozomu), PAC (P1 Yapay Kromozomu) verilebilir [4,11].

Vektör DNA'sının izolasyonunun ardından DNA kütüphanelerinin oluşturulmasında önemli basamaklardan biri de vektör molekülü ve klonlanacak olan DNA molekülünün birbirine bağlanmasıyla gerçekleştirilen ligasyon işlemidir. Kullanılan vektöre göre konakçıya nakil işlemi ise farklılık göstermektedir. Plazmit ve bakteriyofajın konakçı-

ya nakli rekombinant vektörün konakçıya naklinin gerçekleştiği işlem basamağına örnek olarak gösterilmektedir [4].

Bir sonraki işlem basamağı olarak, rekombinant vektörü içine alan konakçının tespit edilmesi

gereklidir. Hangilerinin rekombinant, hangilerinin kendi kendine bağlanan vektör molekülleri içerdiklerini, inaktive edilen gen tarafından kodlanan özellik artık konak tarafından sergilenmediği için saptanabilir.



Şekil 1. Gen izolasyonu ve DNA kütüphanesi oluşturulması işlemi basamakları

Mevcut bir kütüphaneden yararlanarak veya kütüphane oluşturulduktan sonra çalışmaları başlanabilmesi için ilgili gen bölgesinin yerinin saptanması gerekir. Bu amaçla kütüphaneler taranır. Klonlamanın doğrulanması için klonlanan genin DNA sekansının belirlenmesi önemlidir. Kütüphanenin saklanmasıdan önce kütüphane tit-

resi hesaplama ve kütüphane ebatı belirleme işlemleri yapılır [1, 3, 8, 15]

Tüm bu işlemlerin sonunda her biri DNA'nın bir kısmını içeren geniş bir klon koleksiyonu oluşur. Her biri DNA'nın ayrı bir parçasını içeren vektörler, farklı uygun konakçılara aktarılır. Konakçılar uygun bir ortamda büyütülür. Büyüyen her kolo-

ni DNA'nın özel bir kısmının klonlarını içerir. Bu klonlar kütüphanedeki kitaplar gibidir, ancak kütüphanedeki gibi indekse sahip değildir. Kütüphaneden ilgilenilen bölgeyi seçme işlemine "tarama" (screening) denir, bu da en önemli ve son basamaktır. Bu aşamada, klonlanan genin tespiti kütüphanenin taranması ile yapılır. Klonlanan genin DNA sekansı belirlenerek klonlamanın doğrulanması sağlanır. Bu işlemler sonucunda elde edilen gen, gerekli durumlarda izole edilip kullanılmak amacıyla gen kütüphanelerinde depolanır.

Bir DNA kütüphanesi bahsedildiği gibi basit bir şekilde kurulabilir. Gen kütüphanesi oluşturulurken nasıl bir başlangıç materyali kullanıldığı ise önemli bir değerlendirmedir. Kullanılan DNA'nın elde edilmiş şekline göre iki şekilde kütüphane oluşturulabilmektedir. Kromozomal DNA'nın izole edilip, restriksiyon enzimleri ile kesilmesi ve takip eden diğer işlemler sonucunda klonlanması ile genomik kütüphaneler oluşturulmaktadır. İlgili dokudan mRNA'nın izole edilip, sonrasında cDNA sentezlettilmesi ve cDNA'nın klonlanması ile sonuçlanan işlemde ise cDNA kütüphaneleri oluşturulmaktadır.

Gen bölgesinin aktarımında kullanılan vektöre göre kütüphaneler değişik isimlerle adlandırılmaktadır. Örneğin; DNA fragmanlarını konakçıya aktarmak amacıyla vektör olarak maya yapay kromozomunu kullanılmış ise, kütüphane YAC (maya yapay kromozomu) kütüphanesi olarak isimlendirilmektedir [4].

Oluşturulmuş bir kütüphanenin kullanım alanlarından bazıları;

Bir gen izole edilip bir kez klonlandıktan sonra o gen üzerinde yapılabilecek işlemlerin, araştırmaların sınırı yoktur. Birçok alanda değişik organizmalarla çalışılmaktadır. Araştırmacılar bakteri, parazit, virüs ya da daha büyük organizmalar ile çalışabilir. Çalışılan genin izole edilmesi, çalışılan alanı daraltır. Bu da araştırmacıya zaman ve enerji tasarrufu sağlar. Ayrıca izole edilen bu gen bölgesi ya da tüm genom, tekrar aynı kişi veya başka araştırmacılar tarafından kullanılmak istenebilir. Örneğin; teknolojinin hızla ilerlediği içinde bulunduğumuz zamanlarda, Türkiye'de yapılan bir araştırma sonucu tespit edilen bir gen bölgesi internette yayınlanarak, bunun dünyanın diğer ucundaki araştırmacılar tarafından kullanılması sağlanabilir. Buna benzer amaçlarla

organizmaların genleri izole edilmeye çalışılır. Her gen ayrı bir fonksiyon üstlenir ve araştırmacılar tarafından bu fonksiyonlar kullanılarak yeni moleküller üretilmeye çalışılır. Bu sayede hastalıklara çare olacak ilaçlar, aşılarda ve hormonlar sentezlettilir [4].

Günümüzdeki canlılara ait DNA bilgileri, gen kütüphaneleri yardımı ile sonraki nesillere aktararak geleceğe ışık tutulabilir. İnsanların çeşme yaptırıp bunu sonraki nesillere aktararak, yardımseverliğin ölümsüzleştirilmek istendiği düşünüldüğünde, DNA kütüphanesi hazırlanarak gelecekte yaşayacak insanlara çeşme örneğinden çok daha fazla yardımcı olabileceği söylenebilir.

İnsan nüfusunun artışıyla birlikte, besinsel ihtiyaçlar da artmakta, bu da hayvansal ve bitkisel üretimin artırılması zorunluluğunu meydana getirmektedir. Bitki ve hayvanların genetiği değiştirilerek, gen eklenip çıkartılarak onların verimleri arttırılmaya çalışılmaktadır. GDO'lu bitkiler ve broiler tavuklar genetiği değiştirilmiş canlılara örnek gösterilebilir [2, 9]

Oluşturulmuş bir DNA kütüphanesi bir kitap gibidir. Bilim ve teknolojiye gelişmeleri dikkate alarak, yeni her türlü imkandan yararlanmak ve yeni buluşlar kazandırmak için DNA üzerinde çalışmalar yapılır. Çalışmak için izole edilen bu DNA'ların bir kitap gibi saklanması, ihtiyaç olarak görülür. Hastalıklar ve hastalık etkenleri açısından değerlendirildiğinde, sorunlu genlerin keşfedilmesi, mutasyonlu bölgelerin bakım ve onarımının yapılabilmesi, tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi gibi daha birçok amaçla oluşturulan DNA kütüphanelerine, günümüzde olduğu kadar gelecekte de ihtiyaç duyulacağı bir gerçektir.

Kaynaklar

1. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR, (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. Proc Natl Acad Sci, 74 12, 5350-5354.
2. Babaoğlu M, (1999). Bitkilerde gen transferi teknikleri. Ziraat Yüksek Mühendisleri Birliği Dergisi, 322, 24-26.
3. Bhattacharya SS., Wright AF., Clayton JF., Price WH., Philips CI., McKeown CME., Jay M., Bird AC., Pearson PL., Southern EM., Evans HJ., 1984. Close genetic linkage between X-linked retinitis pigmentosa and a restriction fragment length polymorphism identified by recombinant DNA probe L1.28. Nature, 309, 253-255.

4. Brown TA, (2009). Gen klonlama ve DNA analizi (gene cloning& DNA analysis, an introduction). Beşinci Baskıdan Çeviri. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
5. Chen BY, Janes HW, (2002). PCR cloning protocols. 2. Edition, New Jersey, Human Pres.
6. Güran Ş, (2011). Moleküler biyoloji ve genetikteki gelişmelerin ışığında göz hastalıklarında ileri tanı ve tedavi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 53, 74-76.
7. Huang Z, Petty JT, O'Quinn B, Longmire JL, Brown NC, Jett JH, Keller RA, (1996). Large DNA fragment sizing by flow cytometry: application to the characterization of P1 artificial chromosome (PAC) clones. *Nucleic Acids Research*, 24 (21), 4202- 4209.
8. Jodge J, Lund PA, Minchin S, (2007). Gene cloning, principles and applications. NewYork, Taylor&Francis Group, 85-116.
9. Kumlay AM, Dursun A, (2003). Bitki genetik mühendisliği ve ekonomik öneme sahip bazı bitkilerde genetik mühendisliği uygulamaları. *Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg*, 34 (2), 209-216.
10. Lluch MC, Jofre J, Muniesa M, (2011). Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *Plos one*, 6 3:e17549.
11. Lüleyap HÜ, (2008). Moleküler genetiğin esasları. Birinci Baskı. Nobel kitabevi, Adana.
12. Temizkan G, Arda N, (1999). Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. İkinci Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
13. Türkyılmaz S, Esendal ÖM, (2002). Polimeraz zincir reaksiyonu ve mikrobiyolojide kullanım alanları. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 8 (1), 71-76.
14. Ulutin T, (2005). İnsan genom projesi. Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi, Temel Moleküler Hematoloji Kursu. 70-72, Mersin, Türkiye.
15. Yıldırım A, Kandemir N, Karadağ Y, Sakin MA, (2010). Genetik. İkinci Baskı. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.