



Official Publication of  
The Afyon Kocatepe  
University

# K o c a t e p e Veterinary Journal

2016, 9: 2, June



ISSN: 1308-1594  
e-ISSN: 2147-6853

<http://www.kvj.aku.edu.tr>

### ADVISORY BOARDS

#### Publisher

Prof. Dr. Mustafa SOLAK  
Rector

On behalf of Afyon Kocatepe University  
Afyonkarahisar - TURKEY

#### Editor

Prof. Dr. Hatice ÇİÇEK

#### Deputy Editors

Prof. Dr. Zülfükar Kadir SARITAŞ  
Assist. Prof. Dr. Deniz YENİ  
Assist. Prof. Dr. Recep KARA

#### Organising Committee

Assoc. Prof. Dr. Hasan ÇİÇEK  
Assoc. Prof. Dr. C. Çağrı ÇINGİ  
Assoc. Prof. Dr. İbrahim Kılıç  
Assist. Prof. Dr. Murat TANDOĞAN  
Research Assist. Dr. Ulaş ACARÖZ  
Research Assist. Dr. İlkay DOĞAN  
Research Assist. Damla ARSLAN ACARÖZ

*Kocatepe Veterinary Journal is an Peer-Reviewed  
Journal and published four times a year.*

*Kocatepe Veterinary Journal;  
indexed in Journal Index, Academic Index,  
Turkey Citation Index, Google Scholar*

#### Addressed:

*Kocatepe Veterinary Journal,  
Afyon Kocatepe University,  
Faculty of Veterinary Medicine,  
03200, Afyonkarahisar, TURKEY.*

*Tel: +90 272 214 9309  
Fax: +90 272 214 9309  
E-mail: [kvj@aku.edu.tr](mailto:kvj@aku.edu.tr)*

[www.kvj.aku.edu.tr](http://www.kvj.aku.edu.tr)

*\*Only accepts online submission\**

- Prof. Dr. Arif Altıntaş  
Ankara University -Turkey
- Prof. Dr. Atilla Şimşek  
Selçuk University-Turkey
- Prof. Dr. Cevdet Uğuz  
Afyon Kocatepe University-Turkey
- Prof. Dr. Christian Stanek  
University of Veterinary Medicine - Austria
- Prof. Dr. Endre Szuck  
Szent István University - Hungary
- Prof. Dr. Giacomo Rossi  
University of Camerino - Italy
- Prof. Dr. Hidayet Yavuz  
Afyon Kocatepe University-Turkey
- Prof. Dr. İbrahim Demirkan  
Afyon Kocatepe University-Turkey
- Prof. Dr. İlhami Çelik  
Selçuk University-Turkey
- Prof. Dr. İsmail Bayram  
Afyon Kocatepe University-Turkey
- Prof. Dr. Jaroslaw Calka  
University of Warmia and Mazury in Olsztyn - Poland
- Prof. Dr. Jerzy J Jaroszewski  
University of Warmia and Mazury in Olsztyn - Poland
- Prof. Dr. Jerzy Kalczyc  
University of Warmia and Mazury in Olsztyn - Poland
- Prof. Dr. Kenan Çoyan  
Pamukkale University-Turkey
- Prof. Dr. M Hewicker-Trautwein  
University of Veterinary Medicine Hannover - Germany
- Prof. Dr. Marco Bagliacca  
University of Pisa - Italy
- Prof. Dr. Martin Woodward  
Veterinary Laboratories Agency - England
- Prof. Dr. Mustafa Alişarlı  
Ondokuz Mayıs University-Turkey
- Prof. Dr. Nalan Baysu Sözbilir  
Afyon Kocatepe University-Turkey
- Prof. Dr. Recep Aslan  
Afyon Kocatepe University-Turkey
- Prof. Dr. Seyfullah Haliloğlu  
Selçuk University-Turkey
- Prof. Dr. Slawomir Zdunczyk  
University of Warmia and Mazury in Olsztyn - Poland
- Prof. Dr. Tomasz Janowski  
University of Warmia and Mazury in Olsztyn - Poland
- Prof. Dr. Yahya Kuyucuoğlu  
Afyon Kocatepe University-Turkey
- Prof. Dr. Zafer Karaer  
Ankara University-Turkey
- Prof. Dr. Zehra Bozkurt  
Afyon Kocatepe University-Turkey
- Prof. Dr. Zheng-Wei Yang  
North Sichuan Medical College - China
- Assoc. Prof. Dr. Aydın Güzeloğlu  
Selçuk University-Turkey
- Assoc. Prof. Dr. Aysun Demirkan  
Afyon Kocatepe University-Turkey
- Assoc. Prof. Dr. C. Çağrı Çingı  
Afyon Kocatepe University-Turkey
- Assoc. Prof. Dr. Fatih M. Birdane  
Afyon Kocatepe University-Turkey
- Assoc. Prof. Dr. Feride Kırçalı Sevimli  
Afyon Kocatepe University-Turkey
- Assoc. Prof. Dr. Hasan Çiçek  
Afyon Kocatepe University-Turkey
- Assoc. Prof. Dr. Korhan Altunbaş  
Afyon Kocatepe University-Turkey
- Assoc. Prof. Dr. M. Fatih Bozkurt  
Afyon Kocatepe University-Turkey
- Assoc. Prof. Dr. Mehmet Şükrü Gülay  
Mehmet Akif Ersoy University-Turkey
- Assoc. Prof. Dr. Oktay Yılmaz  
Afyon Kocatepe University-Turkey
- Assoc. Prof. Dr. İbrahim Kılıç  
Afyon Kocatepe University-Turkey
- Assist. Prof. Dr. Şebnem Pamuk  
Afyon Kocatepe University-Turkey
- Assist. Prof. Dr. Zeki Gürler  
Afyon Kocatepe University-Turkey
- Dr. Abdulgader Dhawi Alfitouri  
Al Fateh University - Libya
- Dr. Ali Mobeshari  
University of Nottingham - England
- Dr. Csiszter Ludovic  
Banat University of Agri Sci & Vet Med - Romania
- Dr. Eva Sossidou  
NAGREF, Veterinary Research Institute – Greece
- Dr. Fahad Al-Hizab  
King Faisal University – Saudi Arabia
- Dr. Fenghua Chen  
University of Aarhus - Denmark
- Dr. Richard D. Murray  
Liverpool University - England

- 54-60 **Mastitisli Sığırlardan İzole Edilen Enterococcus faecium İzolatlarında *gelE*, *esp* ve *efaAfm* Genlerinin Varlığının İncelenmesi** (Investigation of the Presence of *gelE*, *esp* and *efaAfm* Genes in Enterococcus faecium Isolates Isolated from Mastitic Bovine)  
Tuğçe Bahar HERKMEN, Süheyla TÜRKYILMAZ
- 61-69 **Malatya İlinde Sığırcılık İşletmelerinin Mevcut Durumu:II. Hayvan Sağlığı ve Ahır Hijyeni Perspektifinde Biyogüvenlik Uygulamaları** (Current Status of Cattle Farms in Malatya: II. Biosecurity Applications in Animal Health and Stable Hygiene Perspective)  
Abdurrahman KÖSEMAN, İbrahim ŞEKER
- 70-73 **Kuruluşundan Günümüze Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi** (The Faculty of Veterinary Medicine, Yüzüncü Yıl University Since The Establishment Date)  
Emine TÜRKMENÖĞLU
- 74-79 **Micrococcus luteus'un Bazı Gram pozitif Balık Patojenlerine Karşı Etkisinin Araştırılması** (The investigation of Micrococcus luteus Against Some Gram positive Fish Bacteria)  
Tülay AKAYLI, Çiğdem ÜRKÜ, Özgür ÇANAK, Ece SÖNMEZ, M. Hakan ERK
- 80-87 **Sıçanların Lakrimal Bezlerinde Östrojen ve Progesteron Reseptörlerinin İmmunohistokimyasal Ekspresyonu** (Immunohistochemical Expression of Estrogen and Progesterone Receptors in the Lacrimal Glands of the Rats)  
Emel ALAN, Narin LİMAN
- 88-96 **Combination of Cysteamine and Lipoic Acid Improves the Post-Thawed Bull Sperm Parameters** (Sisteamin ve Alfa Lipoik Asit Kombinasyonunun Dondurulmuş-Çözdürülmüş Boğa Spermisi Parametreleri Üzerine Etkisi)  
Şükrü GÜNGÖR, Adil AKSOY, Deniz YENİ, Fatih AVDATEK, Caner ÖZTÜRK, Mehmet BOZKURT ATAMAN, Kenan COYAN, Mustafa Numan BUCAK, Nuri BAŞPINAR, Pınar PEKER AKALIN

REVIEWS

- 97-104 **Stomoxys (Diptera, Muscidae) Sinekleri ve Taşıdığı Bazı Önemli Paraziter Hastalıklar** (Stomoxys (Diptera, Muscidae) and Transmission of Some Important Parasitic Diseases by Stable flies)  
Bekir OGUZ, Nalan ÖZDAL, Serdar DEĞER
- 105-113 **Gıda Kaynaklı Bakteriye Patojenler** (Food-borne Bacterial Pathogens)  
Didem SAĞLAM, Esra ŞEKER
- 114-121 **Biyogenik Aminler ve Etkileri** (Biogenic Amines and Effects)  
Mürüvvet DÜZ, A. Fatih FİDAN
- 122-126 **Gıdalarda Antibiyotik Kalıntılarının Saptanması için Enzim İmmunoassay Geliştirilmesi** (Enzyme Immunoassay Development for the Detection of Antibiotic Residues in Foods)  
Ulaş ACARÖZ, Damla ARSLAN-ACARÖZ, Zeki GÜRLER
- 127-134 **Gıda Kaynaklı Helminthler** (Foodborne Helminths)  
Esma KOZAN

CASE REPORT

- 135-139 **Bir Koyun Sürüsünde İmidokarb Uygulamasına Bağlı Kalp Kası Hasarının Biyobelirteçler Işığında Değerlendirilmesi: 5 Vaka** (Determining Myocardial Damage in The Light of Biomarkers in A Sheep Flock as a Result of İmidocarb Application: 5 Cases)  
Mehmet Uluşan, Kemal Varol, Gencay Ekinci, Latife ÇAKIR BAYRAM, İhsan Keleş, Ali Cesur Onmaz, Vehbi GÜNEŞ

## Mastitisli Sığırlardan İzole Edilen *Enterococcus faecium* İzolatlarında *gelE*, *esp* ve *efaAfm* Genlerinin Varlığının İncelenmesi<sup>#</sup>

Tuğçe Bahar HERKMEN<sup>1</sup>, Süheyla TÜRKYILMAZ<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimler Enstitüsü, Aydın/TÜRKİYE

<sup>2</sup>Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın/TÜRKİYE

Corresponding author e-mail:sturkyilmaz@adu.edu.tr

#Bu proje Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (Proje No: VTF-15003) desteklenmiştir.

### ÖZ

Bu çalışmada, 600 mastitisli sığır sütünden izole edilen *Enterococcus faecium* izolatlarının önemli virülens genlerinin [jelatinaz (*gelE*), enterokokal yüzey proteini (*esp*), adezyonla ilgili protein (*efaAfm*)] polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile incelenmesi amaçlandı. Enterokok izolasyonu selektif besiyerleri kullanılarak gerçekleştirildikten sonra cins ve tür düzeyinde identifikasyonlar PZR ile doğrulandı. Çalışmada 96 *Enterococcus spp.* izole edilirken; bunların %13,5'i *E. faecium* olduğu belirlendi. Bu izolatların virülens genlerinin incelenmesi sonucunda %69,2'sinin *efaAfm*, %30,7'sinin *gelE* ve %30,7'sinin *esp* genlerini taşıdıkları saptandı. İzolatların %23,1'inin herhangi bir virülens geni taşıymıyordu. Beş farklı virülens genotipi saptandı. Sonuç olarak bu çalışma, mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *E. faecium* izolatlarının yüksek patojenite potansiyeline sahip olduklarını gösterdi. *E. faecium* ile ilişkili diğer virülens faktörlerin tanımlanması, bu virülens faktörlerinin antibiyotiklerle ilişkilerinin ortaya konması konusunda daha geniş kapsamlı araştırmaların yapılması gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *E. Faecium*, *Efaafm*, *Esp*, *Gele*, Mastitis

### Investigation of the Presence of *gelE*, *esp* and *efaAfm* Genes in *Enterococcus faecium* Isolates Isolated from Mastitic Bovine

#### ABSTRACT

In this study, it was aimed to investigate the important virulence genes [gelatinase (*gelE*), adhesion-associated protein (*efaAfm*) and enterococcal surface protein (*esp*)] of *Enterococcus faecium* isolates isolated from 600 mastitic bovine milk samples with polymerase chain reaction (PCR). *Enterococci isolation* was performed with using selective agars. Identifications based on genus and species were also performed with PCR. Only 13.5% isolates were determined as *E. faecium* in 96 *Enterococcus spp.* It was determined that 69.2%, 30.7% and 30.7% isolate were carrying *efaAfm*, *gelE*, and *esp* genes, respectively. 23.1% of the isolates did not carry any virulence genes. Five different genotypes were detected. Finally, it can be said that *E. faecium* isolates isolated from mastitic bovine milk have high pathogenity. It is thought that further studies should be conducted on the definition of virulence factors related to severity of the infection and expending traits of *E. faecium* and their relationships with some kind of antibiotics should also be revealed.

**Key Words:** *E. Faecium*, *Efaafm*, *Esp*, *Gele*, Mastitis

To cite this article: Herkmen TB, Türkyılmaz S. Mastitisli Sığırlardan İzole Edilen *Enterococcus faecium* İzolatlarında *gelE*, *esp* ve *efaAfm* Genlerinin Varlığının İncelenmesi. *Kocatepe Vet J.* 2016; 9(2): 54-60.

## GİRİŞ

Enterokoklar geniş konakçı dağılımına sahip mikroorganizmalar olmakla birlikte; hayvanların sindirim sisteminde bulunan doğal flora bakterileridirler ve özellikle altlık temizliğinin iyi yapılmadığı ve sağım hijyenine dikkat edilmediği durumlarda memeleri kolaylıkla infekte ederek tek başlarına veya genellikle streptokoklar ile birlikte mastitise sebep olabilmektedirler (Smith ve Hogan 2003).

Enterokok türlerinin sahip oldukları antibiyotik dirençliliği, virulens faktörleri ve genetik değişiklikleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, izolatlar arasında konakçı orijinine göre farklılıkların mevcut olduğu, antibiyotik direnç mekanizması ve virulens gen özellikleri yönünden farklı mekanizmalarla bu özellikleri kazandıkları belirtilmiştir (Charles ve ark. 2001, Petersson-Wolfe ve ark. 2007a). İnsandan insana da bulaşma yeteneği olduğu bilinen hayvansal kökenli enterokokların özellikle subklinik mastitisli süt ve süt ürünleri ile insanlara bulaşabileceği bildirilmektedir (Tenhagen ve ark. 2006). Meydana gelen infeksiyonlarda, *E. faecium*, antibiyotiklere karşı *Enterococcus faecalis*'ten daha dirençli olmasıyla dikkat çekmektedir (Lund ve ark. 2002).

Enterokokların patojenitelerine, sahip oldukları çeşitli virulens faktörlerinin önemli katkıları olduğu bilinmektedir. Bu virulens faktörlerinden en önemlilerinden birisi olan enterokokal yüzey proteini (*esp*), bakterinin konak immun sisteminden kaçmasını kolaylaştıran hücre duvarı ile ilgili proteindir (Shankar ve ark. 1999). Jelatinaz (*gelE*), hemoglobin ve diğer biyoaktif bileşenleri parçalayan bir proteazdır. *efaAfm* ise *E. faecium* izolatları tarafından sentezlenen hücre duvar adezinidir (Eaton ve Gasson 2001).

Yapılan daha önceki çalışmalar incelendiğinde, araştırmacıların özellikle klinik vakalardan ve çevresel örneklerden elde edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının virulens genlerinin incelenmesi üzerine odaklanmış oldukları görülmüştür (Eaton ve Gasson 2001, Lanthier ve ark. 2010a). Yurdumuzda mastitisli sığır sütlerinden izole edilmiş olan *E. faecalis* izolatlarının virulens genlerinin incelendiği bir çalışma mevcut olmakla birlikte (Yıldız ve Türkyılmaz 2015), *E. faecium* izolatlarının önemli virulens genlerinin incelendiği bir çalışma şu anki bilgilerimize göre bulunmamaktadır. Bu çalışmada, yöresindeki mastitisli sığır süt örneklerinden izole edilen *E. faecium* izolatlarının önemli virulens genlerinden olan jelatinaz, enterokokal yüzey proteini ve *E. faecium* hücre duvar adezin genlerinin varlığının moleküler yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır. Enterokokların insan sağlığı için önemli bir patojen olduğu düşünüldüğünde, incelenen bu virulens genlerinin yöremizdeki izolatlarda varlığı ve yaygınlığının belirlenebilmesi bu izolatların

patojeniteleri hakkında temel bilgi sağlama potansiyeli taşımaktadır.

## MATERYAL ve METOD

### Materyal

Bu çalışmada 3–9 yaşlı, Holştayn ırkı, son bir ay içerisinde antibiyotik tedavisi uygulanmamış, klinik ya da subklinik mastitisli 600 süt örneği kullanıldı. Klinik mastitisli ineklerde fiziksel muayenede meme loblarında anormallik (şişkinlik, sıcaklık, ağrı, kızarıklık ya da sulu, kanlı, pıhtılı süt gibi) gözlemlenirken; subklinik mastitisli olan ineklerin belirlenebilmesi amacı ile Kalifornia Mastitis Testi (CMT) kullanıldı.

### Referans suşlar

Pozitif kontrol olarak *gelE* geni için *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Lanthier ve ark. 2010a) suşu, *esp* ve *efaAfm* genleri için önceden doğrulanmış kültür bankamızdaki izolatlar; negatif kontrol olarak da *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı.

### Besiyerleri

Süt örneklerinden selektif olarak *Enterococcus* sp.'nin izolasyonu amacıyla Chromocult® *Enterococci* Broth (EB) (Merck) ve BBLTM *Enterococcus* Agar (EA) (BD), organizmaların tuz toleranslarını tespit etmek için %6,5 NaCl içeren Nutrient Broth (NB) (Oxoid) ve izolatların saklanması için %20 gliserinli Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Merck) kullanıldı.

### Primerler

Çalışmada kullanılan primerler hakkında bilgi Tablo 1.'de verilmiştir.

**Tablo 1:** PZR'da kullanılan primerler

**Table 1:** Primers used in PCR

Primer	Dizi (5'-3')	Amplikon Uzunluğu (bp)	Kaynak
Ent1	TACTGACAAACCATTTCATGATG	112	Ke ve ark. 1999
Ent2	AACTTCGTCACCAACGCGAAC		
FAC11	GAGTAAATCAGTGAACGA	1.091	Vilela ve ark. 2006
FAC21	CGCTGATGGTATCGATTTCAT		
<i>gelE</i> F	ACCCCGTATCATTGGTTT	419	Eaton ve Gasson 2001
<i>gelE</i> R	ACGCATTGCCTTTCCATC		
<i>esp</i> F	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC	933	Shankar ve ark. 1999
<i>esp</i> R	CGGTCAACACTTGCATTGGCGA		
<i>efaA</i> FF	AACAGATCCGCATGAATA	735	Eaton ve Gasson 2001
<i>efaA</i> RR	CATTCATCATCTGATAGTA		

### Metot

#### Enterokok İzolasyonu

Mastitisli sığırlardan alınan süt örnekleri laboratuvara getirildikten sonra, ilk olarak EB'a öze dolusu inokule edildiler. Buyyonlar aerob koşullarda 37°C'de, besiyerinin parlak sarı rengi mavi-yeşil renge dönüşüncüye kadar, yaklaşık 24-72 saat inkübe edildi. Renk değişimi olan kültürlerden bir öze dolusu alındı selektif EA'a ekimleri yapıldı. Besiyeri 37°C'de aerob koşullarda 24-48 saat süreyle inkübe edildi. Sürenin sonunda üreyen siyah, koyu kahverengi koloniler

enterokok türleri yönünden şüpheli kabul edilerek, incelenmek üzere tekrar EA'ya pasajlandı.

#### *Enterokok spp.* ve *E. faecium* İdentifikasyonu

Enterokokların cins düzeyinde ayrımı için ekilen selektif besiyerinde siyah, koyu kahverengi üreyen enterokok şüpheli kolonilere Gram boyama, %6,5 tuz içeren NB'da üreme ve katalaz testleri yapıldı (Lanthier ve ark. 2010b). Gram pozitif kok şeklinde görülen, %6,5 tuz içeren NB'da üreyebilen ve katalaz negatif olan kolonilerin identifikasyonları için EA pasajları yapıldı ve 37°C'de 24-48 saat inkube edildi. Süre sonunda şüpheli koloniler PZR ile incelenene kadar -20°C'de %20 gliserinli BHIB içerisinde saklandı. İzolatların cins (Ke ve ark. 1999) ve *E. faecium*'un tür bazında identifikasyonları (Vilela ve ark. 2006) daha önceki çalışmalarda bildirildiği şekilde gibi PZR ile yapıldı.

İzolatlardan DNA ekstraksiyonu ticari bir genomik DNA ekstraksiyon kiti (InstaGene Matrix, BIO-RAD, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. DNA saflık kontrolü ve miktar tayinleri yapıldıktan sonra PZR'da kullanıldı.

#### **PZR**

Çalışmada standart bir PZR işlemi uygulandı. Sikluslar 95°C'de 5 dak. başlangıç denatürasyonu takiben; 95°C'de 30 sn. denatürasyon, 50°C (*efaAfm*), 53°C (*E. faecium*), 54°C (*gelE*), 55°C (*Enterococcus spp.*), 56°C (*esp*) bağlanma, 72°C 60 sn. uzama toplam 30 siklus, 72 °C'de 15 dak. son uzama olacak şekilde ayarlandı.

#### **Sekans Analizi**

*E. faecium* izolatları ile *esp* ve *efaAfm* genleri için pozitif kontrol olarak önceden doğrulanmış kültür bankamızdaki izolatlar kullanıldı. *E. faecium* izolatları ile *esp* ve *efaAfm* virülens genleri varlığını belirlemek için, uygun primerler kullanılarak DNA'lar çoğaltıldı. Elde edilen ampliconlar sekans analizleri için ticari bir firmaya (Macrogen, Hollanda) gönderildiler. Firma saflaştırmaı takiben ABI Primse cihazı ile sekans analizini gerçekleştirdi. Ampliconların sekansları gen bankası ile karşılaştırıldı. Bu amaçla National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanıldı.

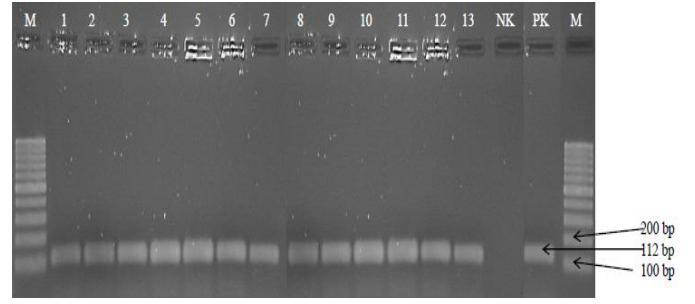
## **BULGULAR**

#### **İzolasyon**

Bu çalışmada 600 mastitisli süt örneğinin incelenmesi sonucunda toplamda 96 enterokok şüpheli izolat elde edildi.

#### **PZR**

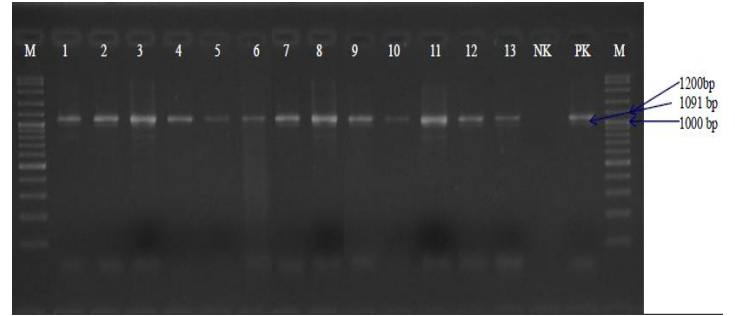
Doksan altı enterokok şüpheli izolat ile yapılan PZR sonrasında 96 izolatın hepsinde 112 bp uzunluğunda amplicon elde edildi ve *Enterococcus spp.* olarak tanımlandı.



**Resim 1:** *Enterococcus spp.* PZR elektroforez görüntüsü 1-13: *Enterococcus spp.* saha izolatları PK: Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212) NK: Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)

**Figure 1:** PCR detection of *Enterococcus spp.* isolated strains 1-13: *Enterococcus spp.* field isolates PK: Positive control (*E. faecalis* ATCC 29212) NK: Negative control (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)

*Enterococcus spp.* olarak tanımlanan 96 izolat DNA'sı ile yapılan PZR sonrasında, izolatların 13 (%13,5)'ünde 1091 bp uzunluğunda amplicon elde edildi ve bunlar *E. faecium* olarak identifiye edildi.



**Resim 2:** *E. faecium* PZR elektroforez görüntüsü 1-13: *E. faecium* saha izolatları PK: Pozitif kontrol (Önceden doğrulanmış kültür bankamızdaki izolat) NK: Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)

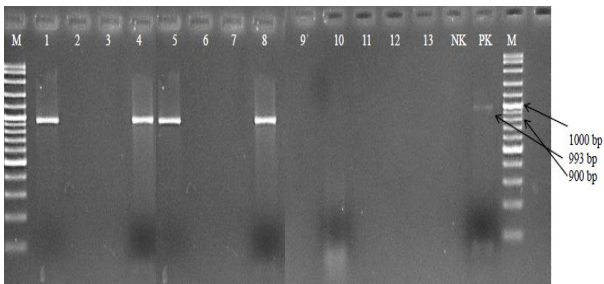
**Figure 2:** PCR detection of *E. faecium* strains 1-13: *E. faecium* field isolates PK: Positive control (Verified isolate in our culture bank) NK: Negative control (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)

Virülens Genleri (*gelE*, *esp*, *efaAfm*): On üç *E. faecium* izolatının virülens genleri yönünden yapılan PZR incelemesi sonucunda 419 bp uzunluğunda amplicon elde edilen 4 izolatın (%30,75) *gelE* geni, 993 bp uzunluğunda amplicon elde edilen 4 izolatın (%30,75) *esp* geni, 735 bp uzunluğunda amplicon elde edilen 9 izolatın (%69,2) *efaAfm* geni pozitif olduğu belirlendi.



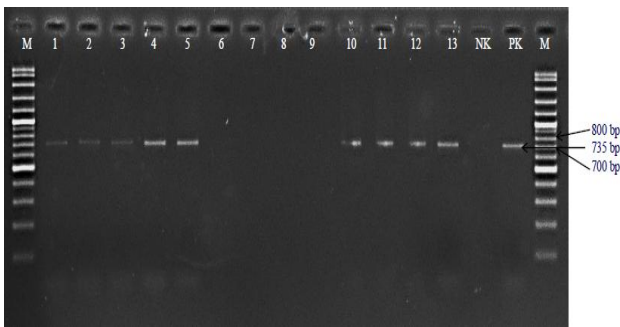
**Resim 3:** Virulens gen PZR (*geE*) 1-4. *geE* geni taşıyan saha izolatları PK: Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212) NK: Negatif Kontrol (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)

**Figure 3:** Virulence gene PCR (*geE*) 1-4. *geE* positive fields isolates PK: Positive control (*E. faecalis* ATCC 29212) NK: Negative control (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)



**Resim 4:** Virulens gen PZR (*esp*) 1-4-5-8: *esp* geni taşıyan saha izolatları PK: Pozitif kontrol (Önceden doğrulanmış kültür bankamızdaki izolat) NK: Negatif Kontrol (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)

**Figure 4:** Virulence gene PCR (*esp*) 1-4-5-8: *esp* positive fields isolates PK: Positive control (Verified isolate in our culture bank) NK: Negative control (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)



**Resim 5:** Virulens gen PZR (*efaAfm*). 1-2-3-4-5-10-11-12-13: *efaAfm* geni pozitif saha izolatları PK: Pozitif kontrol (Önceden doğrulanmış kültür bankamızdaki izolat) NK: Negatif Kontrol (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)

**Figure 5:** Virulence gene PCR (*efaAfm*) 1-2-3-4-5-10-11-12-13: *efaAfm* positive fields isolates PK: Positive control (Verified isolate in our culture bank) NK: Negative control (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)

*E. faecium* izolatlarının taşıdığı virulens genlerinin dağılımı Tablo 2.'de verilmiştir.

**Tablo 2:** *E. faecium* izolatlarının virulens genleri

**Table 2:** Virulence genes of *E. faecium* isolates

	<i>geE</i>	<i>esp</i>	<i>efaAfm</i>	Pozitif virulens gen/genleri (sayısı)
1	+	+	+	<i>geE</i> , <i>esp</i> , <i>efaAfm</i> (3)
2	+	-	+	<i>geE</i> , <i>efaAfm</i> (2)
3	+	-	+	<i>geE</i> , <i>efaAfm</i> (2)
4	+	+	+	<i>geE</i> , <i>esp</i> , <i>efaAfm</i> (3)
5	-	+	+	<i>esp</i> , <i>efaAfm</i> (2)
6	-	-	-	- (0)
7	-	-	-	- (0)
8	-	+	-	<i>esp</i> (1)
9	-	-	-	- (0)
10	-	-	+	<i>efaAfm</i> (1)
11	-	-	+	<i>efaAfm</i> (1)
12	-	-	+	<i>efaAfm</i> (1)
13	-	-	+	<i>efaAfm</i> (1)
<b>Toplam (%)</b>	<b>4</b> 30,7	<b>4</b> 30,7	<b>9</b> 69,2	

Toplam 13 *E. faecium* izolatının virulens genlerinin incelenmesi sonucunda sırasıyla 9 (%69,2) izolatın *efaAfm*, 4 (%30,7) izolatın *geE*, 4 (%30,7) izolatın *esp* genlerini taşıdıkları tespit edildi.

Toplamda altı virulens genotipi mevcuttu. Bir virulens geni taşıyan 5 (%38,4), iki virulens geni taşıyan 3 (%23,0), üç virulens geni taşıyan 2 (%15,3) izolat mevcuttu. Herhangi bir virulens geni taşımayan üç (%23,1) izolat bulunmaktaydı. İzolatların virulens genotiplerinin dağılımı ise Tablo 3'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.:** *E. faecium* izolatlarının taşıdıkları virulens genotipleri

**Table 3:** Genotyping of *E. faecium* isolates

Genotip	Virulens gen sayısı	Virulens gen/genleri	İzolat sayısı	(%)
1	1	<i>esp</i>	1	7,7
2	1	<i>efaAfm</i>	4	30,7
3	2	<i>esp</i> , <i>efaAfm</i>	1	7,7
4	2	<i>geE</i> , <i>efaAfm</i>	2	15,4
5	3	<i>geE</i> , <i>esp</i> , <i>efaAfm</i>	2	15,4
6	0	-	3	23,1
<b>Toplam</b>			<b>13</b>	<b>100,0</b>

## TARTIŞMA

Klinik ve subklinik mastitis vakalarının teşhisi ve kontrolü için hastalığa sebep olan patojenlerin doğru şekilde izolasyonu ve tanımlanması oldukça önemlidir. Laboratuvarlarda, mastitis etkeni bakteriyel patojenlerin izolasyonu ve tanımlanması için, genellikle bu etkenlerin fenotipik özelliklerinin belirlenmesine dayanan biyokimyasal testlerle sonuca

varılmaktadır. Ancak; yalnızca biyokimyasal testlerle etkenin tanımlanması, mastitise sebep olan enterokok gibi bazı bakteri cinsleri açısından zor olduğu için, bu şekilde identifikasyonları güç olan etkenler için moleküler doğrulama gerektirdiği bildirilmektedir (Devriese ve ark. 1999, Bensalah ve ark. 2006).

İnsandan insana da bulaşma yeteneği olduğu bilinen hayvansal kökenli enterokoların özellikle subklinik mastitisli süt ve süt ürünleri ile insanlara bulaştığı bildirilmektedir (Tenhagen ve ark. 2006). Meydana gelen infeksiyonlarda, *E. faecium*, antibiyotiklere karşı *E. faecalis*'ten daha dirençli olmasıyla dikkat çekmekte ve patojenik *E. faecium*'un çok çabuk antibiyotik direnç mekanizması geliştirebilmesinin ve bu özelliğini transfer edebilme kabiliyetinin sağlık açısından önemli bir risk olduğu düşünülmektedir (Lund ve ark. 2002). Mastitisli sığırlardan elde edilen *E. faecium* türlerinde virulens genlerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanılmaması sebebi ile; bu çalışmada, mastitisli sığır sütlerinden elde edilen *E. faecium* izolatlarının bazı önemli virulens genlerinin varlığının moleküler yöntemler kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır. Bunun için ilk aşamada enterokok izolatları selektif besiyerleri kullanılarak izole edilmiş; bu izolatların cins ve tür düzeyinde doğrulamaları moleküler yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Böylece *E. faecium* türünün doğrulanmasında güvenilir ve pratik bir yöntem kullanılmıştır.

Mastitise neden olan *E. faecium* izolatlarının identifikasyonları ile ilgili yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar çalışmanın yapıldığı coğrafik bölgeye göre farklılık göstermektedir. Yurt dışında yapılan çalışmalarda izolasyon oranlarının %6-71 arasında değiştiği görülmektedir (Devriese ve ark. 1999, Petersson-Wolfe ve ark. 2007b). Yurdumuzda bu konu ile ilgili olarak fazla çalışma bulunmamakla birlikte; *E. faecium* izolasyon oranı Afyon'da %18,6 (Kuyucuoğlu 2011), Ankara'da %81,3 (Cengiz ve ark. 2011) olarak belirtilmiştir. Bu çalışmada ise %13,5 oranında *E. faecium* izole edilmiştir. Çalışmalar arasındaki izolasyon oranının değişik olması izolasyonların farklı coğrafik bölgelerden yapılmasından, hayvanların yetiştirme şekillerinin farklı olmasından, hatta süt örneklerinin toplandığı hayvanlarda görülen mastitisin formundan da kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Kromozomal *gelE* geni tarafından kodlanan jelatinaz enzimi kollajen, jelatin, hemoglobinin gibi bir çok küçük peptidleri hidrolize eden ve hayvan modellerinde endoftalmit ve endokardit olgularını şiddetlendiren hücre dışı bir çinko-endopeptidazdır (Eaton ve Gasson 2001). Kommensal *E. faecium* izolatlarıyla kıyaslama yapıldığında klinik *E. faecium* izolatlarında *gelE* pozitifliğinin daha sık saptandığını bildiren çalışmalar mevcuttur (Waar ve ark. 2002, Creti ve ark. 2004). Ayrıca, sebze kaynaklı *E. faecium* izolatlarının %45,5'inde, su kaynaklı izolatların %33,3'ünde *gelE* geninin bulunduğu, klinik

kaynaklı izolatların ise hiçbirisinde *gelE* geni saptanmadığını gösteren ilginç bir çalışma da bulunmaktadır (Abriouel ve ark. 2008). Ekstrasellüler jelatinazı kodlayan *gelE* geni taşıyan izolatlar sulardan (Lanthier ve ark. 2010a), gıdalardan ve klinik vakalardan (Eaton ve Gasson 2001, Semedo ve ark. 2003, Creti ve ark. 2004) izole edilen *E. faecium* izolatlarında sıklıkla bulunduğu bildirilmekte; ancak, mastitisli sığır sütlerinden izole edilen enterokokların jelatinaz oluşumları hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır (Semedo ve ark. 2003). Bir başka çalışmada (Vankerckhoven ve ark. 20004) ise, *gelE* geninin 12 *E. faecalis* endokardit şüşünün tamamında (%100), 19 dışkı şüşünün ise 10'unda (%52.6) saptanmıştır. Bu durum, virülans ve hastalıkta jelatinazın önemini göstermekte ve biyofilm oluşumunda etkin olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada ise yöremizdeki mastitisli sığır sütlerinden izole edilen 13 *E. faecium* izolatlarının %30,7'sinde *gelE* geni varlığı tespit edilmiştir.

Kromozomal *esp* geni tarafından kodlanan ve hücre duvarı ile ilişkili bir protein olan *esp*, hücre yüzeyinde yer alır. Bakteriyi, konağın bağışıklık sisteminden koruduğu düşünülen *esp*, enterokokların üriner sistemde persistansı, kolonizasyonu ve artmış virulensi ile ilişkili bulunmuştur (Shankar ve ark. 2002). Yapılan çalışmalar incelendiğinde genellikle medikal ya da gıda kaynaklı izolatlarda bu gen varlığının incelendiği görülmektedir. Örneğin; *E. faecium* klinik izolatlarında *esp* geni pozitifliğini Eaton ve Gasson (2001) %78, Baylan ve ark. (2011) %6,5 olarak tespit etmişlerdir. Genellikle *esp*'yi kodlayan genlerin gıda kaynaklı enterokok izolatlarına oranla klinik enterokok izolatlarında daha yüksek sıklıkla bulunduğu belirlenmiştir (Eaton ve Gasson 2001). Aynı zamanda gıda kaynaklı *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarında da *esp* geni bulunma sıklığı farklılık göstermektedir. *E. faecium* izolatlarında *esp* genine nadiren rastlanırken, *E. faecalis* izolatlarında bu oran daha yüksektir (Eaton ve Gasson 2001). Bu çalışmada ise yöremizdeki mastitisli sığır sütlerinden izole edilen 13 *E. faecium* izolatının %30,7'sinde *esp* geni varlığı tespit edilmiştir.

*efaAfm*'nin, enterokokların yüzeylere yapışmasını yani adezyonunu sağladığı bildirilmekle birlikte; infeksiyon yapma gücü halen kesin olarak bilinmemektedir (Belgacem ve ark. 2010). *efaAfm* pozitif gen pozitifliğini Tuncer ve Inoğlu (2013), peynirde yaptıkları çalışmada %75, Eaton ve Gasson (2001) ise gıdalar da %82 olarak saptarken, klinik izolatlarda %100 olarak tespit etmişlerdir. *E. faecium*'un hücre duvarı adezinlerinden olan ve bakterinin konak hücrelerine yapışmasından sorumlu olan virulens geni *efaAfm*, bu çalışmamızda mastitisli sığır süt izolatlarının % 69,2'sinde tespit edilerek en çok belirlenen virulens geni olmuştur.

Enterokoklardaki yüzey proteini ve adezyonla ilgili proteinlerin virülans faktörlerinin, konjugasyon sırasında verici ve alıcı bakteriler arasında virülans ve



antibiyotik direnç genlerini içeren konjugatif plazmidlerin transferini kolaylaştırdıkları düşünülmekte, bu genlerin pozitifliği ile plazmidlerle kazanılan antimikrobiyal direnç arasındaki bir ilişkidir kuşulanılmaktadır (Shankar ve ark. 1999, Vankerekhoven ve ark. 2004). İzolatlarımız arasında bu iki virulens genine de yüksek oranda rastlanması, mastitisli sığır sütlerinde elde edilen bu izolatların patojenite potansiyellerinin yüksek olabilecekleri hakkında fikir vermektedir.

Yurdumuzda veteriner sahada mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *E. faecium* izolatlarının virulens genlerinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Tüm hijyenik uygulamalara rağmen, mastitis probleminin sürmesi, saha izolatlarının virulens faktörlerinin incelenmesinin önemini artırmakta ve aşıların da dahil olduğu kontrol programlarının geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu çalışmadan sağlanan bilgilerin kullanılması özellikle enterokokların neden olduğu mastitis koruma programlarının düzenlenmesine katkı sağlayacaktır.

#### KAYNAKLAR

**Abriouel H, Omar NB, Molinos AC.** Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *Int J Food Microbiol* 2008; 123: 38-49.

**Baylan O, Nazik H, Bektore B, Citil BE, Turan D, Ongen B, Özyurt M, Açıkel CH, Haznedaroğlu T.** The relationship between antibiotic resistance and virulence factors in urinary enterococcus isolates. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45: 430-445.

**Belgacem ZB, Abriouel H, Omar NB, Lucas R, Martinez-Canamero M, Galvez A, Manai M.** Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control* 2010; 21: 462-470.

**Bensalah F, Flores MJ, Mouats A.** A rapid PCR based method to distinguish between *Enterococcus* species by using degenerate and species-specific *sodA* gene primers. *African J Biotechnol* 2006; 5: 607-702.

**Cengiz S, Tekin O, Akan M.** Mastitislerden izole edilen enterokokların moleküler tiplendirilmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2011; 58: 17-20.

**Charles MAPF, Albrecth BMS, Nuham KY, Marc V, Jean S, Wilhelm HH.** Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among *Enterococcus* isolated from food. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 4385-4389.

**Creti R, Imperi M, Bertuccini L.** Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *J Med Microbiol* 2004; 53: 13-20.

**Devriese LA, Hommez J, Laevens H, Pot B, Vandamme P, Haesebrouck F.** Identification of aesculinhydrolyzing *Streptococci*, *Lactococci*, *Aerococci* and *Enterococci* from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Vet Microbiol* 1999; 70: 87-94.

**Eaton TJ, Gasson MJ.** Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microb* 2001; 67: 1628-1635.

**Ke D, Picard FJ, Martineau F, Menard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron M.** Development of a PCR assay for rapid detection of *Enterococci*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3497-3503.

**Kuyucuoğlu Y.** Antibiotic resistances of enterococci isolated from bovine subclinical mastitis. *Eurasian J Vet Sci* 2011; 27: 231- 234.

**Lanthier M, Scott A, Lapen D, Zhang Y, Topp E.** Frequency of virulence genes and antibiotic resistances in *Enterococcus* sp. isolates from wastewater and feces of domesticated mammals and birds, and wildlife. *Canadian J Microbiol* 2010b; 56: 715-29.

**Lanthier M, Scott A, Zhang Y, Cloutier M, Durie D, Henderson VC, Wilkes G, Lapen DR, Topp E.** Distribution of selected virulence genes and antibiotic resistance in *Enterococcus* species isolated from the South Nation River drainage basin, Ontario, Canada. *J Appl Microbiol* 2010a; 110: 407-421.

**Lund B, Adamsson I, Edlund C.** Gastrointestinal Transit Survival of an *Enterococcus faecium* probiotic strain administered with or without vancomycin. *Intl J Food Microbiol* 2002; 77: 109-115.

**Nam HM, Lim SK, Moon JS, Kang HM, Kim JM, Jang KC, Kang MI, Joo YS, Jung SC.** Antimicrobial resistance of *Enterococci* isolated from mastitic bovine milk samples in Korea. *Zoonoses Public Health* 2009; 57: e59-64.

**Petersson-Wolfe CS, Adams S, Wolf SL, Hogan JS.** Genomic typing of *Enterococci* isolated from bovine mammary glands and environmental sources. *J Dairy Sci* 2007b; 91: 615-619.

**Petersson-Wolfe CS, Wolf SL, Hogan JS.** In vitro growth of *Enterococci* of bovine origin in bovine mammary secretions from various stages of lactation. *J Dairy Sci* 2007a; 90: 4246-4231.

- Semedo T, Santos MA, Lopes MF, Figueiredo Marques JJ, Barreto Crespo MT, Tenreiro R.** Virulence factors in food, clinical and reference Enterococci: a common trait in the genus? *Syst Appl Microbiol* 2003; 26: 13–22.
- Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS.** Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 1999; 67: 193–200.
- Smith KL, Hogan JS.** Environmental mastitis caused by species of *Streptococcus* and *Enterococcus*: risk factors and control. Ohio Agricultural Research and Development Center The Ohio State University Wooster, USA, 2003.
- Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W.** Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci* 2006; 89: 2542–2551.
- Tuncer Y, Inoğlu ZN.** Safety assessment of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from Turkish tulum cheese. *J Safety* 2013; 33: 369-377.
- Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C.** Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4473-4479.
- Vilela, MA, Souza, SL, Palazzo ICV, Ferreira JC, Morais Jr MA, Darini ALC, Morais MMC.** Identification and molecular characterization of Van A-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Northeast of Brazil. *Mem. Inst. The Mem I Oswaldo Cruz* 2006; 101: 716-719.
- Waar K, Muscholl-Silberhorn AB, Willems RJ, Slooff MJ, Harmsen HJ, Degener JE.** Genogrouping and incidence of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in liver transplant patients differ from blood culture and fecal isolates. *J Infect Dis* 2002; 185: 1121-1127.
- Yıldız Ö, Turkyilmaz S.** Investigation of virulence genes of *Enterococcus faecalis* strains isolated from mastitic bovine milk. *Isr J Vet Med* 2015; 70: 16-22.

## Malatya İlinde Sığırcılık İşletmelerinin Mevcut Durumu:II. Hayvan Sağlığı ve Ahır Hijyeni Perspektifinde Biyogüvenlik Uygulamaları

Abdurrahman KÖSEMAN<sup>1</sup>, İbrahim ŞEKER<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>İnönü Üniversitesi, Akçadağ Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Malatya/TURKEY

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootehni Anabilim Dalı, Elazığ/TURKEY

Corresponding author e-mail: iseker52@gmail.com

### ÖZ

Bu araştırma, Malatya ilindeki sığırcılık işletmelerinin biyogüvenlik bakımından mevcut durumlarını tespit etmek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla belirlenen ilçelerden tesadüfi örnekleme metodu kullanılarak seçilen 172 adet sığırcılık işletmesi sahibine yüz yüze anket uygulanmıştır. Araştırmada, hayvanların Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı veri tabanına kaydedilmesi %98,8, tüberküloz kontrol ve test kayıtlarının tutulması %97,7, hasta hayvanların kaydının tutulması %34,3, hayvan sevklerine ait belgelerin muhafazası ve hayvan hareketlerinin kaydının tutulması %51,7, şap hastalığı aşısının düzenli yapılması %97,7, barınak ve çevresinin temizliği %95,3, uygun ve yeterli gübre çukurunun varlığı %21,5 ve farklı türden hayvanların bir arada bulundurulması %9,9 oranlarında tespit edilmiştir. Araştırmada elde edilen bulgulara göre; işletmelerde, hayvan sağlığı ve ahır hijyenine dayalı biyogüvenlik uygulamaları bakımından birçok parametrenin “kabul edilebilir” noktada olduğu, ancak bazı barınak şartları bakımından dikkat çekici düzeyde yetersizlikler bulunduğu belirlenmiştir. Özellikle, durakların uygun ölçü ve niteliklere sahip olmadığı, uygun olanların ise sadece %9,9 oranında kaldığı tespit edilmiştir. Çok düşük olan bu oran işletmelerin bu açıdan ciddi bir eksiklik ve olumsuzluk taşıdığını göstermektedir. Biyogüvenlik kurallarının uygulanması kârlılık, sürdürülebilir üretim ve halk sağlığı açısından gerekli olduğundan, mevcut olumsuzlukların giderilmesi için önlemler ivedilikle alınmalıdır. Biyogüvenlikle ilgili iş ve işlemlerin daha bilinçli yapılması için, yetiştiricilere yönelik eğitim ve bilgilendirme çalışmalarına önem verilmelidir. Yetiştirici birlikleri, işletmelere hizmet veren serbest veteriner hekimler ve Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının ilgili birimleri konu üzerinde hassasiyet göstermelidirler. Bakanlık teşkilatlarının görevlerinden olan hayvanların tanımlanması ve tescili, hayvan sevklerinin tanzimi, işletmelerin biyogüvenlik çerçevesinde izlenmesi ve aşılama programlarının takibi daha etkin biçimde yapılmalıdır. Gerektiğinde idari yaptırımlar uygulanmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Biyogüvenlik, İşletme, Hijyen, Aşılama.

### Current Status of Cattle Farms in Malatya: II. Biosecurity Applications in Animal Health and Stable Hygiene Perspective

#### ABSTRACT

This research was conducted to determine the biosecurity conditions of cattle farms in Malatya. 172 breeders are interviewed by using the random sampling method in selected cattle farms in specific districts. It is found out that the record of animals in Ministry of Food, Agriculture And Livestock database is 98.8%, the tuberculosis control and test records is 97.7%, the record of sick animals is 34.3%, keeping the animal movement documents and the recollection of them is 51.7%, regular vaccination of FMD is 97.7%, the shelter and its environment sanitation is 95.3%, the appropriate and adequate septic tanks existence is 21.5% and keeping different animal species is 9.9%. When animal health and shelter hygiene conditions are evaluated, it is determined that several parameters are “acceptable”, however, the others are considerably insufficient. It is stated that the stalls have inadequate measures and qualities, but the accepted ones are only 9.9%. This low ratio indicates that farms are seriously inadequate and problematic. Precautions should be taken to obtain profitability, sustainable production and public health immediately. Thus, it is necessary to care training and informing of farmers to have conscious work and applications. Breeding associations, free veterinarians serving the farms and the Ministry's related units should carefully work for the subjects. Animal identification and registration, reporting of animal movement, controlling farms for biosecurity and vaccination programmers should efficiently be conducted. Administrative sanctions must be applied when needed.

**Key Words:** Biosecurity, Farms, Hygiene, Vaccination.

To cite this article: Köseman A, Şeker İ. Malatya İlinde Sığırcılık İşletmelerinin Mevcut Durumu:II. Hayvan Sağlığı ve Ahır Hijyeni Perspektifinde Biyogüvenlik Uygulamaları. *Kocatepe Vet J. 2016; 9(2): 61-69.*

## GİRİŞ

İnsanların sağlıklı ve dengeli beslenmesinde çok önemli bir yeri olan hayvansal gıdaların üretildiği işletmelerde, kaliteli ve daha fazla ürün elde edilmesi, mutlu ve sağlıklı hayvanlarla kârlı ve sürdürülebilir yetiştiricilik yapılması, gıda güvenliği ve güvencesi ile tüketici sağlığı ve memnuniyeti konuları biyogüvenlik ile doğrudan ilişkilidir. Hayvancılığın giderek tüketici odaklı bir faaliyete dönüşmesi, ekolojik tarım ve iyi tarım uygulamaları ile sürdürülebilir tarım politikalarının günümüzde değer kazanması, buna karşın işletmelerin büyük oranda entansif hale gelmesi ve yığınsal üretimin yaygınlaşması biyogüvenlik konularını daha da önemli duruma getirmektedir (Köseman 2008).

Bir enfeksiyonun duyarlı bir sürüye, bölgeye veya ülkeye girişini veya bulaşmasını önlemek için alınan ya da uygulanan tedbirler bütünü olan biyogüvenlik, sürüde veya işletmede enfeksiyöz hastalık riskini azaltma uygulamalarının bir parçasıdır. Biyogüvenlik aynı zamanda çiftlik planı, sürü yönetimi, dekontaminasyon uygulamaları, pest kontrolü ve aşılama uygulamalarının doğru ve yerinde uygulanmasını da kapsamaktadır (Erganiş 2015).

Hastalıklardan arındırılmış modern hayvancılık işletmelerinde karlılık söz konusu olduğu gibi hastalıkların varlığı ekonomik kayıplara neden olabilmektedir. Oluşacak ölüm ve verim kayıplarının yanı sıra yüksek tedavi masrafları, kaybedilen zaman ve emek, işletmeye yüksek maliyetler getirmektedir (Aksoy 2011).

Mastitisin yetiştiriciye maliyetini ortaya koymak için yapılan projeksiyonda; üretimde azalma (\$121), yerine koyma maliyeti (\$41,73), ıskartaya çıkarılan süt (\$10,45), tedavi (\$7,36), veteriner servisi (\$2,72), ek iş gücü (\$1,14) olmak üzere hayvan başına toplam (\$184,40) mali kayıp hesaplanmıştır (Akartuna 2008). Oysa barınaklarda hastalıkların yayılmasını önlemek ve hastalığı kontrol altına almak mümkündür. Bulaşıcı hastalıklardan kaynaklanabilecek riskleri ortadan kaldırmak için yapılması gereken ise biyogüvenlik ve hastalık önleme kurallarını etkin biçimde uygulamaktır (Sungur ve Çöven 2009).

Türkiye ekonomisi açısından önemli bir faaliyet alanı olan hayvancılık sektörü, özellikle Doğu Anadolu Bölgesi için de hayati önem arz etmektedir. Bölgenin iklim ve coğrafi koşulları ile sosyo-ekonomik ve kültürel yapısı bunda etkili olmaktadır. Bölgenin önemli illerinden olan Malatya için de tarımsal ekonomi ve hayvancılık temel gelir kaynağıdır. İldeki mevcut sığır varlığı incelendiğinde; 2013 yılı verilerine göre Türkiye'deki toplam sığır varlığının yaklaşık %0,90'ına sahip olduğu anlaşılmaktadır. Malatya'daki toplam sığırcılık işletmelerinin sayısı 25,199 adet olup, 1-5 baş sığıra sahip işletme sayısı 19,407 adettir. 6-10, 11-25 ve 26 baş ve üzeri sığırı olanlar ise aynı sırayla 3,441, 1,595 ve 756 adettir. İldeki kombine işletme sayısı 3,293 adet ve sadece süt

sığırcılığı yapan işletme sayısı ise 20,564 adettir (Anonim 2013b, Anonim 2014a, Anonim 2014b). Malatya'da yetiştiricilerin devletten sağladıkları veteriner hekimlik hizmetleri (ruhsatlandırma, kontrol ve denetim, programlı aşılama ve yapılmaması, hayvanların kayıt altına alınması vb) %2,1, serbest veteriner hekimlerden sağlanan hizmetler ise (hastalık teşhis ve tedavileri, suni tohumlama, danışmanlık vb) % 93,8'dir (Köseman ve Şeker 2016).

Son yıllarda değişik vesilelerle ülke gündemine gelen biyogüvenlik uygulamaları, hayvan sağlığı, hayvansal ürünlerin kalitesi ve gıda güvenliği ile halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. Yapılan incelemelerde Malatya ilindeki sığırcılık işletmelerinin biyogüvenlik düzeyinin tespitine yönelik yapılmış bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Oysa bu konularda yapılan çalışmalar, sahadaki mevcut problemlerin tanımlanması ve gerekli çözümlerin ortaya konulması bakımından büyük katkılar sağlayabilmektedir. İldeki sığırcılık işletme/hayvan sayısı ve üretim kapasitesi dikkate alındığında mevcut çalışmanın Malatya için gerekli, yararlı ve önemli olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma, Malatya ilinde faaliyet yürüten sığırcılık işletmelerinin hayvan sağlığı ve ahır hijyeni perspektifinde mevcut biyogüvenlik durumlarının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

**Materyal:** Araştırmada, Malatya ilinde sığır yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Battalgazi, Yeşilyurt ve Doğanşehir İlçelerinde bulunan 10 baştan fazla hayvan varlığına sahip 172 adet sığırcılık işletmesi sahibiyile yüz yüze yapılan anket uygulamalarından elde edilen veriler kullanılmıştır. Bu çalışma 2015 yılı Mart- Mayıs ayları arasında yürütülmüştür.

**Metot:** Araştırmanın yapılacağı ilçe ve işletmelerin belirlenmesinde Malatya İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü veri tabanından yararlanılmış, en fazla hayvan ve işletme sayısına sahip ilçeler belirlenmiştir. Bu ilçelerde araştırmaya dahil edilecek işletmelerin seçiminde tesadüfi örnekleme metodu kullanılmıştır.

Daha sonra bir takvime bağlı olarak, bu işletmeler ziyaret edilmiş, anket uygulaması için yüz yüze görüşmeyi kabul eden işletme sahipleriyle yapılan görüşmelerden elde edilen veriler kayıt altına alınmıştır. Araştırmada anketör olarak çalışacak kişiler konu hakkında özel olarak eğitime tabi tutulmuş ve bazı işletmelerde deneme amaçlı uygulamalar yapılmıştır.

Çalışmanın, Malatya ilinde sığırcılık işletmelerinin yapısal özelliklerinin incelendiği birinci kısmında Battalgazi, Yeşilyurt, Akçadağ ve Doğanşehir ilçelerindeki 196 işletmeye ait veriler kullanılmıştır (Köseman ve Şeker 2016). Aynı çalışmanın ikinci kısmı olarak gerçekleştirilen bu araştırmada ise, gönüllülük esasına dayalı yapılan anketlere bazı

işletme sahiplerinin katılmamayı tercih etmeleri nedeniyle, toplam 172 işletmede uygulanan anket çalışmasından elde edilen veriler kullanılmıştır.

Çalışmalarda örnek büyüklüğünün fazlaştırılması popülasyonun gücünü oransal olarak artırmasına rağmen; artırılan örnek büyüklüğü, aynı zamanda araştırma için harcanacak zamanın artmasına ve maliyetin de yükselmesine neden olmaktadır (Cochran 1977, Sümbüloğlu ve Sümbüloğlu 1998). Bu çalışmadaki örnek büyüklüğü, bahsi geçen koşullar göz önüne alınarak ve popülasyonun imkanlar ölçüsünde azami temsil edilmesine özen gösterilerek belirlenmiştir. Ayrıca, ele alınan evren büyüklüğü 2500 olan bir çalışmada örnekleme hatası  $\pm 0,10$ , gerçekleşme olasılığı  $p=0,8$ , gerçekleşmeme olasılığı  $q=0,2$  olarak ele alındığında; örneklem büyüklüğünün 60 olması yeterlidir (Yazıcıoğlu ve Erdoğan 2004). Malatya'daki 10 baş üzeri sığırcılık işletmelerinin toplam sayısı 2,351 adet olduğundan, çalışmadaki 172 olan örnek büyüklüğü evreni yeterince temsil etmektedir.

Ankette yer alan sorular, Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu (TKDK) tarafından desteklenen işletmelerin denetlenmesinde kullanılan denetleme formlarından sağlanmıştır (Anonim 2015d). Yapılan anket çalışmasına ait soruların hazırlanmasında, denetleme formunun içeriğine sadık kalınmış, orada yer alan konuların dışına çıkılmamıştır. İstatistiki analizlerinde, SPSS programından yararlanılmış olup, her parametre için sayısal ve yüzde (%) frekanslar hesaplanmıştır (Anonim 2015b).

## BULGULAR

### İşletmelerde biyogüvenliğe ait işlemlerin kayıtlarının tutulması

Yapılan çalışmada, hayvanların Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı veri tabanına kaydedilmesi, tüberküloz kontrol ve test kayıtlarının tutulması, reçetelerin muhafazası ve kayıtlarının tutulması, hasta hayvanların kaydının tutulması, hayvan sevklerine ait belgelerin muhafazası ve hayvan hareketlerinin kaydının tutulması, kanatlı, kemirgen ve haşere kontrolünün yapılması ve kayıtlarının tutulmasına ait elde edilen bulgular Tablo 1'de verilmiştir. Mevcut çalışmada, işletmelerdeki hayvanların Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı veri tabanına kaydedilmesine ait oran %98,8, hayvan sevklerine ait belgelerin muhafazası ve hayvan hareketlerinin kaydının tutulmasına ait oran ise %51,7 olarak hesaplanmıştır. Araştırmada, tüberküloz kontrol ve testleri için kayıtlarının tutulmasına ait oran %97,7, reçetelerin muhafazası ve kayıtlarının tutulmasına ait oran %97,7 ve kanatlı, kemirgen ve haşere kontrolünün yapılması ve kayıtlarının tutulmasına ait oran ise %98,3 olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 1:** Malatya'daki sığırcılık işletmelerinde kayıt tutma.

**Table 1:** Recording in cattle farms in Malatya.

Hayvanların Bakanlık veri tabanına kaydedilmesi	Frekans	Oran (%)
Evet	170	98,8
Hayır	2	1,2
Toplam	172	100
Tüberküloz kontrol ve test kayıtlarının tutulması	Frekans	Oran (%)
Evet	168	97,7
Hayır	4	2,3
Toplam	172	100
Reçetelerin muhafazası ve kayıtlarının tutulması	Frekans	Oran (%)
Evet	168	97,7
Hayır	4	2,3
Toplam	172	100
Hasta hayvanların kaydının tutulması	Frekans	Oran (%)
Evet	59	34,3
Hayır	113	65,7
Toplam	172	100
Hayvan sevklerine ait belgelerin muhafazası ve hayvan hareketlerinin kaydının tutulması	Frekans	Oran (%)
Evet	89	51,7
Hayır	83	48,3
Toplam	172	100
Kanatlı, kemirgen ve haşere kontrolünün yapılması ve kayıtlarının tutulması	Frekans	Oran (%)
Evet	169	98,3
Hayır	3	1,7
Toplam	172	100

### İşletmelerde aşılama ve tedavi uygulaması

Araştırmada, işletmelerde şap aşısının uygulanması ve hayvanların tedavileri için veteriner hekimlerden ne ölçüde yararlandığına ilişkin veriler Tablo 2'de verilmiştir. Diğer bulaşıcı hastalıklara göre hızlı yayılması ve klinik belirtilerinin yetiştiriciler tarafından daha fazla farkedilebilmesi nedeniyle yapılan çalışmada tek başına değerlendirmeye alınan şap aşısının işletmelerde düzenli yapılmasına ait oran %97,7 hesaplanmıştır. Mevcut çalışmada hayvanlara yapılan tedavi girişimlerinin sadece veteriner hekimlerce yapılmasına ait oran %94,2 olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 2:** Malatya'daki sığırcılık işletmelerinde aşılama ve tedavi uygulamaları.

**Table 2:** The vaccination and therapy applications in cattle farms in Malatya

Şap aşısının düzenli yapılması	Frekans	Oran (%)
Evet	168	97,7
Hayır	4	2,3
Toplam	172	100
Tedavilerin sadece veteriner hekimlerce yapılması	Frekans	Oran (%)
Evet	162	94,2
Hayır	10	5,8
Toplam	172	100

### Barınak yapısı ve ekipmanların durumu

Barınaklarda uygun havalandırma ve aydınlatma yapılması, barınak ve çevresinin temizliği, barınak duvar ve zemininin temizlenebilirliği, uygun ve yeterli gübre çukurunun varlığı, farklı türden hayvanların bir arada bulundurulması ve bağlama bölümlerinin hayvanların ihtiyaçlarına uygunluğuna ait bilgiler Tablo 3'te bildirilmektedir. Yapılan çalışmada barınaklarda uygun havalandırma ve aydınlatma yapılmasına ait oran %95,9 olarak tespit edilmiştir. Mevcut çalışmada, barınak ve çevresinin temizliğine ait oran %95,3, barınak duvar ve zemininin temizlenebilirliğine ait oran ise %91,3 olarak hesaplanmıştır. İşletmelerde uygun ve yeterli gübre çukurunun varlığına ait oran %21,5, farklı türden hayvan bulundurulmasına ait oran %9,9 ve bağlama/barındırma bölümlerinin hayvanların ihtiyaçlarına uygunluğuna ait oran ise %9,9 olarak belirlenmiştir.

**Tablo 3:** Malatya'daki sığırcılık işletmelerinin barınak yapısı ve temizlik durumları.

**Table 3:** Shelter structure and cleanliness of the cattle farms in Malatya.

Barınaklarda havalandırma ve aydınlatma yapılması	uygun	Frekans	Oran (%)
Var		165	95,9
Yok		7	4,1
Toplam		172	100
Barınak ve çevresinin temizliği	Frekans	Oran (%)	
Evet	164	95,3	
Hayır	8	4,7	
Toplam	172	100	
Barınak duvar ve zemininin temizlenebilirliği	Frekans	Oran (%)	
Evet	157	91,3	
Hayır	15	8,7	
Toplam	172	100	
Uygun ve yeterli gübre çukurunun varlığı	Frekans	Oran (%)	
Var	37	21,5	
Yok	135	78,5	
Toplam	172	100	
Farklı türden hayvanların bir arada bulundurulması	Frekans	Oran (%)	
Var	17	9,9	
Yok	155	90,1	
Toplam	172	100	
Bağlama/durak/barındırma bölümlerinin hayvanların ihtiyaçlarına uygunluğu	Frekans	Oran (%)	
Evet	17	9,9	
Hayır	155	90,1	
Toplam	172	100	

### İşletmelerdeki suyun biyogüvenlik açısından değerlendirilmesi

Araştırmada yeterli ve uygun su kaynağının varlığı ve suyun analiz yaptırılmasına ilişkin bulgular Tablo 4'de belirtilmiştir. İşletmelerde yeterli ve uygun su kaynağının varlığına ait oran %97,1 ve suyun analiz yaptırılmasına ait oran ise %6,4 olarak hesaplanmıştır.

**Tablo 4:** Malatya'daki sığırcılık işletmelerinin su varlığı ve su analizi.

**Table 4:** Water sufficiency and water analyzing in cattle farms in Malatya.

Yeterli ve uygun su kaynağının varlığı	Frekans	Oran (%)
Var	167	97,1
Yok	5	2,9
Toplam	172	100
Suyun analiz yaptırılması	Frekans	Oran (%)
Evet	11	6,4
Hayır	161	93,6
Toplam	172	100

### TARTIŞMA

#### İşletmelerde biyogüvenliğe ait işlemlerin kayıtlarının tutulması

Yapılan çalışmada, işletmelerdeki hayvanların Bakanlığın veri tabanına kaydedilmesine ait oran %98,8 olarak hesaplanmıştır. Mevcut çalışmada hayvanların büyük çoğunluğunun veri tabanına kaydedilmiş olduğu tespit edilmiştir. Türkiye genelinde hayvancılık istatistikleri ile ilgili bilgiler TÜİK ve TÜRKVET kayıt sistemlerinde tutulmaktadır. Bebek (2014) bildirişine göre Malatya ili için 2014 yılı sığır sayısı TÜİK verilerinde 137, 368 baş ve TÜRKVET kayıt sisteminde 169, 708 baştır. Ayrıca bu farklılığın Malatya dışındaki diğer 8 ilde de %20 nin üzerinde olduğu belirtilmiştir. Bu durum, gerçek hayvan sayısının ne olduğunun ve hangi veri tabanının gerçek bilgiyi verdiğinin bilinmesini engellemekte, kayıtlara olan güveni zedelemektedir.

Mevcut çalışmada, hayvan sevklerine ait belgelerin muhafazası ve hayvan hareketlerinin kaydının tutulmasına ait oran %51,7 olarak tespit edilmiştir (Tablo 1). Halbuki hayvanların tanımlanmasına ilişkin yürürlükte olan yönetmelikte; hayvan sahiplerinin, işletmesindeki hayvanların tanımlanmalarını sağlamak, doğum, ölüm, kesim, zorunlu kesimleri ile işletmelerine ve işletmelerinden olacak tüm hayvan hareketleri ile ilgili kayıtları tutmak, yetkililerce talep edilmesi halinde son üç yıl içerisinde sorumlu olduğu hayvanlara ilişkin işletme kayıtlarını vermekle yükümlü olduğu bildirilmiştir (Anonim 2011).

Mevzuat gereğince hayvanların tamamının veri tabanına kaydedilmesi gerekirken yapılan çalışmada kaydedilmeyen hayvanların olduğunun tespiti, mevzuatın getirdiği yükümlülük ve zorunluluğa

rağmen, hayvan sevklerine ait belgelerin muhafazasında ve hayvan hareketlerinin kaydının tutulmasında önemli eksikliğin bulunduğu göstermektedir.

Şanlıurfa'da süt sığırcılığı işletmelerinin %68'inin işletme içi kayıt tuttuğu belirlenmiştir. Çalışmada tespit edilen bu oran, araştırmacılar tarafından, yetiştiricilerin bilinçli ve uzun vadeli planlar yapma eğiliminde olduklarının göstergesi olarak değerlendirilmiştir (Yener ve ark. 2013). Hayvancılıkta kamuoyu bilincinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, tespit edilen en dikkat çekici verinin yetiştiricilere ait olduğu, hayvanların kimliklendirilmesi konusundaki bilgi düzeylerinin %10-20, hayvanların kayıt altına alınmasındaki desteklemeler konusunda ise bilgi düzeylerinin %23 olduğu bildirilmiştir (Çağatay 2014).

Malatya'da işletmelerin en önemli kayıtlarından olan hayvan sevklerine ait belgelerin muhafazası ve hayvan hareketlerinin kayıtları daha düşük oranda tutulmaktadır. İşletmede biyogüvenliğin etkinleştirilmesinin yanı sıra yasal açıdan gerekli olan kayıt tutma işlemlerine önem verilmelidir. Bebek (2014)'e göre hayvanların veri tabanına etkin kaydedilmesinde, eğitim ve bilgilendirme çalışmaları (hayvan hareketleri, doğum, ölüm, kesim, işletmede zorunlu kesim, düşüm bildirimlerine ve idari para cezalarına yönelik bire bir eğitim), izleme ve veri analizi (kesimhane, hayvan satış yerleri, mera/yayla işletmeleri, hareket bilgi raporu), denetim (küpeleme yetki devri yapılan işletmeler ve kurum/kuruluşların denetimi, nokta kontroller) ile idari yaptırımlar gerekmektedir.

Araştırmada, tüberküloz kontrol ve testleri için kayıtlarının tutulmasına ait oran %97,7 olarak belirlenmiştir (Tablo 1). Tüberküloz, hayvan ve insan sağlığını tehdit eden, salgın riski yüksek, ihbarı mecburi, önemli bir zoonotik hastalıktır (Yaman 2006). OIE (International Office of Epizootics)'ye göre B listesinde yer almakta (Anonim 2015a) olan tüberküloz, evcil hayvanlar arasında en çok sığırlarda görülmektedir (Yardımcı 2006). Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı verilerine göre tüberkülozun sürü prevalansı %2,5 ve fert prevalansı ise %1,4'tür. Türkiye genelinde 2010 yılında 131 olan mihrak sayısı 2014 yılında 1,653'e yükselmiş, Malatya'da tespit edilen mihrak sayısı 1-10'dur (Şen Unutmaz 2014). Hastalığın önemli ve riskli olmasından dolayı işletmelerin bu konuda çok duyarlı ve hassas olmaları, kayıtlarını tam tutmaları gerekmektedir. Ancak, mevcut çalışmada sayıları az da olsa kaydını tutmayan işletmeler olduğu saptanmıştır.

Araştırmada, reçetelerin muhafazası ve kayıtlarının tutulmasına ait oran yüksek (%97,7), hasta hayvanların kaydının tutulmasına ait oran ise çok düşük (%34,3) olarak tespit edilmiştir (Tablo 1). Oysa bu konuda yayımlanmış yönetmelikte; yetiştiriciler, veteriner ilaçların veya hayvanlara

uygulanan tedavilerin uygulanış ve bitiş dönemlerine, gıda güvenliğini etkileyebilecek nitelikteki ortaya çıkan hastalıklara, hayvanlardan tanı amacıyla alınmış ve halk sağlığı için önemli olan analiz sonuçlarına ve hayvanlara uygulanan kontrollere ilişkin tüm konularda kayıt tutmakla yükümlüdür, denilmektedir (Anonim 2007). İşletmelerde, reçetelerin tam ve eksiksiz muhafaza edilmesi ve yazılmış olan reçetelerle hasta hayvan kayıtlarının titizlikle tutulması gerekmektedir.

Çalışmada, kanatlı, kemirgen ve haşere kontrolünün yapılması ve kayıtlarının tutulmasına ait oran % 98,3 olarak hesaplanmıştır (Tablo 1). İşletmelerde devamlı olarak fare, sıçan ve diğer kemirici hayvanlar, yabancı kuşlar ve sineklerle mücadele edilmelidir. Ayrıca rutin olarak ve ayrıca üretim devreleri arasında temizlik ve dezenfeksiyon yapılmalıdır (Anonim 2015c). Araştırmada elden edilen bulgu, işletmeden işletmeye, işletmedeki birimden birime veya hayvandan hayvana hastalıkların taşıyıcısı olan canlılarla mücadele ve bu mücadeleye ait kayıtların tutulmasına önem gösterildiğini ortaya koymaktadır.

#### **İşletmelerde aşılama ve tedavi uygulaması**

Şap hastalığı, OIE'nin A listesinde yer alan (Anonim 2015a), %80 oranında hayvan hareketleri ile bulaşan, bulaşma ve yayılması hızlı olan bir hastalıktır (Adıgüzel 2014). Yapılan çalışmada işletmelerde şap aşısının düzenli yapılmasına ait oran %97,7 olarak tespit edilmiştir (Tablo 2). Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından gerçekleştirilen hayvan hastalık ve zararlıları ile mücadele değerlendirmesinde, büyükbaş hayvanların şap hastalığına karşı yılda iki kez (ilkbahar ve sonbahar) aşılanacağı, Malatya İli için 2014 yılı sonbahar döneminde yapılması programlanan şap aşısının 120,333 doz, buna karşın yapılanın 87,510 doz ve başarının ise %73 olduğu bildirilmiştir (Adıgüzel 2014). Hastalığın kontrol edilmesi için bilinçli ve etkin bir mücadele gerekmektedir. Yetiştiricilerin şap hastalığının zararları konusunda bilinçli olması, işletmelere kayıt dışı ve kontrolsüz hayvan giriş çıkışı yapmamaları hastalıkla mücadelede büyük önem taşımaktadır.

Mevcut araştırmaya göre, işletmelerdeki hayvanlara yapılan tedavi girişimlerinin sadece veteriner hekimlerce yapılmasına ait oran %94,2 olarak tespit edilmiştir (Tablo 2). Elde edilen bulgu, işletmelerde az da olsa (%5,8) veteriner hekim olmayanların da tıbbi işlem yaptıklarını ortaya koymaktadır. Oysa hayvanlara tıbbi ve cerrahi müdahaleler sadece veteriner hekimler tarafından yapılabilir (Anonim 2004a) ve veteriner hekim bulunan şehir, kasaba ve köylerde veteriner hekim olmayanların her türlü hayvan hastalıklarını muayene ve tedavi etmeleri, hayvanlar üzerinde ameliyat yapmaları yasaktır (Anonim 1954). Var olabilecek herhangi bir zoonotik hastalığın bulaşması, çoğalması ve yayılması söz konusu olabileceğinden, yetkili olmayanların

hayvanlar üzerinde yapacakları tıbbi işlemler büyük sorunların doğmasına yol açabilecektir.

### **Barınak yapısı ve ekipmanların durumu**

Anket çalışmaları sürdürüldüğü esnada çalışmaya katılanlar tarafından barınaklar da kontrol edilmiş, barınak havasının ve aydınlatmasının uygun olup olmadığı gözlemlenmiştir. Ortama girildiğinde göz ve burunda yanma olmaması, aşırı koku bulunmaması, pencere ve havalandırma bacalarının uygun ve yeterli tespit edilmesi havalandırmanın; ortamın karanlık olmaması, ahırların gün ışığını alması ve lamba gibi aydınlatma araçlarının varlığı ise aydınlatmanın uygun olduğu biçiminde değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmada, barınaklarda uygun havalandırma ve aydınlatma yapılmasına ait oran %95,9 olarak tespit edilmiştir (Tablo 3). Karanlık ve havalandırma problemi olan barınaklarda hastalık oluşumu daha fazladır. Bu nedenle işletmelerde aydınlatma ve havalandırma mutlaka yeterli biçimde yapılmalıdır (Anonim 2013a, Köseman ve Şeker 2016). Ancak çalışmada ele alınan işletmelerin %4,1'inde bu kurala uyulmaması dikkat çekici ve düzeltilmesi gereken bir durumdur. Şanlıurfa'daki süt sığırcılığı işletmelerinde, ahırlarda yeterli havalandırma yapılmasına ait oran %95 olarak belirlenmiştir (Yener ve ark. 2013). Bu değer, Malatya'da tespit edilen oran ile benzer bulunmuştur.

Mevcut çalışmada, barınak ve çevresinin temizliği %95,3, barınak duvar ve zemininin temizlenebilirliği %91,3 olarak hesaplanmıştır (Tablo 3). Temizlik ve hijyen, biyogüvenliğin ana unsurudur. Temiz ve hijyenik olmayan ortamlar, hastalık yapıcı mikroorganizmaların üremesine ve yayılmasına vasat oluşturmaktadır. Hayvan barınaklarında temizlik ve hijyenin yeterli ve etkin biçimde yapılabilmesi için duvar ve zeminlerin buna elverişli olması ve uygun malzemedan yapılması gereklidir. Malatya'daki hayvancılık işletmelerinin yapısal durumunun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, ahırların %35 taş ve %51,8 briketten inşa edildiği, ahır zeminini yapımında %97,4 beton kullanıldığı belirlenmiştir (Köseman ve Şeker 2016). Taş, briket ve beton temizlenmeye ve dezenfeksiyona ahşap, kerpiç ve toprak malzemedan daha elverişlidir. Bu nedenle, ele alınan işletmelerde temizlik ve temizleme koşullarına yüksek oranda önem verildiği düşünülmektedir. Diyarbakır'da yapılan çalışmada işletmelerin %98'inde günlük olarak ahır temizliği yaptığı bildirilmiştir (Denli ve ark. 2013). Malatya'daki işletmelerde temizlikle ilgili elde edilen oran Diyarbakır'dan düşüktür.

Yapılan mevcut çalışmada, işletmelerde uygun ve yeterli gübre çukurunun varlığı %21,5 olarak belirlenmiştir (Tablo 3). Bu oran oldukça düşüktür ve işletmelerdeki biyogüvenlik düzeyini olumsuz yönde etkileyebilecek bir durum olarak değerlendirilmiştir. Hayvancılık işletmelerinden kaynaklanan sıvı atıkların doğrudan yüzey sularına deşarjı, yüzey ve yeraltı sularında nitrat ve fosfor konsantrasyonlarının

artmasına neden olduğu, uygun olmayan atık yönetimi uygulamalarının yüzey ve yer altı su kaynaklarına zarar verdiği bildirilmiştir (Polat ve Olgun 2009). Önlem olarak hayvan gübrelere sızan sıvılar için depolama tanklarının yapılması istenmekte (Anonim 2004b), yarı sıvı şekilde elde edilen gübre tamamen betonarme havuzlarda, katı atıkların ise kapalı ve betonarme rampalı havuzlarda depolanması önerilmektedir (Abler ve Shortle 1992). Diyarbakır'da yapılan çalışmada, işletmelerin büyük bir bölümünün hayvan gübresini işletmenin içinde veya çok yakında bulunan bir alanda biriktirdikleri bildirilmiştir (Denli ve ark. 2013). Mevcut çalışmadaki bulgular ışığında, Malatya'daki işletmelerde de organik atıklarla ilgili yönetimin düşük seviyede olduğu, bu konuya önem verilmediği anlaşılmaktadır. İlgili Bakanlıkların (Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, Sağlık Bakanlığı) bu konuya daha hassas yaklaşımları, gerek iç mevzuatın yaptırımlarını, gerekse Avrupa Birliği müktesebatına uyum kriterlerini etkin biçimde uygulamaları gerekmektedir.

İşletmelerde optimum bir biyogüvenlik düzeyi sağlayabilmek için, değişik hayvan türlerinin bir arada bulundurulmaması gereklidir (Anonim 2013a). Buna rağmen Malatya'da yapılan çalışmada işletmelerin %9,9'unda farklı türden hayvan bulundurulduğu tespit edilmiştir (Tablo 3). Şanlıurfa'da hayvancılık işletmelerinde farklı türden hayvan bulundurulmasına ait oran %84,8 olarak bildirilmiştir (Yener ve ark. 2013). Hayvancılık işletmelerinde farklı hayvan türlerini bir arada bulundurma uygulaması Şanlıurfa işletmelerinde çok yüksek, Malatya'da ise düşük seviyededir. Ancak, biyogüvenliğe aykırı olan bu uygulamanın sakıncaları anlatılarak, yetiştiricilerin bundan vazgeçmeleri sağlanmalıdır. Sığır yetiştiriciliğinde ahırlar kapalı (bağlamalı, serbest dolaşım), yarı açık ve açık olmak üç şekilde yapılmaktadır.

Uygulanan barındırma yöntemlerinde hayvanlara refah ve sağlık koşullarına uygun rahat, temiz ve kuru bir bireysel dinlenme alan sağlanması önemlidir (Bewley 2010). Mevcut çalışmada ahırlardaki hayvan duraklarının uygun ölçü ve niteliklere sahip olanlarının oranı sadece %9,9 olarak tespit edilmiştir (Tablo 3). Bu oranın çok düşük olması, işletmelerin bu bakımdan ciddi bir eksiklik ve olumsuzluk içinde olduklarını göstermektedir. Oysa, durak uzunluğunun uygun olmaması her şeyden önce ahırda temizlik ve hijyen sorunlarına neden olmakta (Mihina ve ark. 1997), hatalı durak yapısı ise perakut koliform mastitislerin ortaya çıkmasına yol açmaktadır (Radostits ve Blood 1985). Durakların tasarlanmasında sığırın ırkı, canlı ağırlığı, yatış pozisyonları ile yatış-kalkış davranışları dikkate alınmalıdır (Ayyılmaz ve ark. 2011). Durak boyutları hayvanların duraklara kolayca girip çıkabilmesine ve yatıp kalkabilmesine uygun ve elverişli olmalıdır. Beden ağırlığı karma biçimde yapılan yetiştirmelerde



durak boyutları sürüdeki en ağır hayvanların %25'lik kısmına göre ayarlanmalıdır (Bickert 2000). Yapılan bir çalışmada, 410-500 kg ağırlığındaki hayvanlar için 229-244 cm durak uzunluğuna ve 104-109 cm durak genişliğine ihtiyaç olduğu, iyi tasarlanmış durakların daha temiz kaldığı ve hayvanlardaki yaralanmaları azalttığı bildirilmiştir (Graves ve ark. 2009). Malatya'daki işletmelerin ahır içi koşullarının özellikle durak ölçü ve nitelikleri bakımından ciddi düzeyde iyileştirilmesine ihtiyaç olduğu anlaşılmaktadır. Bu olumsuzlukların giderilmesi için yetiştiricilerin öncelikle eğitilmeleri ve bilinçlenmeleri sağlanmalıdır. Sonrasında Bakanlığın farklı birimleri vasıtasıyla verilen maddi desteklerden yararlanarak, işletmelerdeki ahır koşullarının iyileştirilmesi ve düzeltilmesi için teşvik edilmesi gerekmektedir. Ayrıca, yetiştiricilik faaliyetlerinin süreklilik arz etmesi nedeniyle, ilgili kurum veya kişiler tarafından işletmelerin zaman zaman ziyaret edilerek takip ve kontrollerinin yapılmasının da yararlı olacağı unutulmamalıdır.

### **İşletmelerdeki suyun biyogüvenlik açısından değerlendirilmesi**

Su, hayvanların yaşamalarını ve sağlıklı olmalarını temin etmek için gerekli olduğu kadar, hayvancılık işletmelerinde temizliğin yapılması için de son derece önemlidir. Yeterince su olmadan temizlik yapılması mümkün olmayacağından bu işletmelerde biyogüvenlikten bahsedilemez. Yapılan çalışmada, işletmelerde yeterli ve uygun su kaynağının varlığına ait oran %97,1 ve suyun analiz yaptırılmasına ait oran ise %6,4 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4). Hayvancılık yapmak üzere ruhsatlandırılan bir işletmede kullanılan içme ve kullanma suyu şebeke suyundan değil de kuyu, artezyen, kaynak suyu gibi bir su kaynağından getiriliyorsa su analiz raporu alınmalı ve bu analizler yılda bir kez tekrarlanmalıdır (Anonim 2014c).

Sığırlar istediği her an su içebilmelidir. Verilecek su sınırlandırılmamalıdır. Hayvanların tükettikleri su miktarı, canlı ağırlığa, çevre sıcaklığına ve rasyonun içerdiği su miktarına göre değişmektedir (Arpacık 1997). Malatya'da sığırcılık işletmelerindeki hayvanlara serbest olarak %43,6 ve günde iki defa %50,3 su verilmektedir (Köseman ve Şeker 2016). Sığırlara verilen su temiz olmalıdır (Arpacık 1997). Uygun olmayan suların hayvanlara içirilmesi büyük problemlere neden olmaktadır. Artezyen kuyularından sağlanan kontamine sular (Coliform bakteri ve E. coli bulunduran), akut gastroenteritlere yol açmaktadır (Won ve ark. 2013). İşletmelerde büyük oranda mastitis ve süt kaybına yol açan Klebsiella spp. fekal kontaminasyon ve kontamine suların içilmesiyle oro-fekal olarak bulaşmaktadır (Zadoks ve ark. 2011).

Yapılan bir çalışmada, hayvanlara içirilen ve temizlikte kullanılan kirli ve bulaşık suların analizinde %53,7 Cryptosporidium ve %64,7 Fasciola hepatica içerdikleri tespit edilmiştir. Hayvancılık

işletmelerinde, herhangi bir işlem gerçekleştirilmeden drene edilen kirli sular, yüksek oranda içerdikleri patojen mikroorganizma, antibiyotik ve besin atıklarını normal sulara bulaştırmaktadır. Kirli suların meme ve sağım aletlerinin temizliğinde kullanılması, sağılan sütlerin patojen mikroorganizmalar tarafından kontamine edilmesine yol açmaktadır. (Rodríguez ve ark. 2012).

Yaşamsal öneme sahip suların analizi son derece önemlidir. Analiz edilmeden hayvanlara içirilen uygun olmayan sular, patojenik olmayan hastalıklara da neden olmaktadır. Sulardaki aşırı flora bağlı olarak (>1,5 ppm F) hayvanlarda dental florosisin yanı sıra periost ekzostoza, intermitten lamellosa ve tendolarda sertleşme meydana gelmekte, buzağular sulardaki aşırı floradan en fazla ve en hızlı etkilenmektedir (Choubisa 2014). İçme suyundaki 10 g/lit tuz artışı hayvan sağlığını ölçülebilir biçimde zarar vermektedir (Visscher ve ark. 2013).

Mevcut çalışmada işletmelerde yüksek oranda su kaynağının olduğu tespit edilmişse de suyu analiz ettirenlerin çok düşük oranda olması, işletmelerde büyük sorunların yaşanabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, yeterli suya sahip olmayan işletmelerin (%2,9) faaliyet yapmasına müsaade edilmesi de dikkat çekicidir.

### **SONUÇ**

Malatya'daki sığırcılık işletmelerinde hayvan sağlığı ve ahır hijyeni perspektifinde biyogüvenlik uygulamalarının değerlendirildiği bu çalışmada, işletmelerin;

- Hayvanların Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı veri tabanına kaydedilmesi,
- Tüberküloz kontrol ve testleri için kayıtlarının tutulması,
- Reçetelerin muhafazası ve kayıtlarının tutulması,
- Kanatlı, kemirgen ve haşere kontrolünün yapılması ve kayıtlarının tutulması,
- Barınaklarda uygun havalandırma ve aydınlatma yapılması,
- Barınak ve çevresinin temizliği,
- Barınak duvar ve zemininin temizlenebilirliği,
- Yeterli ve uygun su kaynağının varlığı, konularında genel olarak kabul edilebilir düzeyde iyi/yeterli oldukları tespit edilmiştir. Buna karşın işletmelerde;
- Hayvan sevklerine ait belgelerin muhafazası ve hayvan hareketlerinin kayıtlarının tutulması,
- Hasta hayvanların kaydının tutulması,
- Veteriner hekim dışındaki kişilerce tedavi yapılması,
- Uygun ve yeterli foseptik/gübre çukurunun varlığı,
- Farklı türden hayvanların bir arada bulundurulması,
- Bağlama/durak/barındırma bölümlerinin hayvanların ihtiyaçlarına uygunluğu,
- İşletmede kullanılan suyun analizlerinin yaptırılması, konularında ise belirgin düzeyde eksiklikler ve olumsuzluklar belirlenmiştir.

Sonuç olarak hayvan sağlığı ve barınak hijyenine dayalı biyogüvenlik uygulamaları bakımından araştırma yürütülen işletmelerde daha iyi bir düzeye erişilmesi için, kayıt tutma ve saklanması önem verilmeli, gübre yönetimi geliştirilmeli, barınak içi ekipmanlar düzenlenmeli, farklı türlerin bir arada bulundurulması önlenmeli ve su analizlerinin yaptırılması sağlanmalıdır.

## TEŞEKKÜR

Malatya Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü ile Akçadağ, Battalgazi ve Yeşilyurt İlçe Müdürlüklerinin çalışmamıza teknik ve idari destek veren sayın yetkililerine ve veteriner hekimlerine, yoğun emekleri ile her aşamada yanımızda olan İnönü Üniversitesi personelleri çok değerli İlbey ŞAHİN ve Mustafa Can ELMAS'a şükranlarımızı sunarız.

## KAYNAKLAR

- Abler DG, Shortle JS.** Potential for environmental and agricultural policy linkages and reforms in the European Community. *American Journal of Agricultural Economics*. 1992; 74(3): 775-781.
- Adıgüzel A.** Şap Hastalığı Mücadele Stratejisi. Hayvan Hastalık ve Zararlıları İle Mücadele Yıl Sonu Değerlendirme Toplantısı. 2014. <http://www.tarim.gov.tr/GKGM/Duyuru/76/2015-yili-hayvan-hastalik-ve-zararlıları-ile-mucadele>. Erişim Tarihi:19.11.1015.
- Akartuna T.** Süt Hayvancılığında Hijyenin Önemi ve Kaliteye Etkileri. 2008. Uluslararası Süt Sığırcılığı ve Süt Ürünleri Çalıştayı ve Sergisi, 28-29.04.2008, İzmir.
- Aksoy FT.** Sürü sağlığı ve biyogüvenlik. 2011. [ciftlikdergisi.com.tr/suru...ve-biyogüvenlik.html](http://ciftlikdergisi.com.tr/suru...ve-biyogüvenlik.html). Erişim Tarihi:28.05.2015.
- Anonim.** Veteriner Hekimliği Mesleğinin İcrasına, Türk Veteriner Hekimleri Birliği ile Odalarının Teşekkül Tarzına ve Göreceği İşlere Dair Kanun. 1954.Kanun Numarası: 6343, Kabul Tarihi: 9.3.1954.
- Anonim.** Hayvanları Koruma Kanunu. 2004a.Kanun Numarası: 5199, Kabul Tarihi: 24.6.2004.
- Anonim.** Tarımsal Kaynaklı Nitrat Kirliliğine Karşı Suların Korunması Yönetmeliği. 2004b. Resmi Gazete Tarihi: 18.02.2004, Resmi Gazete Sayısı: 25377.
- Anonim.** Gıda Güvenliği ve Kalitesinin Denetimi ve Kontrolüne Dair Yönetmelik. 2007. Resmi Gazete Tarihi: 9.12.2007 Resmi Gazete Sayısı: 26725.
- Anonim.** Sığır Cinsi Hayvanların Tanımlanması, Tescili ve İzlenmesi Yönetmeliği. 2011. Resmi Gazete Tarihi: 02.12.2011 Resmi Gazete Sayısı: 28130.
- Anonim.** Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Hayvan Hastalıkları ile Mücadele ve Hayvan Hareketleri Kontrolü Genelgesi. 2013a. Genelge No: 2013/04.
- Anonim.** Çalışma Raporu 2013. Malatya İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü. 2013b.
- Anonim.** Hayvancılık İstatistikleri. 2014a.<http://www.tuik.gov.tr/> Erişim Tarihi: 24.11.2014.
- Anonim.** Malatya İli Tarımsal Yatırım Rehberi Eylül 2014. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Strateji Geliştirme Başkanlığı. 2014b. Erişim Tarihi: 24.11.2014.
- Anonim.** Tarımsal Kaynaklı Nitrat Kirliliğine Karşı Suların Korunması Yönetmeliği. 2014c. Resmi Gazete Tarihi: 18.02.2004, Resmi Gazete Sayısı: 25377
- Anonim.** Office International des Epizooties. 2015a. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2015. Erişim Tarihi: 15.11.2015.
- Anonim.** SPSS 22.0. statistical package in social sciences for windows. 2015b. Chicago, USA.
- Anonim.** Biyogüvenlik neden önemlidir. 2015c. [agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/](http://agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/) Erişim Tarihi: 28.05.2015.
- Anonim.** TKDK. Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu Tarafından Desteklenecek Kırmızı Et Üreten Tarımsal İşletmelerde AB Standartları Denetleme Formu (Ek-6). 2015d.
- Arpacık R.** Entansif Sığır Besiciliği. Şahin Matbaası. s.76,78. 2007. Ankara.
- Ayyılmaz T, Uzmay C, Kaya İ.** Süt sığırı ahırlarında inek konforu esaslı serbest durak tasarımı. *Hayvansal Üretim*. 2011; 52(2): 46-57.
- Bebek M.** Hayvan Hareketleri Kimliklendirme ve Kayıt. Hayvan Hastalık ve Zararlıları ile Mücadele Yıl Sonu Değerlendirme Toplantısı. 2014. <http://www.tarim.gov.tr/GKGM/Duyuru/76/2015-yili-hayvan-hastalik-ve-zararlıları-ile-mucadele>. Erişim Tarihi:19.11.1015.
- Bewley J.** Opportunities for improved cow comfort through freestall barn renovations. 2010. <http://www.ca.uky.edu/agc/pubs/asc/asc178/asc178.pdf>.Erişim Tarihi:10.12.2015.
- Bickert GW.** Milking herd facilities. Dairy Free Stall Housing and Equipment. 7th ed. Iowa State University. 2000. Ames. P. 27-42.
- Choubisa SL.** Bovine calves as ideal bio-indicators for fluoridated drinking water and endemic osteo-dental fluorosis. *Environ Monit Assess*. 2014; 186(7):4493-8. doi: 10.1007/s10661-014-3713-x.

- Çağatay M.** Veterinerlik Hizmetleri İletişim Stratejisi. Hayvan Hastalık ve Zararlıları ile Mücadele Yıl Sonu Değerlendirme Toplantısı.2014.<http://www.tarim.gov.tr/GKGM/Duyuru/76/2015-yili-hayvan-hastalik-ve-zararlıları-ile-mucadele>. Erişim Tarihi:19.11.2015.
- Denli M, Sessiz A, Tutkun M.** Diyarbakır ili sığırcılık işletmelerinin genel yapısal durumu ve bakım-beslenme teknikleri analizi projesi. 2013. Dicle Üniversitesi, Diyarbakır.
- Erganiş O.** Sürü sağlığında biyogüvenlik prensipleri ve güvenli et ve süt üretimi için üretim yönetimi. 2015. <http://atavet.com.tr/bilgibankasi.php?makale=17> Erişim Tarihi:03.12.2015.
- Graves RE, McFarland DF, Tyson JT.** Designing and building dairy cattle freestalls. 2009. <http://www.abe.psu.edu/extension/factsheet/s/g/G76.pdf>. Erişim Tarihi:10.12.2015.
- Köseman A.** AB müzakere süreci ve hayvan refahı. *Türktarım*. 2008; 181; 62-64. ISSN: 1303-2364.
- Köseman A, Şeker İ.** Malatya ilinde sığırcılık işletmelerinin mevcut durumu: I. yapısal özellikler. *FÜ Sağ. Bil. Enst. Derg.* 2016; 30(1) 5-12.
- Mihina S, Brestensky V, Szabova G, Botto L, Bottcher RW, Hoff S.** Behaviour and cleanliness of dairy cows in differently designed cubicles. *Livestock Environment*. 1997; 5 (1):258-265.
- Polat HE, Olgun M.** Hayvancılık işletmelerindeki atık yönetimi uygulamalarının su kirliliği üzerine etkileri. *GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi*. 2009; 26(2): 71-80.
- Radostits OM, Blood DC.** *Herd Health*, 1st ed WB Saunders.1985. Philadelphia, USA.
- Rodríguez DC, Pino N, Peñuela G.** Microbiological quality indicators in waters of dairy farms: detection of pathogens by PCR in real time. *Sci Total Environ*. 2012; 15;427-428:314-8. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.03.052. Epub 2012 Apr 28.
- Sungur H, Çöven F.** Kanatlı işletmelerinde biyogüvenlik ve hastalıklardan korunma. 2009.yumbir.org>UserFiles/File/Biyogüvenlik\_Kitap.pdf.ErişimTarihi:28.05.2015.
- Şen Unutmaz E.** Sığır Tüberkülozu. Hayvan Hastalık ve Zararlıları ile Mücadele Yıl Sonu Değerlendirme Toplantısı. 2014. <http://www.tarim.gov.tr/GKGM/Duyuru/76/2015-yili-hayvan-hastalik-ve-zararlıları-ilemucadele>. ErişimTarihi:19.11.2015.
- Visscher CF, Witzmann S, Beyersbach M, Kamphues J.** Watering cattle (young bulls) with brackish water a hazard due to its salt content? *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 2013; 41(6):363-70.
- Won G, Gill A, Lejeune JT.** Microbial quality and bacteria pathogens in private wells used for drinking water in northeastern Ohio. *J Water Health*. 2013; 11(3):555-62. doi: 10.2166/wh.2013.247.
- Yaman B.** Zoonotik hastalıkların veteriner hekimlik boyutu. I. Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu Kitabı. 2006; 7-12. Medisan. Ankara.
- Yardımcı H.** Mycobacterium İnfeksiyonları. "Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)" Editörler: Aydın N, Aracıoğlu J. 2006; 87-107. İlke Emek Matbaacılık ve Yayıncılık. ISBN.975-6268-06-9.
- Yazıcıoğlu Y, Erdoğan S.** Spss uygulamalı bilimsel araştırma yöntemleri. 2004. Detay Yayıncılık. Ankara.
- Yener H, Atalar B, Mundan D.** Şanlıurfa ilindeki sığırcılık işletmelerinin biyogüvenlik ve hayvan refahı açısından değerlendirilmesi. *Harran Üniv Vet Fak Derg.* 2013; 2(2) 87-93.
- Zadoks RN, Griffiths HM, Munoz MA, Ahlstrom C, Bennett GJ, Thomas E, Schukken YH.** Sources of Klebsiella and Raoultella species on dairy farms: be careful where you walk. *J Dairy Sci*. 2011; 94(2):1045-51. doi: 10.3168/jds.2010-3603.

## Kuruluşundan Günümüze Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi#

**Emine TÜRKMEÑOĞLU**

*Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı, Zeve Kampüsü / VAN*

Corresponding author e-mail: e\_turkmenoglu@hotmail.com

# Bu çalışma IV. Ulusal Veteriner Hekimliği Tarihi ve Mesleki Etik Sempozyumunda (21-23 Mayıs 2014, Samsun) sunulmuştur.

### ÖZ

Veteriner hekimliği mesleği 18. yüzyıla kadar ampirik bir biçimde uygulanmış olup, dünya üzerinde bilimsel anlamda veteriner hekimliği Fransa'nın Lyon şehrinde 1762'de kurulan veteriner okulunun faaliyete geçmesiyle başlamıştır. Türkiye'de ise modern veteriner hekimliği, ilk veteriner okulunun 1842'de İstanbul'da askeri olarak eğitim-öğretime açılmasıyla başlamıştır. Bu çalışmanın amacı Yüzüncü Yıl Üniversitesi (YYÜ) Veteriner Fakültesi'nin kuruluşundan günümüze tarihsel gelişimini ortaya koymaktır. Konu ile ilgili verileri elde etmek amacıyla çeşitli arşivler taranmıştır. Elde edilen veriler klasik tarih metodolojisi içerisinde değerlendirilmiştir. Türkiye'nin altıncı veteriner fakültesi olan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Van'da 1982 yılında kurulmuştur. 1992 yılına kadar çeşitli binalarda eğitim veren fakülte bu yıldan itibaren kampüste kendine ait binalarda faaliyet göstermektedir. Fakültenin klinik bölümleri Hayvan Hastanesinde hizmet vermektedir. Eğitime 37 öğrenci ile başlayan fakülte 2013 yılı sonu itibarı ile 888 öğrenci ile eğitime devam etmektedir. Çalışmanın sonucunda Yüzüncü Yıl Üniversitesi veteriner fakültesi'nin veteriner hekimlerin yetiştirilmesi, bilimsel araştırmalar ve hayvan hastalıklarının tedavisi konularında yürütmüş olduğu faaliyetleri ile ülke hayvancılığına katkı sağladığı ifade edilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Veteriner Hekimliği Tarihi, Veteriner Fakültesi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi

## The Faculty of Veterinary Medicine, YüzüncüYıl University Since The Establishment Date

### ABSTRACT

The occupation of veterinary was empirically applied up to eighteenth century. In the world, in the scientific meaning, the proficiency of veterinary started with the opening of the veterinarian school in Lyon, France in 1762. In Turkey, the occupation of modern veterinary began with the opening of first veterinarian school for education in military form in İstanbul in 1842. The purpose of this study is to reveal the historical development of the Faculty of Veterinary Medicine, YüzüncüYıl University (YYU) from the establishment day up to now. Several archives were searched in order to obtain the data regarding the topic. The data obtained was evaluated in classical history methodology. The Faculty of Veterinarian Medicine, YYU is the sixth veterinarian faculty of Turkey was opened in Van in 1982. The Faculty gives services in several buildings until 1992 has been giving education in its own buildings within the campus since this date. The clinic departments of the faculty are in animal hospital within the campus. The faculty starts training with 37 students continues education with 888 students by the end of 2013. As the result of the study, it was determined that The Faculty of Veterinary Medicine, YüzüncüYıl University made contributions to the animal husbandry through the activities carried out in the training of veterinarians, scientific research studies and treatment of animal diseases.

**Key Words:** History of Veterinary Medicine, The Faculty of Veterinary, YüzüncüYıl University

To cite this article: **Türkmenoğlu E.** Kuruluşundan Günümüze Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi. *Kocatepe Vet J. 2016; 9(2): 70-73.*

## GİRİŞ

Veteriner hekimliği mesleği 18. yüzyıla kadar ampirik bir biçimde uygulanı gelmiş olup, dünya üzerinde bilimsel anlamda veteriner hekimliği Fransa'nın Lyon şehrinde 1762'de kurulan veteriner okulunun faaliyete geçmesiyle başlamıştır. Türkiye'de ise modern veteriner hekimliği, ilk veteriner okulunun 1842 yılında İstanbul'da askeri olarak eğitim-öğretime açılmasıyla başlamıştır. Daha sonra 1889'da ilk sivil veteriner okulu açılmıştır. Bu iki veteriner okulu 1921'de birleştirilmiş ve 1933'de Yüksek Ziraat Enstitüsü bünyesine Ankara'ya nakledilmiştir. Veteriner Fakültesi, 1948'de Ankara Üniversitesinin bünyesine katılmıştır (Erk 1966). Yıllar içerisinde sırasıyla Elazığ'da 1970'de (Anonim 2013a), İstanbul'da 1972'de (Anonim 2013b), Bursa'da 1978'de (Anonim 2013c) ve Konya ile Van'da ise 1982'de (Anonim 1982a) veteriner fakülteleri kurulmuştur.

Yüzüncü Yıl Üniversitesi (YYÜ) 41 sayılı Kanun Hükmünde Kararname ile 1982 yılında bünyesinde veteriner fakültesi de olmak üzere kurulmuş (Anonim 1982a), rektörlüğüne ise Hacettepe Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Hakkı ATUN atanmıştır (Anonim 1982b).

Bu çalışma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nin kuruluşundan günümüze tarihsel gelişimini ortaya koymak amacıyla yapılmıştır.

## MATERYAL ve METOT

Çalışmanın materyallerini, YYÜ Rektörlüğü Yazı İşleri Arşivi, YYÜ Rektörlüğü Öğrenci İşleri Daire Başkanlığı Arşivi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Arşivi ve YYÜ Veteriner Fakültesinin kütüphane ve arşivinden sağlanan doküman oluşturmuştur. Ayrıca konuyla ilgili kitap, dergi, resmi gazete ve makalelerden de yararlanılmış; elde edilen veriler klasik tarih metodolojisi çerçevesinde değerlendirilmiştir.

### Fakültenin Kuruluşu

YYÜ Veteriner Fakültesi Türkiye'nin altıncı veteriner fakültesi olarak, 20 Temmuz 1982'de kurulmuş (Anonim 1982a). Kurucu Dekan olarak atanan Fırat Üniversitesi öğretim üyesi profesör adayı Asım KABUKÇU, Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesinde profesörlüğe yükseltildikten sonra 11 Şubat 1983'de görevine başlamıştır (Anonim 1982-2013a). Fakülte 2547 sayılı Kanunun (Anonim 1981) 40/b ve 41/b maddeleri uyarınca görevlendirilen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğretim üyeleri Prof. Dr. Atilla Tanyolaç, Prof. Dr. Ergün Özalp, Doç. Dr. Şerif Kaymaz ve Yrd. Doç. Dr. Ümit H. Milli 22 Aralık 1982'de görevlerine başlamış ve fakültenin tüm kurullarında yer almışlardır (Anonim 1982-2013b).

YYÜ Veteriner Fakültesi, kendisine ait bir binası olmadığı için 1983-1984 Güz Yarıyılında Van'ın merkezindeki Melihsah Kız Öğrenci Yurdu'nda

faaliyetlerini yürütmüştür. Bahar Yarıyılında ise fakülte, Van'ın Edremit ilçesindeki Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı'nın hastane olarak inşa ettirdiği binaya taşınmıştır (Çamaş 1991). Veteriner Fakültesi, 16 Ekim 1986'ya kadar burada faaliyet gösterdikten sonra Bardakçı Kampusundaki prefabrik binalara nakledilmiştir (Anonim 1982-2013b) 1988'den itibaren de eğitim-öğretim faaliyetlerini (Çamaş 1991) Fen-Edebiyat Fakültesinde tahsis edilen dört dersane ile üç laboratuvar da sürdürmüştür. Fakülte, 1991'de temeli atılan bugünkü binasına ise 1992'den itibaren taşınmaya başlanmıştır (Anonim 1982-2013b).

YYÜ Veteriner Fakültesinin klinik uygulamaları için 1992'ye kadar İl Hayvan Sağlığı Şube Müdürlüğü Hayvan Hastanesi bu yıldan itibaren ise Van'ın merkezinde yapımı tamamlanan klinikler binası kullanılmıştır (Anonim 1982-2013b). Bu bina 1997'de Tıp Fakültesine devredilmiş veteriner fakültesi için ise kampüste hayvan hastanesi inşa edilmiştir. Günümüzde Zeve Kampüsü içerisinde bulunan veteriner fakültesi, iki ana bina, hayvan hastanesi, koyunculuk ünitesi ve iki kümeden oluşan dağınık bir yerleşim yapısına sahiptir (Anonim 1982-2013b).

### Akademik Yapılanma

YYÜ Veteriner Fakültesinde 1982-1983 Eğitim-Öğretim Yılında bölümler ve anabilim dalları (Anonim 1982-2013a) Veteriner Temel Hekimliği Bilimleri (Anatomi, Biyokimya-Fizyoloji, Histoloji-Embriyoloji), Hastalıklar ve Klinik Bilimleri (Besin Hijyeni ve Teknolojisi, Mikrobiyoloji, Parazitoloji, Patoloji, Cerrahi, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları, İç Hastalıklar ve Farmakoloji) ve Zootečni ve Hayvan Besleme (Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları, Zootečni) olarak belirlenmiştir. Üç olan bölüm sayısı 2009'da beşe çıkarılmıştır. Fakülte 2013-2014 Güz Yarıyılı itibarıyla 20 Anabilim Dalı bulunmaktadır (Anonim 1982-2013b).

Veteriner Fakültesinin dekanlığını Prof. Dr. Asım Kabukçu'dan (1982-1985) sonra sırasıyla Prof. Dr. Ataman Güre (1985-1987), Prof. Dr. Hayati Çamaş (1987-1992), Prof. Dr. Osman Yüreklitürk (1993-1994), Prof. Dr. Rifat Cantoray (1994-1997), Prof. Dr. Duran Bolat (1997-2000), Prof. Dr. Zahit T. Ağaoğlu (2000-2004), Prof. Dr. Nihat Mert (2004-2007) ve Prof. Dr. M. Serdar Değer (2007-2010) yürütmüştür. Fakültenin dekanlık görevini halen 2011'de atanan, (Anonim 1982-2013b) aynı zamanda fakültenin ilk mezunlarından birisi de olan Prof. Dr. Zafer Soygüder sürdürmektedir (Anonim 1982-2013a).

Kuruluşundan itibaren öğretim üyesi açığı bulunan fakültenin, bu ihtiyacı genellikle Ankara Üniversitesi, İstanbul Üniversitesi ve Selçuk Üniversitesinin veteriner fakültelerinden karşılanmıştır. Öğretim üyesi açığı 90'lı yıllardan itibaren giderek azalmıştır. YYÜ Veteriner Fakültesinde 2013-2014 Güz Yarıyılı itibarıyla 29 profesör, 15 doçent, 23 yardımcı doçent,

24 araştırma görevlisi bulunmaktadır(Anon 1982-2013b).

### Lisans Eğitim-Öğretimi

YYÜ Veteriner Fakültesinde eğitim-öğretim ilk yıllarda Yüzüncü Yıl Üniversitesi Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre yürütülmüştür(Anonim 1983). Fakültenin ilk eğitim- öğretim ve sınav yönetmeliği ise 1989'da yürürlüğe girmiştir(Anon1989) . Günümüzde 19 Eylül 2007'de yürürlüğe giren Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Ön lisans ve Lisans Öğretim Yönetmeliği (Anon2007) uygulanmaktadır.

YYÜ Rektörlüğünce Yüksek Öğretim Kurumu Başkanlığına 1982-1983 Eğitim-Öğretim Yılında Veteriner Fakültesine ön kayıtlı 35 öğrenci alınması teklif edilmiş ancak üniversitenin imkânlarının yeterli olmadığı gerekçesiyle bu öneri uygun görülmemiştir Fakülteye 1983-1984 Eğitim-Öğretim Yılında 37 öğrenci kayıt yaptırmıştır. Aynı yıl F. K. B. dersleri ile ilgili öğretim elemanı, derslik ve laboratuvar gereksinimi Fen-Edebiyat Fakültesinden sağlanmıştır (Anonim 1982-2013a).

YYÜ Veteriner Fakültesinde ikinci öğretime 1992-1993 Eğitim-Öğretim Yılında geçilmiştir (Anonim 1982-2013a). İkinci öğretim 2013'e kadar devam etmiş, Yüksek Öğretim Kurumu Başkanlığının 12 Eylül 2013 tarihli kararıyla bütün ikinci öğretim öğrencileri normal öğretime aktarılmış ve 2014-2015 Eğitim-Öğretim Yılından itibaren ikinci öğretime öğrenci alınmaması kararlaştırılmıştır (Anonim 1982-2013b).

**Tablo 1:** YYÜ Veteriner Fakültesi Mezunlarının Yıllara, Öğretime ve Cinsiyete Göre Dağılımı (1997-2013)

**Table 1:** The Distribution the Graduates of the Faculty of Veterinarian Medicine, YYU of the Year, Teaching and Gender.

Yıllar	Normal Öğretim		İkinci Öğretim	
	Kız	Erkek	Kız	Erkek
1997	8	50	-	6
1998	7	48	-	6
1999	13	39	3	10
2000	4	45	2	17
2001	10	32	7	28
2002	6	33	6	36
2003	16	52	4	48
2004	1	23	6	21
2005	3	27	9	31
2006	7	41	3	49
2007	1	55	4	53
2008	7	56	4	44
2009	2	64	5	66
2010	3	62	3	37
2011	6	27	2	33
2012	12	115	12	80
2013	10	63	10	43

YYÜ Veteriner Fakültesinden 1988-1996 yıllarında 38'i kız 218'i erkek toplam 256 öğrenci mezun olmuştur. Fakülteden 1997- 2013 yıllarında ise normal öğretimde 116'sı kız, 832'si erkek, ikinci öğretimde 80'i kız 608'i erkek olmak üzere toplamda 1636 öğrenci mezun olduğu belirlenmiştir (Tablo 1). Fakültede 2013-2014 Güz Yarıyılı itibarıyla toplamda 888 öğrenci eğitime devam etmektedir(Anonim 1982-2013a).

### Lisansüstü Eğitim-Öğretimi

YYÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsüne kuruluncaya kadar YYÜ'nün veteriner lisansüstü öğrencileri öğrenimlerini, YYÜ Fen Bilimleri Enstitüsünde devam ettirmişlerdir. Sağlık Bilimleri Enstitüsü,03 Temmuz 1992 tarihinde 3837 sayılı Kanun ile kurulmuştur (Anonim 1992). Veteriner hekimliğine yönelik ilk lisansüstü programları 24 Aralık 1992 tarihinde Anatomi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi, Biyokimya, Cerrahi, Doğum ve Jinekoloji, Farmakoloji, Fizyoloji, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları, Histoloji, İç Hastalıklar, Mikrobiyoloji, Parazitoloji, Zootekni Anabilim dallarında açılmıştır. Enstitünün veteriner programlarından 1995-2013 yıllarında 145 bilim doktoru, 216 uzman mezun olmuştur. Veteriner programlarında 2013-2014 Güz Yarıyılı itibarıyla39 doktora, 179 yüksek lisans öğrencinin kayıtlı olduğu belirlenmiştir (Anonim 1992-2013) .

### SONUÇ

YYÜ Veteriner fakültesinin 31 yıllık tarihsel gelişiminde başlangıçta beş olan akademik personel sayısının günümüzde 91'e ulaştığı, fakülteden 1892 veteriner hekim, 145 bilim doktoru ve 216 uzman yetiştiği saptanmıştır. Fakültenin yürütmüş olduğu eğitim-öğretim faaliyetleri, yöre hayvancılığına yönelik bilimsel araştırmaları ve hayvan hastanesindeki hizmetleri ile veteriner hekimliği bilimine, bölge ve dolayısıyla ülke hayvancılığına hizmet etmiş olduğu ifade edilebilir. Diğer taraftan fakülteye ait binalardaki dağınıklık yerleşim giderildiği takdirde daha verimli hizmet üretmenin mümkün olacağı söylenebilir.

### KAYNAKLAR

- Anonim.** [http://tr.wikipedia.org/wiki/F%C4%B1rat\\_%C3%9Cniversitesi](http://tr.wikipedia.org/wiki/F%C4%B1rat_%C3%9Cniversitesi),Erişim Tarihi: 15 Ağustos 2013a.
- Anonim.** <http://veteriner.istanbul.edu.tr/fakultemiz/kurulus-ve-gelisim/> Erişim Tarihi: 15 Ağustos 2013b.
- Anonim.** <http://veteriner.uludag.edu.tr/introduction/history.htm>) Erişim Tarihi: 15 Ağustos 2013c.
- Anonim.** Resmi Gazete, 06 Kasım 1981 tarih ve 17506 sayılı..
- Anonim.** Resmi Gazete, 20 Temmuz 1982a tarih ve 17760 sayılı.
- Anonim.** Resmi Gazete, 25 Temmuz 1982b tarih ve 17762 sayılı.

- Anonim.** Resmi Gazete, 11 Eylül 1983 tarih ve 18162 sayılı.
- Anonim.** Resmi Gazete 04 Ağustos 1989 tarih ve 20242 sayılı.
- Anonim.** Resmi Gazete, 11 Temmuz 1992 tarih ve 21281 sayılı.
- Anonim.** Resmi Gazete, 19 Eylül 2007 tarih ve 26648 sayılı.
- Anonim.** Yüzüncü Yıl Üniversitesi Rektörlüğü Arşivi 1982-2013a.
- Anonim.** Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Arşivi 1992-2013.
- Anonim.** Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı Arşivi 1982-2013b.
- Çamaş H.** Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nin Kuruluşu ve Gelişimi Hakkında Bilgi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 1991;1(1):1-10.
- Erk N.** Veteriner Tarihi, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları:195, Ankara Üniversitesi Basımevi. Ankara.1966; s. 228-231.

## *Micrococcus luteus*'un Bazı Gram pozitif Balık Patojenlerine Karşı Etkisinin Araştırılması

Tülay AKAYLI\*, Çiğdem ÜRKÜ<sup>1</sup>, Özgür ÇANAK<sup>1</sup>, Ece SÖNMEZ<sup>1</sup>, M. Hakan ERK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istanbul Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Hastalık Bölümü, Ordu Cad. No: 200 34470 Laleli, İstanbul /TURKEY

<sup>2</sup>Istanbul Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Sapanca İçsu Ürünleri Üretimi Araştırma Merkezi, Kurtköy, Adapazarı /TURKEY

Corresponding author e-mail: takayli@yahoo.com

### ÖZ

*Micrococcus luteus*, balık sağlığında bakteriyel hastalıklardan korunmak için probiyotik olarak kullanılan Gram pozitif bir bakteridir. Bu çalışma ile *M. luteus*' un kültürü yapılan gökkuşaağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) hastalığa neden olan Gram pozitif bakterilerin kontrolünde kullanılabilirliğinin in vitro koşullarda araştırılması amaçlanmıştır. Patojen mikroorganizma olarak yurdumuzdaki hasta gökkuşaağı alabalıklarından izole edilen *Staphylococcus cobnii* subsp. *cobnii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus garvieae* ve *Enterococcus faecalis* gibi Gram pozitif bakteriler kullanılmıştır. Gökkuşaağı alabalıklarında patojenite testi yapılan ve kültürü yapılan sinarit balıklarından (*Dentex dentex*) izole edilen *M. luteus*' un bu bakterilere karşı antagonistik etkisi disk difüzyon yöntemi ile test edilmiş ve bu bakterinin *S. aureus*, *S. epidermidis*, ve *S. cobnii* subsp. *cobnii*'ye karşı geniş inhibisyon zonları oluşturduğu gözlenirken *L. garvieae* ve *E. faecalis*'e karşı daha az etki gösterdiği dikkati çekmiştir. Bu çalışma ile ilk kez *M. luteus*' un Gram-pozitif bakterilerden olan *Staphylococcus* türlerine karşı antagonistik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Antagonistik Etki, *Enterococcus Faecalis*, *Lactococcus Garvieae*, *Micrococcus Luteus*, Probiyotik, Gökkuşaağı Alabalığı, *Staphylococcus Spp.*

## The investigation of *Micrococcus luteus* Against Some Gram positive Fish Bacteria

### ABSTRACT

*Micrococcus luteus* is a Gram positive bacterium that is used as probiotic for the prevention of bacterial diseases in fish health. The aim of this study is the determination of probiotic suitability of *M. luteus* in the control of Gram positive bacteria which cause diseases in the cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under in vitro conditions. Gram positive bacteria namely *Staphylococcus cobnii* subsp. *cobnii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus garvieae* ve *Enterococcus faecalis* which were isolated from rainbow trout, were used as pathogen microorganisms. The antagonistic effect of *M. luteus* isolated from cultured dentex (*Dentex dentex*) and made pathogenity test for cultured rainbow trout against these bacteria was tested by using disc diffusion method and while *M. luteus* produced wide inhibition zones against *S. aureus*, *S. epidermidis* and *S. cobnii* subsp. *cobnii*, less antagonistic effect was determined against *L. garvieae* and *E. faecalis*. With this study, antagonistic effect of *M. luteus* against members of the Gram positive bacterial genus *Staphylococcus* was determined for the first time.

**Key Words:** Antagonistic Effect, *Enterococcus Faecalis*, *Lactococcus Garvieae*, *Micrococcus Luteus*, Probiotic, Rainbow Trout, *Staphylococcus Spp.*

To cite this article: Akaylı T, Ürkü Ç, Çanak Ö, Sönmez E, Erk MH. *Micrococcus luteus*' un Bazı Gram pozitif Balık Patojenlerine Karşı Etkisinin Araştırılması. *Kocatepe Vet J.* 2016; 9(2): 74-79.



## GİRİŞ

Akuakültür sektörü son yıllarda birçok ülkede önemli ölçüde gelişmiş ve hızlı bir büyüme gerçekleştirmiştir. Bu hızlı gelişim sürecinde stress faktörleri ve çevre koşullarının değişimi sonucu meydana gelen hastalıklar nedeniyle ciddi ekonomik kayıplar meydana gelmektedir (Arda ve ark 2005). Bakteriye balık hastalıklarına karşı yanlış antibiyotik kullanımı balık patojenlerinin antibiyotiklere karşı direnç kazanmasına sebep olmakta ve bu durum bakteriyel hastalıkların tedavisini güçleştirmektedir (Aoki ve Watanabe 1973, Bruun ve ark 2000, Miranda ve Zemelman, 2002). Aynı zamanda kültür balıklarında hastalığa neden olan bazı Gram pozitif bakteriler zoonotik özelliğe sahiptir ve insanlarda tedavisi güç enfeksiyonlara neden olmaktadır (OIE, 2006). Bu nedenle akuakültür sektöründe hastalıkların kontrolü ve hastalıklara karşı koruma amacıyla spesifik olmayan savunma mekanizmasının güçlendirilmesi için immunostimulant ve aşı kullanımının yanı sıra günümüzde probiyotiklerin kullanımı gibi alternatif uygulamalar geliştirilmiştir (Gomez ve ark 2007, Abd-El Rahman ve ark 2009, Chantharasophon ve ark 2011, Didinen ve ark 2013). Probiyotikler, kültür balıklarının büyümesi (Arıç ve ark 2013, Süzer ve ark 2008) ve hastalıklara karşı direnç kazanmasında etkili olan mikrobiyal besin kaynaklarıdır (Irianto ve Austin 2002b, Korkut ve ark 2003, Bahadır Koca ve ark 2011). Akuakültür sistemlerinde antagonistik etkiye sahip probiyotik bakterilerin seçiminde özellikle suyun ve balığın doğal florasında bulunan suşlar tercih edilmektedir (Abd-El Rahman ve ark 2009, Chantharasophon ve ark 2011, Didinen ve ark 2013). Bir bakterinin probiyotik olarak tanımlanabilmesi için *in vitro* ve *in vivo* koşullarda gerçekleştirilecek birçok deneyin yapılması gerekmektedir (Irianto ve Austin 2002b, Gomez ve ark 2007). Günümüzde balık ve kabuklu kültür sistemlerinde probiyotik olarak kullanılan Gram pozitif bakteri genusları arasında *Micrococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus* ve *Carnobacterium* yer almaktadır (Gauthier ve ark 1975, Austin 1989, Bernan ve ark 1997). *In-vitro* koşullarda yapılan antagonistik testlerde *Micrococcus luteus*'un farklı balık patojenlerinin üremesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Irianto ve Austin 2002b, Abd-El Rahman ve ark 2009). Dünyanın farklı coğrafi bölgelerinde yetiştiriciliği yapılan gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Streptococcus iniae* (Eldar ve ark 1995), *Staphylococcus epidermidis* (Mousavi ve ark 2010) ve *Staphylococcus warneri* (Gil ve ark 2000, Mousavi ve ark 2010) gibi Gram pozitif patojen bakterilerin hastalığa neden olduğuna dair raporlar mevcuttur. Ülkemizde ki kültür gökkuşuğu alabalıklarında ise *Lactococcus garvieae* (Çağırğan 2004, Diler ve ark 2002, Timur ve ark 2011), *S. aureus*, *S. epidermidis* (Timur ve Akaylı, 2003), *S. cobnii subsp. cobnii* (Akaylı ve ark 2011) *Enterococcus*

*durans/birae*, *Enterococcus faecium-1* ve *Streptococcus anginosus* (Özer ve ark 2008) gibi Gram pozitif bakteriyel etkenlerin hastalık oluşturduğuna dair raporlar mevcuttur.

Bu çalışmanın amacı; daha önceki bir çalışmamızda sinarit balığı (*Dentex dentex*) larvalarından (M<sub>1</sub>) ve yetiştiricilik suyundan (M<sub>2</sub>) izole ettiğimiz *Micrococcus luteus* izolatlarının ülkemiz kültür alabalıklarında hastalığa neden olan bazı Gram pozitif patojen bakterilerin kontrolünde kullanılabilirliğinin *in vitro* koşullarda araştırılmasıdır.

## MATERYAL VE METOT

### Bakteri İzolatları

Bu çalışmada probiyotik etkisi araştırılan ve sinarit larvalarının (*Dentex dentex*) bağırsağından (M<sub>1</sub>) ve yetiştiricilik suyundan (M<sub>2</sub>) izole ve identifiye ettiğimiz *M. luteus* izolatları 2012 yılında yapmış olduğumuz proje çalışması sonucunda elde edilmiştir. Bu izolatlar çalışmada kullanılmak üzere -80 °C' deki derin dondurucudan çıkarılmış ve Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerinde 20-22 °C' de 48-72 saat inkübe edilmiştir.

Marmara ve Akdeniz Bölgelerinde kültürü yapılan hasta gökkuşuğu alabalıklarından izole ettiğimiz Gram pozitif şüpheli 20 bakteri örneği Brain Heart Infision Agar (BHIA) besiyerine ekim yapıldıktan sonra petri kutuları 20-22 °C' de 48-72 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında bu çalışmada kullanılacak, besiyerinde gelişen tüm bakterilere konvansiyonel bakteriyolojik yöntemler uygulanmış ve izole edilen Gram pozitif bakteriler tür düzeyinde identifiye edilmiştir (Buller, 2004; Austin ve Austin, 2012).

### Patojenite Testi

Patojenite testi İ.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan alınan 114 nolu karar ile gerçekleştirilmiştir. İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Sapanca İçsu Ürünleri Araştırma ve Uygulama Biriminden temin edilen yaklaşık 4-5 g ağırlığındaki 75 adet gökkuşuğu alabalığından 2 deney (M<sub>1</sub>-M<sub>2</sub>) ve 1 kontrol grubu olmak üzere 3 deneme grubu oluşturularak patojenite testi gerçekleştirilmiştir. *M. luteus* bakterisinin hücre yoğunluğu 10<sup>7</sup> hücre/ml olarak ayarlandıktan sonra denemede kullanılan alabalıklara hazırlanan bakteri banyo yöntemi ile verilmiştir. Kontrol grubundaki balıklara ise herhangi bir bakteri verilmemiştir. 30 gün boyunca balıklarda meydana gelebilecek klinik bulgular gözlenmiştir.

### Disk Difüzyon Metodu

Hasta gökkuşuğu alabalıklarından izole edilen Gram pozitif bakterilere karşı *M. luteus*' un *in vitro* antagonistik etkisi Bhunia ve ark. (1988)' nin kullandığı disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Bu amaçla hasta alabalıklardan izole edilen ve katı

besiyerinde üretilen Gram pozitif bakteriler, Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerinde 20-22°C' de 24 saat süre ile inkübe edildikten sonra yoğunluğu 10<sup>9</sup> hücre/ml olarak ayarlanmış, hazırlanan BHIA besiyerine 100 µl ilave edilerek steril eküvyon çubuğu ile petrilere yayılmıştır.

*M. luteus* izolatları ise TSA besiyerinde üretildikten sonra TSB besiyerine alınmış ve 20-22 °C' de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. *M. luteus*' un 24 saatlik kültürü 6 mm çapındaki steril filtre kağıtlarına emdirildikten sonra hazırlanan petrilere steril bir pens aracılığı ile yerleştirilmiştir. Kontrol olarak PBS (Phosphate Buffered Saline) emdirilmiş steril filtre kağıdı kullanılmıştır. Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş petri kutuları 20-22 °C'de 24-48 saat süre ile inkübe edilmiştir. Sonuçlar diskin etrafında inhibisyon zonu oluşumuna göre değerlendirilmiştir.

## BULGULAR

### Bakteriyolojik Bulgular

Hasta gökkuşağı alabalıklarından elde edilen 20 adet izolatın 5 farklı koloni morfolojisine sahip olduğu dikkati çekmiştir. Biyokimyasal test sonuçlarına göre (Tablo 1) değerlendirilen bu bakteriler *Staphylococcus cobnii* subsp. *cobnii*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *L. garvieae* ve *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır.

### Patojenite Testine Ait Bulgular

*M. luteus* izolatlarının (M<sub>1</sub> ve M<sub>2</sub>) deneysel olarak enfekte alabalıklarda herhangi bir klinik belirtiyeye ve mortaliteye neden olmadığı tespit edilmiştir.

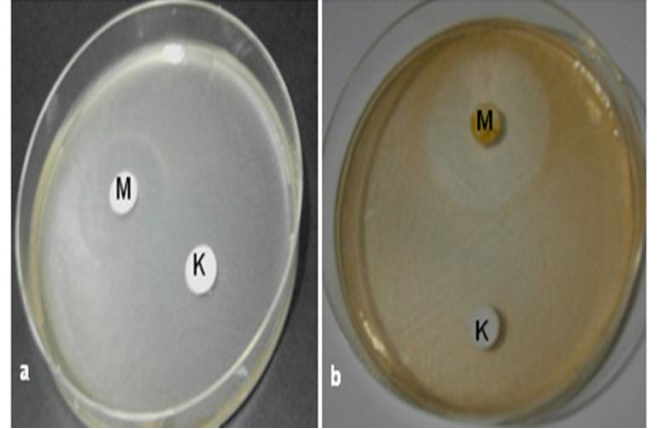
**Tablo 1:** Hasta balıklardan izole edilen Gram pozitif bakterilerin ve *M. luteus* izolatlarının ayırt edici biyokimyasal özellikleri

**Table 1:** Distinguishing biochemical characteristics of *M. luteus* isolates and Gram positive bacteria isolated from diseased fish

	1.izolat	2.izolat	3.izolat	4.izolat	5.izolat	M <sub>1</sub> /M <sub>2</sub>
Gram Boyama	+	+	+	+	+	+
Hareket	-	-	-	-	-	-
Koloni rengi	b-k	b-s	s	b	b-k	ps
SitokromOksidaz	-	-	-	-	-	+
Katalaz	+	+	+	-	-	+
Koagülaz	-	-	+	-	-	-
Kanlı Agar	γ	β	β	α	γ	α
O/F	F	F	F	F	F	O
%0 NaCl	+	+	+	+	+	+
% 1.5 NaCl	+	+	+	+	+	+
% 6.5 NaCl	+	+	+	+	+	+
β-galaktozidaz	-	-	-	-	-	-
İndol Üretimi	-	-	-	-	-	-
Metil Kırmızısı	+	-	-	+	-	-
Voges-Proskauer	-	+	+	+	+	-
Nitrat	-	-	+	-	-	-
Sitrat	-	-	-	-	-	-
Üre	-	+	+	-	-	-
Nişasta hidrolizi	-	-	-	-	-	-
Arjinin	-	-	+	+	+	-

### Disk Difüzyon Metoduna Ait Bulgular

*M. luteus* izolatlarının *S. aureus*, *S. epidermidis*, ve *S. cobnii* subsp. *cobnii*'ye karşı geniş inhibisyon zonları oluşturduğu dikkati çekmiştir (Resim 1a). Buna rağmen M<sub>1</sub> ve M<sub>2</sub> 'nin hasta balıklardan izole edilen *L. garvieae* ve *E. faecalis*'e karşı oluşturduğu inhibisyon zonlarının daha dar olduğu tespit edilmiştir (Tablo. 2). Disk difüzyon metoduna göre en geniş zon oluşumu ise *S. aureus*'a karşı gözlenmiştir (Resim. 1b).



**Resim 1:** *M. luteus*' un (a) *S. epidermidis*' e (b) *S. aureus*' a karşı oluşturduğu inhibisyon zonu (M: *M. luteus*, K:kontrol)

**Figure 1:** Inhibition zone of *M. luteus* against (a) *S. epidermidis* (b) *S. Aureus*

Ornitrin	+	-	-	-	-	-
Lizin	-	-	-	-	-	-
Arabinoz	-	-	-	-	-	-
Laktoz	-	+	-	-	+	-
Mannitol	+	-	+	+	+	-
Maltoz	+	+	+	+	+	-
Sükroz	-	+	+	+	+	-
İdentifikasyon	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. garvieae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>

**Tablo 2:** *M. luteus*' un hasta gökkuşuğu alabalıklarından izole edilen bakterilere karşı antagonistik etkisi

**Table 2:** Antagonistic effect of *M. luteus* against isolated bacteria from disease rainbow trout

Bakteri izolatları	<i>M. luteus</i> ' un antagonistik etkisi
<i>L. garvieae</i>	+
<i>E. faecalis</i>	+
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	++
<i>S. epidermidis</i>	+++
<i>S. aureus</i>	++++

+: < 10mm, ++: < 15 mm, +++: < 20 mm, ++++: < 25 mm

## TARTIŞMA

Akuakültür sektöründe hastalık etkenlerine karşı yanlış antibiyotik kullanımı sonucunda patojen mikroorganizmalar direnç kazanmakta ve hastalıkların tedavisini güçleştirmektedir. Bu nedenle günümüzde su kalitesini yükselten, zararlı patojenlerin gelişmesini engelleyen ve balığın büyümesini arttıran probiyotiklerin kullanımı ile ilgili çalışmalar önem kazanmıştır (Abd-El Rahman ve ark 2009, Chantharasophon ve ark 2011, Didinen ve ark 2013, Gomez ve ark 2007).

Yürütmüş olduğumuz bu çalışma ile hasta kültür alabalıklarından izole ettiğimiz *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *Lactococcus garvieae* ve *Enterococcus faecalis* türlerinin kültür balıklarında hastalığa neden olan Gram pozitif bakteri gruplarına dahil olduğu ve yurdumuzdaki diğer araştırmacılar tarafından daha önceki yıllarda rapor edilen patojen bakteri türleri ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Diler ve ark 2002, Timur ve Akaylı 2003, Savaşan ve ark 2008, Akaylı ve ark 2011).

Tatlı su ekosisteminin doğal bir parçası olan *M. luteus* daha önceki çalışmalarda gökkuşuğu alabalıklarında (Irianto ve Austin 2002b) ve tilapya balıklarında (*Oreochromis niloticus*) (Abd El-Rahman ve ark 2009) görülen *Aeromonas* türü bakterilere karşı antogonistik etki göstermesi nedeniyle probiyotik olarak kullanılmıştır. Austin ve Stobie, (1992) *M. luteus*' un gökkuşuğu alabalıklarında hastalığa neden olduğunu bildirilmesine rağmen Irianto ve Autin, (2002a) yaptıkları bir çalışmada bu bakteriyi alabalıkların sindirim kanalından izole etmiş ve deneysel olarak yaptıkları patojenite testi sonucunda hastalık

oluşturmadığını rapor etmişlerdir. Yapılan çalışmalara bakıldığında bu bakterinin Gram pozitif balık patojenlerine karşı antagonistik etkisinin olup olmadığı henüz araştırılmamıştır. Yürütmüş olduğumuz bu çalışma ile patojenite testinde gökkuşuğu alabalıklarında mortaliteye neden olmayan *M. luteus* izolatlarının hasta gökkuşuğu alabalıklarından izole ve identifiye ettiğimiz, Gram pozitif bakterilerden olan *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *L. garvieae* ve *E. faecalis* türlerine karşı antagonistik etkisinin varlığı ilk kez tespit edilmiştir.

Probiyotiklerin akuakültürde kullanımı ile ilgili yurt dışında çok sayıda araştırma mevcutken yurdumuzda ise bu konuda az sayıda çalışmaya rastlanılmıştır. Balıkların büyümesi ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında ticari olarak satın alınan probiyotikler (*Bacillus* ve *Lactobacillus* türleri) ile yapılan uygulamalarda çipura balıklarının büyüme performansında başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Süzer ve ark 2008, Arıç ve ark 2013). Bununla beraber Çapkin ve Altınok'un (2009) Karadeniz Bölgesi'ndeki gökkuşuğu alabalıklarının doğal florasyndan izole ettikleri probiyotik bakterileri yersiniosis hastalığının kontrolünde kullanmaları ile ilgili araştırmaları dışında yurdumuzda probiyotiklerin balık hastalıklarında kullanımına yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenden dolayı Gram pozitif bakteriyel etkenlere karşı probiyotik kullanımı ile ilgili yürütmüş olduğumuz bu araştırma ilk çalışmalar arasındadır.

## SONUÇ

Bu çalışma ile ilk kez *M. luteus*' un Gram pozitif balık patojenlerine karşı antagonistik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bir sonraki çalışmamızda bu bakterinin probiyotik olarak tanımlanabilmesi için gerekli işlem basamaklarının yapılması planlanmaktadır. Yurdumuzdaki gökkuşağı alabalıklarındaki hastalıkların kontrolünde kullanılacak doğru probiyotik bakteri türünün belirlenmesi ve probiyotik kullanımının artırılması ile gelecekte balık yetiştiriciliğinde daha başarılı sonuçlar elde edilecektir.

## KAYNAKLAR

- Abd El-Rhman AM, Khattab YA, Shalaby AM.** *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Fish & Shellfish Immun. 2009; 27:175–180.
- Akaylı T, Ürkü Ç, Başaran B.** Kültür balıklarında *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* enfeksiyonu. İ.Ü. Su Ürün Derg.2011; 26: 1-12.
- Aoki T, Watanabe T.** Studies of drug-resistant bacteria isolated from eel-pond water and intestinal tracts of the eel *Anguilla japonica* and *Anguilla anguilla*. B Jpn Soc Sci Fish. 1973; 39: 121–130.
- Arda M, Seçer S, Sarıeyüpoğlu M.** Balık Hastalıkları. Medisan Yayınları, Ankara.2005.
- Arıç N, Süzer C, Gökvardar A, Başaran F, Çoban D, Yıldırım Ş, Kamacı HO, Fırat K, Saka Ş.** Effects of probiotic (*Bacillus* sp.) supplementation during larval development of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.). Turk J Fish Aquat Sc. 2013; 13:407-414.
- Austin B, Austin DA.** Bacterial FishPathogens: Disease of farmed and wildfish, 5th edition. Springer, New York, 2012.
- Austin B, Stobie M.** Recovery of *Micrococcus luteus* and presumptive *Planococcus* sp. from moribund fish during an outbreak of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fry syndrome in England. J Fish Dis. 1992; 15: 203-206.
- Austin B.** Novel pharmaceutical compounds from marine bacteria. J Appl Bacteriol. 1989; 67: 461-470.
- Bahadır Koca S, Didinen BI, Ekici S, Dulluç A.** Su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotik uygulamaları. *Journal of FisheriesSciences.com*. 2011; 5: 326-335.
- Bernan VS, Greenstein M, Maisese WM.** Marine microorganisms as a source of new natural products. Adv Appl Microbiol.1997; 43: 57-90.
- Bhunja AK, Johnson MC, Ray B.** Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidolactici*. J Appl Bacteriol.1998; 65: 261–268.
- Bruun MS, Schmidt AS, Madsen L, Dalsgaard I.** Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. Aquaculture. 2000; 187: 201–212.
- Buller NB.** Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical identification manual. CABI Publishing, UK. 2004.
- Chantharasophon K, Warong T, Mapatsa P, Leelavatcharamas V.** High potential probiotic *Bacillus* species from gastrointestinal tract of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Biotechnology . 2011; 6: 498-505.
- Çağırğan H.** Biotyping of *Lactococcus garvieae* isolated from Turkey. Ege Üniversitesi Journal of Fisheries & Aquatic Science. 2004; 3: 267-269.
- Çapkın E, Altınok I.** Effects of dietary probiotic supplementations on prevention / treatment of yersiniosis disease. J Appl Microbiol. 2009; 106: 1147-1153.
- Didinen BI, Metin S, Çaylı Ö, Ersoy AT.** Screening for candidate probiotic bacteria for the control of *Vibrio anguillarum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Journal of FisheriesSciences.com. 2013; 4: 317-322.
- Diler O, Altun S, Adiloglu A, Kubilay A, Isıklı B.** First occurrence of streptococcosis affecting farmed rainbow trout in Turkey, B Eur Assoc Fish Pat. 2002; 1: 21-26.
- Eldar A, Bejerano Y, Livoff A, Horovitz A, Bercovier H.** Experimental streptococcal meningoencephalitis in cultured fish. Vet Microbiol. 1995; 43: 33- 40.
- Gauthier MJ, Shewan JM, Gibson DM, Lee JV.** Taxonomic position and seasonal variations in marine neritic environment of some Gram-negative antibiotic producing bacteria. J Gen Microbiol. 1995; 87: 211-218.
- Gil P, Vivas J, Gallardo CS, Rodriguez LA.** First isolation of *Staphylococcus warneri*, from diseased rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Northwest Spain. J Fish Dis. 2000; 4: 295–298.

- Gomez RG, Balcazar JL, Shen MA.** Probiotics as control agents in aquaculture. *Oceanic and Coastal Sea Research.* 2007; 1: 76-79.
- Irianto A, Austin B.** Probiotics in aquaculture: Review. *J Fish Dis.* 2002b; 25: 633–642.
- Irianto A, Austin B.** Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Diseases.* 2002a; 25: 333–34.
- Korkut AY, Hoşsu B, Ferhatoğlu M.** Probiyotikler ve su ürünlerinde kullanımı. *Ege Üniversitesi Su Ürün Derg.* 2003; 20: 551 – 556.
- Miranda CD, Zemelman R.** Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture.* 2002; 212: 31–47.
- Mousavi SS, Khara H, Saeidi AA, Ghiasi M, Zahedi A.** Determination of staphylococcosis and micrococcosis outbreak on selected rainbow trout farms in Mazandaran Province. *J Fish.* 2010; 1: 109-114.
- OIE (Office International des Epizooties).** Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. report of a joint FAO/OIE/WHO expert consultation. Seoul, Republic of Korea, 13- 16 June, WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland. 2006.
- Özer S, Bulduklu S, Dönmez E.** Streptococcosis occurrence at rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) cultivated in province Mersin-Turkey, *Journal of Fisheries Sciences.com.* 2008; 3: 272-283.
- Savaşan S, Kaya O, Kırkan Ş, Çiftçi A.** Balık kökenli *Enterococcus faecalis* suşlarının antibiyotik dirençlilikleri. *A.Ü. Vet Fak Derg.* 2008; 55: 107-110.
- Süzer C, Çoban D, Kamacı OH, Saka S, Fırat K, Otgucuoglu O, Küçüksarı H.** *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture .* 2008; 280: 140-145.
- Timur G, Akayli T.** First study of staphylococcosis in farmed rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss* W.1792) in Turkey. *International Symposium of Fisheries and Zoology*, October 23 -26, İstanbul, 2003, pp 67-80.
- Timur G, Yardımcı RE, Ürkü Ç, Çanak Ö.** Marmara bölgesi kültür alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, W.) lactococcosis' in bakteriyolojik ve histopatolojik metodlarla teşhisi. *İ.Ü. Su Ürün Derg.* 2011; 26: 63-81.

## Sıçanların Lakrimal Bezlerinde Östrojen ve Progesteron Reseptörlerinin İmmunohistokimyasal Ekspresyonu

Emel ALAN<sup>1\*</sup>, Narin LİMAN<sup>1</sup>

<sup>1,2</sup>Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri/TÜRKİYE

Corresponding author e-mail: ealan@erciyes.edu.tr

### ÖZ

Seks steroid hormonları (östrojen ve progesteron) spesifik reseptörleri aracılığıyla lakrimal bez fonksiyonlarının önemli düzenleyicisidirler. Bu hormonların eksikliği göz kuruluğu ile karakterize keratokonjunktivitis sikka (KCS) hastalığına neden olmaktadır. Sunulan çalışma, erişkin erkek sıçanların intraorbital ve ekstraorbital lakrimal bezinde östrojen reseptör  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), östrojen reseptör  $\beta$  (ER $\beta$ ) ve progesteron reseptörlerinin (PR) immunohistokimyasal lokalizasyonlarını ortaya koymak amacıyla planlandı. Anestezi altında 8 adet erkek sıçandan elde edilen lakrimal doku örneklerine rutin histolojik prosedürü takiben Strep-ABC immunohistokimyasal boyama tekniği uygulandı. İntraorbital ve ekstraorbital bez epiteli, akıtıcı kanal epiteli, mioepitel ve kan damarların endotel hücrelerinin hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde değişen derecelerde ER $\alpha$ , ER $\beta$  ve PR immunreaktivitesi saptandı. Her iki bezin bütün yapısal komponentlerinde ER $\alpha$  en yoğun olarak çekirdekte bulunurken, ER $\beta$ 'nin en yoğun sitoplazmada lokalize olduğu tespit edildi. PR immunreaktivitesinin ise hem intraorbital hem de ekstraorbital bez epitelinin lateral membranlarında ve intraorbital bezin mioepitel hücrelerinde kuvvetli boyanma olduğu gözlemlendi. Aynı zamanda intraorbital bezlerde kan damarlarının etrafında bulunan mast hücrelerinde pozitif ER $\beta$  immunreaksiyonu saptanırken, ekstraorbital bezin intersitisyel bağ dokusu içinde ER $\alpha$ , ER $\beta$  ve PR pozitif stromal hücrelere rastlandı. Sonuç olarak, erkek sıçanlarda intraorbital ve ekstraorbital bezin bütün yapısal komponentlerinde değişen derecelerde ER $\alpha$ , ER $\beta$  ve PR immunreaktivitesinin saptanması lakrimal bezin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü sürdürmede östrojen ve progesteron hormonlarının reseptör bazlı etkisinin olduğu fikrini desteklemektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Östrojen Reseptör, Lakrimal Bez, Progesteron Reseptör, Sıçan

### Immunohistochemical Expression of Estrogen and Progesterone Receptors in the Lacrimal Glands of the Rats

#### ABSTRACT

Sex steroid hormones (estrogen and progesterone) are important regulators in lacrimal gland functions with the help of its specific receptors. The deficiency of these hormones causes disease of keratokonjunktivitis sicca (KCS) which is characterized with eye dryness. This study was aimed to show the immunohistochemical localization of the ER $\alpha$ , ER $\beta$  and PR in intraorbital and extraorbital lacrimal glands of the rat. Following the routine histological procedure, the Strep-ABC immunohistochemical staining method was performed to the lacrimal gland samples obtained from 8 rats under anesthesia. Changing degrees of ER $\alpha$ , ER $\beta$  and PR immunoreactivity were determined in cytoplasm and nucleus of the secretory epithelium, duct epithelium, mioepithelial cells and endothelial cells of the intraorbital and extraorbital gland. It was determined that ER $\alpha$  was found intensely in the nucleus of the all structural components of the two glands, whereas ER $\beta$  was found intensely located in the cytoplasm. PR immunoreactivity was shown strongly in the lateral membranes of both gland epithelium and in the mioepithelial cells of the intraorbital glands. Also, positive ER $\beta$  immunoreaction was detected in the mast cells around the blood vessels in the intraorbital glands, whereas ER $\alpha$ , ER $\beta$  and PR positive stromal cells were detected in the interstitial connective tissue of the extraorbital gland. As a conclusion, changing degrees of ER $\alpha$ , ER $\beta$  and PR immunoreactivity found in all structural components of both glands supports the idea that the receptor based estrogen and progesterone hormones have an effect on the maintainance of the structural and functional integrity of the lacrimal gland.

**Key Words:** Estrogen Receptor, Lacrimal Gland, Progesterone Receptor, Rat

To cite this article: **Alan E, Liman N.** Sıçanların Lakrimal Bezlerinde Östrojen ve Progesteron Reseptörlerinin İmmunohistokimyasal Ekspresyonu. *Kocatepe Vet.J. 2016; 9(2): 80-87.*

## GİRİŞ

Seks steroid hormonları cinsiyet spesifiktir. Örneğin; erkeklerde androjen hormonu, dişilerde östrojen ve progesteron hormonları baskındır. Seks steroid hormonları yani östrojen, progesteron ve testosteron dişilerde ovaryum, erkeklerde ise testislerde üretilirler ve kanın sirkülasyonu ile hemen hemen vücudun bütün dokularına yayılırlar, fakat bu hormonlar hedef dokularda bulunan spesifik reseptörler aracılığıyla faaliyet gösterirler. Seks steroid hormon reseptörleri hedef dokularda yer alan hücrelerin çoğunlukla çekirdeğinde ve/veya sitoplazmasında lokalize olurlar, ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar bu reseptörlerin hücrelerin plazma membranından da izole edildiği yönündedir (Singh ve ark. 2002).

Östrojenler, erkeklerde ve dişilerde hem reproduktif hem de reproduktif olmayan dokularda büyüme, farklılaşma ve inflamatuvar yanıt gibi çeşitli hücresel fonksiyonları düzenleyen seks steroid hormonlardır. Östrojen hormonunun fonksiyonuna spesifik çekirdek reseptör olan östrojen reseptörünün (ER) iki alt tipi (ER $\alpha$  ve ER $\beta$ ) ve onların izoformları aracılık etmektedir (Heldring ve ark. 2007). ER $\alpha$ , spesifik dişi dokularında rastlanılırken, ER $\beta$ 'nın vasküler doku ve merkezi sinir sistemi gibi bir çok dokuda bulunduğu bildirilmektedir. Farklı yapıları ve dağılımları temel alındığında, ER izoformları farklı biyolojik aktiviteye sahiptir, fakat ER $\beta$ 'nın fonksiyonu tam olarak anlaşılammıştır (Pavao ve Traish 2001).

Bir diğer steroid hormon olan progesteron hormonunun fizyolojik etkilerine ise progesteron reseptör (PR) adı verilen intrasellüler reseptörler aracılık etmektedir ve bu progesteron reseptörleri transkripsiyon faktörlerinin nüklear reseptör süper ailesinin bir üyesidir (Tsai ve O'Malley 1994). Progesteron ligandına bağlanma yoluyla nüklear reseptör ligand kompleksi hedef genlerin ekspresyonunu indüklemek için çekirdeğe transloke olur ve daha sonra progesteron hormonuna hedef hücrenin fizyolojik cevabının ortaya çıkmasına neden olur. Meme bezi gibi birçok dokuda PR, östrojen tarafından indüklenir. PR, PR-A ve PR-B olmak üzere iki izoformdan oluşur. Birçok hücrede PR-B, progesteron-duyarlı genlerin transkripsiyonal aktivatörleri olarak fonksiyon gösterirken, PR-A, bütün steroid hormon reseptörlerinin transkripsiyonal inhibitörü olarak fonksiyon göstermektedir (Vegeto ve ark. 1993). Nüklear PR'ü erkeklerin ve maymunların hipofiz, hipotalamus, epididimis, prostat, testis ve meme bezi gibi dokularında eksprese edilirken, dişilerde progesteron hormonunun hedef organları

ovaryum, uterus ve meme bezidir (Luetjens ve ark. 2006).

Östrojen ve progesteron reseptörleri, sıçan, tavşan ve insanların lens, retina/uvea, retina/koroid, retinal pigment epitel hücreleri, kornea, iris, korpus siliyare, lakrimal bez, lakrimal bez asiner epitel hücreleri, meibomian bez, göz kapağı, palpebral ve bulbar konjunktiva gibi çeşitli oküler dokuların yapısal ve fonksiyonel özelliklerinde önemli bir rol oynamaktadır. Aynı zamanda bu steroid hormon reseptörlerinin cinsiyet ve doku-spesifik farklılıklar içerdiği tespit edilmektedir. Buna göre; dişilerin retina/uvea örneklerinde östrojen ve progesteron reseptör mRNA'ları sırasıyla %50 ve %33.3 oranında bulunurken, erkek ve dişi sıçanların lensinde PR mRNA'ya rastlanmamaktadır (Wickham ve ark. 2000). İnsanlar üzerinde yapılan bir diğer çalışmada erkek ve kadınlar arasında lakrimal ve diğer göz ile ilişkili bezler, oküler yüzey, lens kristali, retinokoroid kompleksde farklılıklar bulunduğu ifade edilmektedir. Bu farklılıkların ise yaş, menstrual siklus, gebelik, menopoz veya andropoz gibi seks steroid hormon (östrojen, progesteron ve androjen) seviyelerindeki dalgalanmadan kaynaklandığı bildirilmektedir (Gupta ve ark. 2005). Kadınlarda menopoz sonrası, erkeklerde ise andropoz sonrası seks steroid hormon seviyelerinde azalma ile birlikte glokom ve lakrimal bez sekresyonunda azalma ile karakterize keratokonjunktivitis sikka (Sjögren sendromu) gibi göz hastalıklarının insidensinde artış meydana gelmektedir (Schaumberg ve ark. 2001).

Seks steroid hormonlarının aynı zamanda farelerin lakrimal bezinde moleküler fonksiyonlar, hücresel komponentler ve biyolojik süreçlerde etkili olduğu gösterilmektedir. Örneğin; 17 $\beta$ -östrodiol, progesteron ve kombine seks steroid hormon tedavisi, nükleik asit ve protein metabolizması, hücre büyüme, hücre iletişim, sinyal transdüksiyonu ve transkripsiyonal düzenleme ile ilişkili çok sayıda gen ekspresyonunu etkilemektedir (Suzuki ve ark. 2006).

Seks steroid hormonlar (östrojen ve progesteron), lakrimal doku üzerinde ya non-klasik yollar (membran reseptörleri) aracılığıyla ya da diğer hormonların kontrolü (hipofizden salgılanan) altında indirekt olarak etki göstermektedir (Hewitt ve ark. 2005). Klasik olmayan mekanizmalar, membran geçirgenliğinde değişiklikler, nörotransmitter reseptörlerin kontrolü ve spesifik plazma membran reseptörleri ile etkileşimdir. İndirekt mekanizmalar ise daha sonra göz üzerinde etki eden hipofiz hormonlarının serbest bırakılması yoluyla ortaya çıkan etkileri içermektedir (Brann ve ark. 1995).

Bir çok çalışmada seks steroid hormonlarının lakrimal bezin yapısal, fonksiyonel ve/veya patolojik özelliklerini ayarlayabileceğini ve bu hormonların faaliyetlerinin lakrimal bezin cinsiyetle ilişkili farklılıkların çoğundan sorumlu olduğu rapor edilmektedir. Ancak bu endokrin etkiye rağmen seks steroid hormonlarının etkisi altında yatan temel mekanizmalar ile ilgili çok az bilgiye rastlanmaktadır. Bu nedenle bizim amacımız hem lakrimal bezin çeşitli hastalıklarının tedavisinde kullanılacak hormonal terapötik stratejiyi belirlemek hem de lakrimal bezin fizyolojik fonksiyonunun düzenlenmesine yardımcı olmak amacıyla dişiler hariç (dişilerde hormonal dalgalanmadan dolayı) sadece erkek sıçanların hem intraorbital hem de ekstraorbital lakrimal bezlerinde ER $\alpha$ , ER $\beta$  ve PR immunreaktivitesinin belirlenmesi amaçlandı.

## MATERYAL VE METOT

### Doku Temini

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi deney hayvanları merkezinde yetiştirilen 6-8 haftalık, ortalama ağırlıkları 250-300 gr olan Rattus norvegicus (Wistar albino) ırkı 8 adet erkek ergin sıçan kullanıldı. Sıçanlardan rompun ve ketalar anestezisi (Rompun 13 mg/kg, Ketalar 87 mg/kg) altında lakrimal bezin ekstraorbital ve intraorbital kısımları çıkartıldıktan sonra hayvanlar ötenazi edildi. Çıkartılan lakrimal bez örnekleri formol-alkol tespit solüsyonunda 12 saat tespit edildi. Sırasıyla dereceli alkoller, metil benzoat ve benzol solüsyonlarından geçirilerek parafinde bloklandı. Bu parafin bloklardan Leica RM 2125 rotary mikrotomu ile 4  $\mu$ m kalınlığında üç seri kesit alındı. Alınan seri kesitlere sırasıyla ER $\alpha$ , ER $\beta$  ve PR'yi belirlemek için streptavidin-biotin-peroksidaz immunohistokimyasal teknik (Thermo Fisher Scientific Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA) uygulandı. Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanlığı tarafından onaylandı (karar no: 13/47).

### İmmunohistokimyasal Analizler

İmmunohistokimyasal incelemeler için hazırlanan preparatlar deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden sonra distile suda çalkalanarak endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için metanolde hazırlanan %3' lük hidrojen peroksitte 15 dakika süreyle tutuldu ve PBS (Phosphate buffer saline, 0.01 M, pH:7.4)'de iki kez yıkandı. Ardından, bütün antikolar için 0.01 M sitrat buffer'da (pH:6.0) 30 dakika antijen retrieval işlemi yapıldı ve 20 dakika soğutma işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra, bir nem kamerası (Thermo Shandon, UK) içinde non-spesifik bağlanmaları engellemek için %10' luk keçi serumu (Ultra V Block, Thermo Fisher Scientific Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA; TA-125UB) ile 5 dakika süreyle inkube edildi. Bu işlemlerden sonra, kesitler ER $\alpha$  (MC-20, sc-542, Santa Cruz Biotechnology, USA, 1:50), ER $\beta$  (ab-3576, Abcam,

USA, 1:50), ve PR (C-20, sc-539, Santa Cruz Biotechnology, USA, 1:100) primer antikolarıyla +4 °C de 1 gün süreyle buzdolabında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra kesitlere 20 dakika süreyle oda ısısında biotinli goat anti-rabbit sekonder antikoru uygulandıktan sonra avidin-peroksidaz solüsyonu (Labvision, Ultravision kit, TS-125-HR) ile 20 dakika muamele edildi. Her bir işlemten sonra kesitler PBS'de dört kez yıkandı. Antijen-antikor reaksiyonun görüntülenebilmesi için 5-10 dakika süreyle 3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB; Thermo Fisher Scientific Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA), ardından zemin boyaması için 5 dakika süreyle Gill'in hematoksileni uygulandı ve kesitler mavileşinceye kadar çeşme suyunda yıkandı. Son olarak alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek kesitler entellan ile kapatıldı. Kahverengi presipitasyonun görülmesi sonucunda reaksiyon pozitif olarak değerlendirildi ve ışık mikroskopunda (BX51; Olympus, Tokyo, Japan) incelenerek fotoğraflandı. Pozitif kontrol olarak, çalışmada kullanılan her bir primer antikor için insanlardan elde edilen meme karsinomu kullanıldı. Negatif kontroller olarak alınan doku örnekleri ise primer antikorsuz kullanılan antikorun hazırlandığı hayvan türüne göre non-immun serum ile muamele edildi.

### Semi-kantitatif Analizler

İmmunohistokimyasal boyanma yoğunluk skoru (IS) kullanılarak semikantitatif olarak değerlendirildi (Brown ve Lamartiniere 2000). Yoğunluk skoru, sitoplazma, çekirdek ve membranda bulunan pozitif boyanma yoğunluğunu yansıtmaktadır. Bu metotda, yoğunluk skoru (IS); -: negatif, +: zayıf, ++: orta, +++: kuvvetli olarak değerlendirildi.

Hücrelerde immunohistokimyasal reaksiyonların yoğunluk skoru iki bağımsız araştırmacı tarafından incelendi (E.A., N.L.) ve bu iki araştırmacının ortalama skoru hesaplandı. Sıçanların ekstraorbital ve intraorbital lakrimal bezinde ER $\alpha$ , ER $\beta$ , ve PR immunlokalizasyonları mikroskopta farklı büyütmelerde incelenerek dört farklı hücre grubunda değerlendirildi: Bez epitel hücreleri, akıtıcı kanal epitel hücreleri, miyoepitel hücreleri ve kan damarlarının endoteli.

## BULGULAR

### Lakrimal bezlerde ER $\alpha$ 'nın immunlokalizasyonu

İntraorbital bez epiteli, akıtıcı kanal epiteli, miyoepitel ve endotel hücrelerinin çekirdeğinde kuvvetli ER $\alpha$  immunreaksiyonuna rastlanırken, sitoplazmadaki reaksiyon orta dereceli idi. Ekstraorbital bez epitel hücrelerinin ve miyoepitel hücrelerinin çekirdeğinde de kuvvetli ER $\alpha$  immunreaksiyonuna rastlandı. Akıtıcı kanal epitel hücrelerinin hem çekirdeği hem de sitoplazmasında ise orta dereceli bir reaksiyon saptanırken, endotel hücrelerindeki reaksiyonun biraz daha zayıf olduğu



tespit edildi. İntersitisyel bağ doku bölmelerinde bulunan stromal hücrelerinin çekirdeğinde de kuvvetli ER $\alpha$  immunreaktivitesi saptandı (Şekil 1, Tablo 1).

**Lakrimal bezlerde ER $\beta$ 'nin immunlokalizasyonu**  
İntraorbital bez epiteli, akıtıcı kanal epiteli, miyoepitel ve endotel hücrelerinin sitoplazmasındaki ER $\beta$  immunreaksiyonu çekirdeğe göre daha kuvvetli idi. Kan damarlarının etrafında bulunan mast hücrelerinde de pozitif immunreaksiyon saptandı. Aynı şekilde ekstraorbital bez epiteli, akıtıcı kanal epiteli ve miyoepitel hücrelerinin sitoplazmasında kuvvetli ER $\beta$  immunreaksiyonuna rastlandı. Endotel hücrelerinde ise orta dereceli bir reaksiyon gözlemlendi. Ayrıca ekstraorbital lakrimal bezin intersitisyel bağ dokusu (stroma) içinde sitoplazması ER $\beta$  pozitif stromal hücreler tespit edildi (Şekil 2, Tablo 1).

**Lakrimal bezlerde PR'nin immunlokalizasyonu**  
İntraorbital bez epiteli, akıtıcı kanal epiteli ve endotel hücrelerinin hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde orta dereceli PR immunreaksiyonuna rastlanılırken, miyoepitel hücrelerindeki reaksiyonun daha kuvvetli olduğu belirlendi. Aynı zamanda her iki bezin salgı epitel hücrelerinin lateral membranlarında PR pozitif immunreaksiyonuna rastlandı. Ekstraorbital bezde ise akıtıcı kanal epitel hücrelerinin sitoplazmasındaki PR immunreaksiyonunun bez epitel hücrelerinden daha yoğun olduğu tespit edildi. Miyoepitel ve endotel hücrelerinde orta dereceli bir reaksiyon gözlemlendi. Ayrıca ekstraorbital lakrimal bezin intersitisyel bağ dokusu (stroma) içinde PR pozitif stromal hücrelere rastlandı (Şekil 3, Tablo 1).

Negatif kontrol olarak alınan lakrimal bez doku örnekleri ise primer antikorsuz kullanılan antikorun hazırlandığı hayvan türüne göre non-immun serum ile muamele edildiğinde hiçbir immunreaksiyon saptanmadı (Şekil 4).

## TARTIŞMA

Östrojenlerin lakrimal bezin anatomi, fizyoloji ve seksüel dimorfizmde önemli bir rol oynadığı ortaya koyulmuştur. Buna göre; ovariektomi ve antiöstrojen tedavilerinin lakrimal bezin asiner hücrelerinde bozulma ve nekrozis, hücresel vakuolizasyon, DNA parçalanması, inflamasyon, glandular doku kaybı ve kuru göz sendromuna (dry eye syndrome, DES) neden olduğu (Azzarolo ve ark. 2003; Krawczuk-Hermanowiczowa 1983), östrojen uygulamalarının ise lakrimal bez yapısında ve fonksiyonundaki bu değişiklikleri düzelttiği ve lakrimal sekresyonu artırdığı ifade edilmiştir (Krawczuk-Hermanowiczowa 1983; Lauria ve Porcelli 1979). Diğer çalışmalarda ise ne östrojen yetersizliğinin ne de östrojen tedavisinin lakrimal bezin sekresyonu, lenfosit infiltrasyonu, spesifik enzim aktivitesi, total protein içeriği, ağırlığı, morfolojisi üzerinde hiçbir etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir (Lauria ve Porcelli

1979; Sullivan ve ark. 1984). Östrojenlerin lakrimal doku üzerinde negatif bir etkiye sahip olduğunu gösteren başka bir çalışmada ise östrojenlerin, glandular regresyon, protein üretimini baskılama, androjen ile zıt etkileşim ve göz yaşında azalmaya yol açtığı rapor edilmiştir (Lauria ve Porcelli F. 1979; Ranganathan ve De 1995). Sunulan çalışmada sıçan lakrimal bezlerinde ER $\alpha$  ve ER $\beta$ 'nin sadece immunlokalizasyonu incelenmiş ve dolayısıyla lakrimal bezin östrojen hormonunun hedefinde yer aldığı tespit edilmiştir. Fakat çalışmanın yapıldığı bu erkek sıçanlara herhangi bir işlem yapılmadığı (kastasyon gibi) için östrojenin lakrimal bez üzerinde ne düzeyde bir etkiye sahip olduğu saptanamamıştır ve dolayısıyla farklı deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Şimdiye kadar insanların ve memeli hayvanların (fare, tavşan, sıçan gibi) çeşitli oküler dokularında (kornea, retina, konjunktiva, lakrimal bez, meibomian bez, iris, lens, siliar cisim) çoğunlukla ER ve daha az oranda PR'nin varlığı araştırılmıştır. Bu çalışmalara göre; Esmaeli ve ark (2000) hem erkeklerde hem de dişilerde üst göz kapağının meibomian bezlerinde östrojen reseptörlerini (ER $\alpha$ ) tanımlamıştır. İnsan (Hadeyama ve ark. 2002) ve fare korneasında (Tachibana ve ark. 2000) RT-PCR yöntemi ile yapılan bir çalışmada ER'i saptanmıştır. Hadeyama ve ark (2002) da aynı şekilde insan korneasında ER $\alpha$ , ER $\beta$  ve PR immunreaktivitesini belirlerken, ER $\beta$  mRNA'sı hem insan korneasından hem de retinasından izole edilmiştir (Suzuki ve ark. 2001; Munaut ve ark. 2001). Bu çalışmalara zıt olarak Vécsei ve ark (2000) insan korneasında immunohistokimyasal olarak ER'i belirleyememiştir. İnsanların konjunktiva, lakrimal bez ve tarsal plak gibi göze ait dokularında yapılan başka bir çalışmada RT-PCR yöntemi değişen derecelerde ER $\alpha$  mRNA ekspresyonuna rastlanırken, ER $\beta$  mRNA'nın özellikle lakrimal bezde eksprese olduğunu ve ER $\alpha$  immunreaktivitesinin ise bu dokularda oldukça zayıf (ısıya duyarlılığından dolayı) olduğu sonucuna varılmıştır (Spelsberg ve ark. 2004). Fuchsjaeger-Mayrl ve ark (2002) RT-PCR ve western blot tekniği ile yapmış olduğu araştırmada premenopoz dönemi kadınların konjunktivasında ER $\alpha$ , ER $\beta$  ve PR'nin varlığını ortaya koymuştur ve bu araştırmacılar seks steroid reseptörlerinin varlığının konjunktivanın olgunlaşması, kadeh hücre olgunlaşması ve allerjik cevapta seks steroid indüklemeli değişikliklerin meydana gelmesi için gerekli olduğu şeklinde yorumlamıştır. Bu çalışmalara zıt olarak insan konjunktivasında ER ve PR'nin negatif olduğu tespit edilmiştir (Gans ve ark. 1990). Bunun dışında oküler dokularda yapılan diğer çalışmalarda ER $\alpha$  immunreaktivitesinin siliar cisim, iris ve lens epitelinde (Ogueta ve ark. 1999), sıçan, tavşan ve insanların lakrimal bezlerinde ise ER mRNA eksprese edilmiştir (Wickham ve ark. 1998). Dolayısıyla insan konjunktivasında ER ve PR'i (Gans

ve ark. 1990) ve insan korneasında ER'i (Véscei ve ark. 2000) saptayamayan çalışmalara zıt olarak, sıçanların ve insanların lakrimal bezlerinde ER mRNA'yı saptayan çalışmalara (Wickham ve ark. 1998; Spelsberg ve ark. 2004) benzer şekilde bizim çalışmamızda da sıçanların her iki lakrimal bezinin bütün yapısal komponentlerinde ER $\alpha$ , ER $\beta$  ve PR immunreaktivitesi saptanmıştır.

Sıçanlarda intraorbital ve ekstraorbital lakrimal bezin salgı epiteli, akıtıcı kanal epiteli, miyoepitel ve endotel hücrelerinin sitoplazmasında, çekirdeğinde ve lateral membranlarda farklı yoğunlukta ER $\alpha$ , ER $\beta$  ve PR immunlokalizasyonu tespit edilmiştir. Her iki bezde ER $\alpha$  immunreaktivitesi en yoğun olarak çekirdekte rastlanırken, ER $\beta$  immunreaktivitesi sitoplazmada daha yükündür. PR immunreaktivitesine ise sitoplazmik ve çekirdek reaksiyonları dışında bez epitel hücrelerinin lateral membranlarında pozitif olarak belirlenmiştir. Şimdiye kadar yapılan immunohistokimyasal ve immunositokimyasal analizler temel alındığında, Abdo ve ark (2009), albino sıçanların lakrimal bezlerinde yer alan asiner (bez epiteli, salgı epiteli, korpus glandula) hücrelerinin çekirdeğinde kuvvetli ER immunreaktivitesine rastlarken bazı araştırmacılar sıçanın lakrimal dokusunda ER'i saptayamamış ya da önemsiz düzeyde bulmuştur (Sullivan ve ark. 1996). Gligorijević ve ark (2011) insanların lakrimal bezlerinin asiner hücrelerinde ER ve PR immunohistokimyasal ekspresyonunun hem sitoplazmada hem de çekirdekte lokalize olduğunu rapor etmiştir. Camacho-Arooyo ve ark (1999) tavşanların submandibular tükürük bezinde yapmış olduğu çalışmada ER ve PR'ini asiner hücrelerinin çekirdeğinde lokalize olduğunu bildirmişlerdir. Tükürük bezi üzerinde yapılan başka bir çalışmada ER $\alpha$  ve ER $\beta$  proteinlerinin tükürük bezi epitel hücrelerinde hem çekirdek hem de sitoplazmik olarak lokalize olduğu ifade edilmiştir. Çeşitli hücrelerde ER yoğunlukla sitoplazmada bulunduğunu, ancak sitoplazmik ER'in tam olarak rolünün bilinmediği bildirilmiştir (Heldring ve ark. 2007). Hem çekirdek hem de sitoplazmada bu reseptörlerin lokalizasyonundan bahseden çalışmalara (Heldring ve ark. 2007; Gligorijević ve ark. 2011) paralel olarak bizim çalışmamızda da ER $\alpha$ , ER $\beta$  ve PR'ünün hem sitoplazmada hem de çekirdekte lokalize olduğu ve ayrıca PR'nün hücre membranında da lokalize olduğu saptanmıştır. ER'ünün subsellüler lokalizasyonlarının, ER'ünün nüklear translokasyonunu indükleyen fosforilasyon gibi post-translasyonel mekanizmalar tarafından düzenlendiği rapor edilmiştir. Aynı zamanda belirli ER izoformlarındaki bir nüklear lokalizasyon sinyal sekanslarının eksikliği (Herynk ve Fuqua 2004) ve ER-spesifik represor proteinlerle etkileşim, ER proteinlerinin sitoplazmik lokalizasyonunu belirlediği gösterilmiştir. Sitoplazmik ER'ünün oluşumu diğer hücrel kompartmanlara yer değiştirme seyrinde

olan reseptör havuzunu göstermektedir (Heldring ve ark. 2007).

Yapılan çalışmalarda insanlarda lakrimal bezlerin modifiye tükürük bezleri olduğu ifade edilmektedir. Morfolojik olarak lakrimal bezler ve tükürük bezleri birbirine benzer olmasına rağmen, pars inisyalis ve pars sekretorya tükürük bezlerinde identifiye edilirken, lakrimal bezde bu iki kanal tanımlanmamıştır. İmmunohistokimyasal olarak bazı minor farklılıklarla birlikte lakrimal bezlerde intralobuler ve interlobuler kanallardan bahsedilmektedir (Iwamoto ve Jakobiec 1985). Sunulan çalışmada ER $\alpha$ , ER $\beta$  ve PR immunreaktivitesi sıçanların intraorbital ve ekstraorbital bezlerinin akıtıcı kanal epitelinde incelenmiş olup bu akıtıcı kanallarının sınıflandırılması yapılmamıştır. Reaksiyon tek bir akıtıcı kanal başlığı altında incelenmiştir. Dolayısıyla bu çalışmaya göre ekstraorbital bezlerinin akıtıcı kanal epitel hücrelerinin sitoplazmasındaki ER $\beta$  immunreaktivitesi çekirdeğe oranla daha fazla iken, PR immunreaktivitesinin hem sitoplazmada hem de çekirdekte kuvvetli olduğu ve ER $\alpha$  immunreaktivitesinin ise her iki kompartmanda orta dereceli olduğu tespit edilmiştir. İntraorbital bezde ise ER $\alpha$  immunreaktivitesi en çok kanal epitel hücrelerinin çekirdeğinde rastlanırken, ER $\beta$  immunreaktivitesi sitoplazmada saptanmıştır. PR immunreaktivitesinin ise hem sitoplazmada hem de çekirdekte orta dereceli olduğu belirlenmiştir. Tsinti ve ark (2009) insanların tükürük bezlerinde yer alan bütün akıtıcı kanal (pars inisyalis, pars sekretorya, pars ekskretorya) epitel hücrelerinin hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde ER $\alpha$ , ER $\beta$ 1 ve ER $\beta$ 2 immunreaktivitesine rastlandığını ve kanallar arasında ER'nin immunreaktivite yoğunluğu açısından hiç bir farklılık olmadığını ifade etmiştir. Ancak insanların tükürük bezinde yapılan başka bir çalışmada ER $\beta$  proteini eksprese edilirken, ER $\alpha$  proteinine rastlanmamıştır (Valimaa ve ark. 2004). İnsanların tükürük bezinde ER $\alpha$  saptayamayan çalışmaya zıt olarak sıçanların her iki lakrimal bezinde ER $\alpha$  immunreaktivitesi tespit edilmiştir. Dolayısıyla dişi tavşanlarda ER ile  $\beta$ -adrenerjik ve muskarinik kolinerjik reseptörlerinin sayısı arasında bağlantı olduğunu ve böylelikle lakrimal bez fonksiyonunun etkilendiğini tespit eden çalışmaya (Huang ve ark. 1995) benzer olarak sıçanların lakrimal bezi üzerinde de östrojen reseptörlerinin böyle bir etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir.

Hadeyama ve ark (2002) ER $\alpha$  immunreaktivitesinin kornea epiteli ve stroma hücrelerinde, ER $\beta$  ve PR immunreaktivitesinin ise kornea epiteli, stroma ve endotel hücrelerinde lokalize olduğunu tespit etmiştir. Bu çalışmada sıçanların her iki lakrimal bezinin salgı epiteli, akıtıcı kanal epiteli, miyoepitel ve intersitisyel bağ dokuda yer alan stromal hücrelerinde ER $\alpha$ , ER $\beta$  ve PR immunreaktivitesine, aynı zamanda kan damarlarının etrafında yer alan mast hücrelerinde ER $\beta$  immunreaktivitesine rastlanmıştır. Dolayısıyla

lakrimal bezin epitel ve stromal hücrelerinde bu seks steroid hormon reseptörlerinin tespit edilmesi östrojenin, lakrimal bezde yer alan asiner hücrelerin fonksiyonunu ve yapısını sürdürmek için lakrimal intersitisyel hücreler üzerinde direkt etkiye sahip olduğunu ifade etmektedir. Bu durum meme bezinde olduğu gibi stromal ER'nin östrojen bağımlı epiteliyal proliferasyonda önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Cooke ve ark. 1998).

Sunulan çalışmada ayrıca intraorbital ve ekstraorbital lakrimal bezde yer alan endotel hücrelerinin çekirdeğindeki ER $\alpha$  immunreaksiyonu sitoplazmaya oranla daha fazla iken, ER $\beta$  immunreaksiyonunun sitoplazmada daha yoğun olduğu tespit edilmiştir. PR immunreaktivitesinin ise her iki bezde yer alan endotel hücrelerinin hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde orta dereceli olduğu saptanmıştır. Stefano ve ark (2000) östrojenin fizyolojik dozajının hücre yüzey östrojen reseptörünün aktivasyonu ve artan intrasellüler kalsiyum konsantrasyonu ile birlikte insan endotel hücrelerden nitrik oksit serbest bırakılmasını stimüle ettiğini rapor etmiştir. Yanagiya ve ark (1997) tavşan korneasında nitrik oksit kornea endoteli tarafından üretildiğini ve nitrik oksit/siklik GMP yolağının kornea kalınlığını devam ettirmek için gerekli olduğunu ve dolayısıyla östrojenin kornea üzerinde indirekt etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada sıçanların ekstraorbital ve intraorbital lakrimal bezinde yer alan endotel hücrelerinde ER $\alpha$ , ER $\beta$  ve PR immunreaksiyonunun tespit edilmesi, lakrimal bezde de endotel hücrelerinin östrojen ve progesteron hormonlarının hedefinde olduğunu ve bu hormonlarının etkisiyle endotel hücrelerinden nitrik oksit serbest bırakılmasını indüklediği tahmin edilmektedir.

Göze ait dokular üzerinde yapılan çalışmalarda ER ve PR'nin immunlokalizasyon ve ekspresyonlarının yaşa ve cinsiyete bağlı olarak değiştiği ifade edilmiştir. Bu çalışmalara göre; Gligorijević ve ark (2011) insanların lakrimal bezlerinin asiner hücrelerinde ER ve PR ekspresyonunun yaşa ve cinsiyete bağlı olarak değiştiğini ve incelenen bu her iki reseptöründe bütün dişilerde rastlanırken, erkeklerin sadece %20'sinde saptandığı bildirilmiştir. Aynı zamanda Abdo ve ark (2009) ER'nin daima dişi sıçanların lakrimal bezinde bulunduğunu, erkek sıçanlarda ilk üç aydan sonra lakrimal bezlerinde PCR yöntemiyle ER'yi saptayamadığını ifade etmiştir. Wickham ve ark (2000) insan, tavşan ve sıçanların çeşitli oküler dokularında bu steroid hormon reseptörlerinin cinsiyet ve doku-spesifik farklılıklar içerdiğini ve buna göre; dişilerin retina/uvea örneklerinde ER ve PR mRNA'ları sırasıyla %50 ve %33.3 oranında bulunurken, erkek ve dişi sıçanların lensinde PR mRNA'ya rastlanmadığı bildirilmiştir. Genç dişi gözlerinin retina ve retinal pigment epitelinde ER $\alpha$  ekspresyonunda cinsiyet ve yaşa bağlı farklılıklar saptanırken, erkeklerde ve postmenopoz dönemi

dişilerde göz dokusunda bu reseptörler saptanmamıştır (Ogueta ve ark. 1999). Dolayısıyla şimdiye kadar göze ait dokular üzerinde seks steroid hormon reseptörlerinin lokalizasyonunun yaşa ve cinsiyete göre değiştiğini ifade eden çalışmalara zıt olarak Spelsberg ve ark (2004) insanların konjunktiva, lakrimal bez ve tarsal plak gibi göze ait dokularında ne ER $\alpha$  ve ER $\beta$  mRNA ekspresyonu açısından ne de ER $\alpha$  immunreaktivitesi açısından yaşa ve cinsiyete bağlı farklılıkların istatistiksel açıdan önemli olmadığını ifade etmiştir. Aynı zamanda önceki çalışmalarda ER ve PR'nin erkeklerden ziyade kadınlarda daha fazla oranda bulunduğunu ve incelenen her iki reseptördende ER'nin PR den daha fazla oranda eksprese olduğu rapor edilmiştir. Sunulan çalışmada ise dişilerde hormonal dalgalanmadan dolayı (menstrual siklus, gebelik, menopoz) sadece erişkin erkek sıçanların lakrimal bezinde ER $\alpha$ , ER $\beta$  ve PR immunlokalizasyonları semikantitatif olarak değerlendirilmiş ve erkekler ile dişiler arasında herhangi bir kıyaslama yapılmamıştır.

## SONUÇ

Sunulan bu çalışmada erkek sıçanların intraorbital ve ekstraorbital lakrimal bezlerinin salgı epiteli, akıtıcı kanal epiteli, miyoepitel ve kan damarlarının endotel hücrelerinde değişen derecelerde ER $\alpha$ , ER $\beta$  ve PR immunlokalizasyonları incelenmiştir. Elde edilen veriler semikantitatif immunohistokimyasal analizler ile sınırlı olduğundan ve bu reseptörlerin sadece erkek sıçanların lakrimal bezlerinde incelendiğinden bu reseptörlerin görevlerinin tam olarak anlaşılabilmesi için farklı deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak, sıçanların hem intraorbital hem de ekstraorbital lakrimal bezlerinin bütün yapısal komponentlerinde ER $\alpha$ , ER $\beta$  ve PR immunreaktivitesinin tespit edilmesi erkeklerde de lakrimal dokunun östrojen ve progesteron hormonları için hedef organ olduğu hipotezini desteklemektedir.

## KAYNAKLAR

- Abdo FK, EL-Gammal AA, Abdel Fattah EA, Abdel-Haleim MR.** The role of hormone replacement therapy on structural integrity of lacrimal gland in ovariectomized albino rats (histological and immunohistochemical study). *Egypt J Histol.* 2009; 32: 66-80.
- Azzarolo AM, Eihausen H, Schechter J.** Estrogen prevention of lacrimal gland cell death and lymphocytic infiltration. *Exp Eye Res.* 2003; 77: 347-354.
- Brann DW, Hendry LB, Mahesh VB.** Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1995; 52: 113-133.

- Brown NM, Lamartiniere CA.** Genistein regulation of transforming growth factor- $\alpha$ , epidermal growth factor (EGF), and EGF Receptor expression in the rat uterus and vagina. *Cell Growth Differ.* 2000; 11: 255-260.
- Camacho-Arroyo I, Cerbón MA, Gamboa-Domínguez A, González-Agüero G, González-Mariscal G.** Immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptors in the rabbit submandibular gland. *Comp Biochem Physiol A.* 1999; 123: 179-186.
- Cooke PS, Buchanan DL, Lubahn DB, Cunha GR.** Mechanism of estrogen action: Lessons from the estrogen receptor- $\alpha$  knockout mouse. *Biol Reprod.* 1998; 59: 470-475.
- Esmali B, Harvey JT, Hewlett B.** Immunohistochemical evidence for estrogen receptors in meibomian glands. *Ophthalmology* 2000; 107: 180-184.
- Fuchsjäger-Mayrl G, Nepp J, Schneeberger C, Sator M, Dietrich W, Wedrich A, Huber J, Tschugguel W.** Identification of estrogen and progesterone receptor mRNA expression in the conjunctiva of premenopausal woman. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43: 2841-2844.
- Gans LA, Lee SF, Lemp MA, Pepose JS.** Estrogen and progesterone receptors and human conjunctiva. *Am J Ophthalmol.* 1990; 109: 474-477.
- Gligorijević J, Krstić M, Babić G.** Immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptors in the human lacrimal gland. *Arch Biol Sci Belgrade.* 2011; 63: 319-324.
- Gupta PD, Johar K Sr, Nagpal K, Vasavada AR.** Sex hormone receptors in the human eye. *Surv Ophthalmol* 2005; 50: 274-284.
- Hadeyama T, Nakayasu K, Ha NT, Nakamura S.** Expression of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , androgen receptors and progesterone receptors in human cornea. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi.* 2002; 106: 557-564.
- Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA.** Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* 2007; 87: 905-931.
- Herynk MH, Fuqua SA.** Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Rev.* 2004; 25: 869-898.
- Hewitt SC, Deroo BJ, Korach KS.** Signal transduction: a new mediator for an old hormone? *Science* 2005; 307: 1572-1573.
- Huang ZM, Azzarolo AM, Mircheff AK, Esrail R, Grayson G, Heller K, et al.** Does estrogen directly affect lacrimal gland function? *ARVO Abstract, Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36: S2979
- Iwamoto T, Jakobiec FA.** Lacrimal glands. In: Duane TD, Jaeger EA, eds. *Biomedical foundation of ophthalmology.* Vol 1. Revised ed. Philadelphia, Harper & Row, 1985; 30, 1.
- Krawczuk-Hermanowiczowa O.** Effects of sexual glands on the lacrimal gland. II. Changes in rat lacrimal glands after castration. *Klin Oczna* 1983; 85: 15-17.
- Lauria A, Porcelli F.** Leucine aminopeptidase (LAP) activity and sexual dimorphism in rat exorbital gland. *Basic Appl Histochem* 1979; 23: 171-177.
- Luetjens CM, Didolkar A, Kliesch S, Paulus W, Jeibmann A, Böcker W, Nieschlag E, Simoni M.** Tissue expression of the nuclear progesterone receptor in male non-human primates and men. *J Endocrinol.* 2006; 189: 529-539.
- Munaut C, Lambert V, Noël A, Frankenne F, Deprez M, Foidart JM, Rakic JM.** Presence of oestrogen receptor type  $\beta$  in human retina. *Br J Ophthalmol.* 2001; 85: 877-882.
- Ogueta SB, Schwartz SD, Yamashita CK, Farber DB.** Estrogen receptor in the human eye: influence of gender and age on gene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40: 1906-1911.
- Pavao M, Traish AM.** Estrogen receptor antibodies: specificity and utility in detection, localization and analyses of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ . Review article. *Steroids.* 2001; 66: 1-16.
- Ranganathan V, De PK.** Androgens and estrogens markedly inhibit expression of a 20 kDa major protein in hamster exorbital lacrimal gland. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 208: 412-417.
- Schaumberg DA, Buring JE, Sullivan DA, Dana MR.** Hormone replacement therapy and dry eye syndrome. *JAMA.* 2001; 286: 2114-2119.
- Singh S, Shaul PW, Gupta PD.** Conventional estrogen receptors are found in the plasma membrane of vaginal epithelial cells of the rat. *Steroids.* 2002; 67: 757-764.
- Spelsberg H, Klueppel M, Reinhard T, Glaeser M, Niederacher D, Beckmann MW, Sundmacher R.** Detection of Oestrogen receptors (ER)  $\alpha$  and  $\beta$  in conjunctiva, lacrimal gland, and tarsal plates. *Eye.* 2004; 18: 729-733.
- Stefano GB, Prevot V, Beauvillain JC, Cadet P, Fimiani C, Welters I, Fricchione GL, Breton C, Lassalle P, Salzet M, Bilfinger TV.** Cell-surface estrogen receptors mediate calcium-dependent nitric oxide release in human endothelia. *Circulation* 2000; 101: 1594-1597.

- Sullivan DA, Bloch KJ, Allansmith MR.** Hormonal influence on the secretory immune system of the eye: androgen regulation of secretory component levels in rat tears. *J Immunol.* 1984; 132: 1130-1135.
- Sullivan DA, Edwards JA, Wickham LA, Pena JD, Gao J, Ono M, Kelleher RS.** Identification and endocrine control of sex steroid binding sites in the lacrimal gland. *Curr Eye Res.* 1996; 15: 279-291
- Suzuki T, Kinoshita Y, Tachibana M, Matsushima Y, Kobayashi Y, Adachi W, Sotozono C, Kinoshita S.** Expression of sex steroid hormone receptors in human cornea. *Curr Eye Res.* 2001; 22: 28-33.
- Suzuki T, Schirra F, Richards SM, Trister NS, Lombardi MJ, Rowley P, Jensen RV, Sullivan DA.** Estrogen's and progesterone's impact on gene expression in the mouse lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47: 158-168.
- Tachibana M, Kasukabe T, Kobayashi Y, Suzuki T, Kinoshita S, matsushima Y.** Expression of estrogen receptor alpha and beta in the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41: 668-670.
- Tisinti M, Kassi E, Korkolopoulou P, Kapsogeorgou E, Moutsatsou P, Patsouris E, Manoussakis MN.** Function estrogen receptors alpha and beta are expressed in normal human salivary gland epithelium and apparently mediate immunomodulatory effects. *Eur J Oral Sci.* 2009; 117: 498-505.
- Tsai M-J, O'Malley BW.** Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann Rev Biochem.* 1994; 63: 451-486.
- Valimaa H, Savolainen S, Soukka T, Silvoniemi P, Makela S, Kujari H, Gustafsson JA, Laine M.** Estrogen receptor-beta is the predominant estrogen receptor subtype in human oral epithelium and salivary glands. *J Endocrinol.* 2004; 180: 55-62.
- Vegeto E, Shanbaz MM, Wen DX, Golman ME, O'Malley BW, McDonnell DP.** Human progesterone receptor A form is a cell and promoter specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol.* 1993; 7: 1244-1255.
- Véscei PV, Kircher K, Kaminski S, Nagel G, Breitenecker G, Kohberger PD.** Immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptor in human cornea. *Maturitas.* 2000; 36: 169-172.
- Wickham LA, Gao J, Toda I, Rocha EM, Ono M, Sullivan DA.** Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNAs in the eye. *Acta Ophthalmol Scand.* 2000; 78: 146-153.
- Wickham LA, Rocha EM, Gao J, Krenzer KL, da Silveira LA, Toda I, Sullivan DA.** Identification and hormonal control of sex steroid receptors in the eye. *Adv Exp Med.* 1998; 438: 95-100.
- Yanagiya N, Akiba J, Kado M, Yoshida A, Kono T, Iwamoto J.** Transient corneal edema induced by nitric oxide synthase inhibition. *Nitric Oxide.* 1997; 1: 397-403.

## Combination of Cysteamine and Lipoic Acid Improves the Post-Thawed Bull Sperm Parameters

Şükrü GÜNGÖR<sup>1</sup>, Adil AKSOY<sup>2</sup>, Deniz YENİ<sup>3</sup>, Fatih AVDATEK<sup>3</sup>, Caner ÖZTÜRK<sup>4</sup>, Mehmet BOZKURT ATAMAN<sup>5</sup>, Kenan COYAN<sup>6</sup>, Mustafa Numan BUCAK<sup>5</sup>, Nuri BAŞPINAR<sup>7</sup>, Pınar PEKER AKALIN<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Reproduction and Artificial Insemination, Burdur/TURKEY

<sup>2</sup>Republic of Turkey, Prime Ministry, Ankara/TURKEY

<sup>3</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Reproduction and Artificial Insemination, Afyon/TURKEY

<sup>4</sup>Aksaray University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Reproduction and Artificial Insemination, Aksaray/TURKEY

<sup>5</sup>Selçuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Reproduction and Artificial Insemination, Konya/TURKEY

<sup>6</sup>Pamukkale University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Denizli/TURKEY

<sup>7</sup>Selçuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Konya/TURKEY

<sup>8</sup>Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Hatay/TURKEY

Corresponding author e-mail: sukругungor@mehmetakif.edu.tr

### ABSTRACT

The present study was conducted to examine the protective roles of cysteamine, trehalose, alpha-lipoic acid and combinations of these antioxidants on post-thawed bull sperm and oxidative stress parameters. Five healthy Holstein bull (3-4 years old) were used. Eight ejaculates for each bull were collected and pooled. Pooled ejaculate, splitted into seven equal aliquots and diluted at 37 °C with base extenders containing cysteamine 2 mM, trehalose 50 mM, alpha-lipoic acid (ALA) 1 mM, cysteamine 2 mM + trehalose 50 mM, ALA 1 mM + trehalose 50 mM, cysteamine 2 mM + ALA 1 mM and no antioxidant (control), was cooled to 5 °C and then frozen. Frozen straws were thawed in a water bath for evaluation. The combination of cysteamine 2 mM and ALA 1 mM of the semen extender improved the percentages of post-thawed subjective motility ( $68 \pm 2.7\%$ ), and progressive motility ( $42.9 \pm 4.7\%$ ), compared with the controls ( $61 \pm 4.2\%$  and  $37.5 \pm 8\%$ , respectively, non-significantly,  $P > 0.05$ ). The supplementation of the semen extender with combination of cysteamine 2 mM and ALA 1 mM produced a higher acrosome integrity and mitochondrial activity ( $52.02 \pm 6.4\%$  and  $32 \pm 4.1\%$ , respectively), compared with the controls ( $30.5 \pm 1.7$  and  $14.02 \pm 3.5\%$  respectively,  $P < 0.05$ ). Combination of cysteamine and ALA antioxidants in semen extenders provided the benefit in terms of sperm motilities, acrosome integrity and mitochondrial activity on frozen-thawed bull sperm

**Key Words:** Alpha Lipoic Acid, Bull Sperm, Cysteamine, Fluorescent Staining, Trehalose

## Sisteamin ve Alfa Lipoik Asit Kombinasyonunun Dondurulmuş-Çözdürülmüş Boğa Spermisi Parametreleri Üzerine Etkisi

### ÖZ

Sunulan çalışmada sisteamin, trehaloz, alfa-lipoik asit ve bu antioksidan kombinasyonlarının, çözüm sonu boğa spermisinde spermatolojik ve oksidatif stres parametreleri üzerine koruyucu etkinliklerinin belirlenmesi amaçlandı. Beş adet sağlıklı holştayn (3-4 yaşlarında) ırkı boğa kullanıldı. Çalışmada kullanılan her boğadan 8 ejakülât alındı. Alınan ejakülâtlar miks yapılarak 37 °C'de 7 eşit hacme bölündükten sonra, sisteamin 2 mM, trehaloz 50 mM, alfa-lipoik asit (ALA) 1 mM, sisteamin 2 mM + trehaloz 50 mM, ALA 1 mM + trehaloz 50 mM, sisteamin 2 mM + ALA 1 mM ve antioksidan içermeyen (kontrol) temel sulandırıcı ile sulandırılarak 5 °C'de soğutulmasının ardından donduruldu. Dondurulan payetler su banyosunda çözülerek değerlendirildi. Sisteamin 2 mM + ALA 1 mM kombinasyonunu içeren sperma sulandırıcısının çözüm sonu subjektif (%  $68 \pm 2.7$ ) ve progresif motilite (%  $42.9 \pm 4.7$ ) oranları üzerine kontrol gruplarına kıyasla (%  $61 \pm 4.2$  ve %  $37.5 \pm 8$ ) olumlu etkinliği gözlenirken istatistiksel olarak fark önemsiz bulundu ( $P > 0.05$ ). Sisteamin 2 mM + ALA 1 mM kombinasyonu içeren sperma sulandırıcı grubu akrozom bütünlüğü ve mitokondriyal aktivite oranları (%  $52.02 \pm 6.4$  ve %  $32 \pm 4.1$ ) kontrol gruplarına (%  $30.5 \pm 1.7$  ve %  $14.02 \pm 3.5$ ) göre istatistiksel olarak daha yüksek bulundu ( $P < 0.05$ ). Dondurulmuş çözülürmüş boğa sperma sulandırıcılarına eklenen sisteamin ve ALA kombinasyonu spermatozoon motilitesine, akrozom bütünlüğüne ve mitokondriyal aktivite bütünlüğüne katkı sağladı.

**Anahtar Kelimeler:** Alfa Lipoik Asit, Boğa Spermisi, Sisteamin, Floresan Boyama, Trehaloz

To cite this article: GÜNGÖR Ş, AKSOY A, YENİ D, AVDATEK F, ÖZTÜRK C, ATAMAN MB, COYAN K, BUCAK MN, BAŞPINAR N, AKALIN PP. Combination of cysteamine and lipoic acid improves the post-thawed bull sperm parameters. *Kocatepe Vet J*. 2016; 9(2):88-96.

## INTRODUCTION

Bull sperm cryopreservation has been widely used as an important instrument of the livestock industry, particularly in a relation to the dispersion of genetic material and the banking of genomic growths to retain superior transgenic lines (Bucak et al., 2010). In the bovine dairy industry, artificial insemination (AI) is the method used worldwide to manage reproduction (Vishwanath, 2000). It has been predicted that 95% of the total artificial insemination doses are frozen (Thibier and Wagner, 2002).

The quality of frozen semen has an impact on conception rates. Frozen semen quality is bound up with the semen extender (El-Sheshtawy et al., 2015). Mammalian sperm cells contains highly specific lipid composition, namely high content of polyunsaturated fatty acids. This unconventional structure of sperm membrane is responsible for its flexibility and the functional skills. However, spermatozoa's lipids are the main substrates for peroxidation, that may threat sperm survival. This pathological peroxidation of lipids makes sperm membranes unstable during oxidative stress (Sanocka and Kurpisz 2004). Cryopreservation provokes damage to spermatozoa that may end up with the loss of motility, viability, plasma membrane integrity, fertilizing capacity and causation of sperm apoptosis (Aitken et al 1998; Vishwanath 2000; Medeiros et al., 2002). Oxidative stress can also induce DNA fragmentation in the spermatozoa (Aitken et al. 2009) and artificially created oxidative stress can induce DNA damage (Aitken et al 1998). Sperm extender composition could induce reduction of the oxygen levels that may result formation of reactive oxygen species (ROS) can lead to oxidative stress. Balaban et al (2005) were stressed that ROS also formed during normal oxidative metabolism in the cell due to an imbalance of intracellular redox potential. Uncontrolled ROS levels could stir up sperm cell substrates by lipid peroxidation, protein modification, and DNA damage resulting in impaired cell function and subsequently can affect sperm survival. But also, an adequate physiological level of ROS is required for fertilization (De Lamirande et al 1997) and apoptosis (Merton et al. 2013).

Sperm cryopreservation techniques cause cold shock, ice crystal formation, osmotic changes, oxidative stress that may end up with cell damage (Watson, 1995; Bailey et al 2000).

Cysteamine induces the uptake of cysteine by cells thereby enhancing the GSH synthesis. As a result of this cycle, cysteamine has vital role in the defense mechanism against ROS (Merton et al., 2013). Bovine, ovine, pig, hamster and buffalo embryo development studies emphasized that cysteamine decreased hydrogen peroxide levels (de Matos et al., 2002; Grupen et al., 1995, Kito and Bavister, 1997,

Gasparrini et al. 2003). Bucak et al., (2009) also reported that cysteamine enhanced motility and elevated the antioxidant capacity of post-thawed ram sperm.

Osmotic balance of sperm diluents is critical to reduce intracellular ice crystal formation. Sperm extenders mostly include sugars like sucrose, raffinose and trehalose for cryoprotection (Garde et al 2008).

Trehalose is a non-penetrating disaccharide, which has a protective role on cells both by increasing the tonicity of the extender and by stabilizing the plasma membrane. Trehalose binds to membrane phospholipid bilayer due to specific interactions with head groups of membrane phospholipids leading to more stable membrane against freeze-induced damage (Crowe et al 1987, Aboagla and Terada, 2003). This positive effect of trehalose was mentioned in many studies established in ram (Bucak and Tekin 2007; Tonieto et al 2010), goat (Khalili et al 2009; Aboagla and Terada, 2003) and bull (Woelders 1997; El-Sheshtawy et al 2015).

Alpha-Lipoic acid (ALA; 1,2-dithiolane-3-pentanoic acid), which plays an important role in mitochondrial dehydrogenase reactions, was found in all types of prokaryotic and eukaryotic cells and is a naturally occurring nutraceutical, whose therapeutic act has been contributed to its antioxidant activity and its ability to fix oxidative injury (Biewenga et al 1997). Alpha-Lipoic acid is characterized by its high reactivity towards free radicals and its ability to increase tissue levels of reduced glutathione and to reduce formation of lipid peroxides (LPOs), consequently restoring ability of normal antioxidant enzymes profile (El-Beshbishy et al 2011). Alpha-Lipoic acid had a protective role against lipopolysaccharide-induced oxidative stress in adult rat Sertoli cells, *in vitro* (Aly et al 2009). Also, pretreatment with ALA protected the structural integrity of erythrocyte cell membrane components that were exposed to oxidative damage by gamma radiation (Desouky et al 2011).

The aim of this study was to determine the effects of cysteamine, trehalose, ALA and combinations of these antioxidants on sperm motility, sperm motion parameters VAP (average path velocity,  $1 \mu\text{m s}^{-1}$ ), VSL (straight linear velocity,  $1 \mu\text{m s}^{-1}$ ), VCL (curvilinear velocity,  $1 \mu\text{m s}^{-1}$ ), ALH (amplitude of lateral head displacement,  $1 \mu\text{m}$ ) and LIN (linearity index ( $\text{LIN} = (\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100$ ), viability, acrosome integrity, mitochondrial activity, lipid peroxidation (LPO) and antioxidant potential (AOP) levels in bull semen.

## MATERIALS and METHODS

### Animals and semen collection

Five healthy Holstein bulls (3–4 years of age) housed at a private dairy farm in Konya and maintained with

standard feeding and management practices were used. Ejaculates were collected twice a week with the aid of an artificial vagina. A total number of 40 ejaculates (8 ejaculates from each bull) were collected. Sperm motility was estimated subjectively using phase-contrast microscopy with a warm stage maintained at 37°C at 400× magnification. Only ejaculates having ≥80% sperm motility and concentrations higher than 800 × 10<sup>6</sup> spermatozoa/ml were cryopreserved. After collection, the ejaculates were immersed in a warm water bath at 34°C. The ejaculates were mixed in a pool for balancing the sperm contribution of each bull.

### **Semen processing**

The volume of ejaculates was measured in a conical tube graduated at 0.1 ml intervals and sperm concentration was determined by means of an Accucell photometer (IMV, L'Aigle, France). Sperm motility was estimated using phase-contrast microscopy (200×). A Tris-based extender (Tris 254 mM, citric acid 78 mM, fructose 70 mM, egg yolk 15% (v/v), glycerol 6% (v/v), pH 6.8) was used as the base extender (cryopreservation diluent). Each ejaculate was split into seven equal experimental groups and diluted to a final concentration of 60 × 10<sup>6</sup>/ml spermatozoa with the base extender containing cysteamine 2 mM, trehalose 50 mM, alpha-lipoic acid (ALA) 1 mM, cysteamine 2 mM + trehalose 50 mM, ALA 1 mM + trehalose 50 mM, cysteamine 2 mM + ALA 1 mM and no antioxidant (control), was cooled to 5 °C and then frozen. Diluted semen samples were loaded into 0.25-ml French straws and cooled down to 4 °C in 2 h, frozen at a programmed rate of -3 °C/min from +4 to -10 °C; -40 °C/min from -10 to -100 °C; -20 °C/min from -100 to -140 °C in a digital freezing machine (Digitcool 5300 ZB 250, IMV, France). Thereafter, the straws were plunged into liquid nitrogen. The study was replicated nine times. At least after 24 h, frozen straws were thawed in a 37 °C water bath for 20 s immediately before use.

### **Evaluation of microscopic sperm parameters**

To analyse sperm motility and various kinematic parameters, Sperm Class Analyzer (SCA®) CASA system (Microptic S.L., Barcelona, Spain) was used. A 5µl sample of diluted semen was put onto a pre-warmed slide covered with a coverslip and sperm motility characteristics were determined with a 10<sup>9</sup> objective at 37 °C. The following motility values were recorded: progressive motility (%), VAP, VSL, VCL, ALH and LIN. For each evaluation, seven microscopic fields, each including at least 250 cells, were analysed.

### **Assessment of sperm acrosome integrity**

Sperm acrosome status was assessed using fluorescein isothiocyanate conjugated to Arachis hypogaea (peanut) (L7381 FITC-PNA, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) and by PI staining

as described by Nagy et al. (2003) with modifications. 120 µg of FITC-PNA was added to 1 ml of PBS for the preparation of the staining solution, and then divided into equal aliquots (100 µl) after being filtered and stored at -20 °C. Thawed straws were diluted 1:3 with Tris stock solution without glycerol and egg yolk, and then 60 µl of the diluted semen was mixed with 10 µl of FITC-PNA and 2.5 µl of PI. The sample was gently mixed, incubated at 37 °C in the dark for 20 min and added 10 µl of Hancock's solution (Schafer and Holzmann, 2000) for semen fixation. A wet mount was made using a 2.5 µl drop of the sample placed directly onto a microscope slide and covered with a cover slip. At least 200 sperm cells per sample were examined at 400x magnification under a fluorescence microscope (Leica DM 3000 Microsystems GmbH, Ernst-Leitz-Straße, Wetzlar, Germany; excitation at 450–490 nm, emission at 520 nm) to assess sperm acrosome integrity. Spermatozoa displaying bright green or patchy green fluorescence were considered as acrosome nonintact or damaged, whereas cells which did not display green fluorescence in the acrosome cap were regarded as acrosome intact.

### **Assessment of sperm mitochondrial activity**

Sperm mitochondrial activity was assessed with a staining protocol modified from Garner et al. (1997). A stock solution of 5,5,0, 6,6,0-tetrachloro-1,10, 3,3,0 tetraethyl-benzimidazolylcarbocyanine iodide (1.53 mM) (T3168 JC-1, Invitrogen) was prepared in DMSO, divided into equal aliquots (100 µl) after being filtered and then stored at -20 °C. Thawed straws were diluted 1:3 with Tris stock solution without glycerol and egg yolk, and then 300 µl of the diluted semen was mixed with 2.5 µl JC-1 and 2.5 µl PI. The sample was gently mixed, incubated at 37 °C in the dark for 20 min and was added 10 µl of Hancock's solution (Schafer and Holzmann, 2000) for semen fixation. A wet mount was made using a 2.5 µl drop of the sample placed directly onto a microscope slide and covered by a cover slip. At least 200 sperm cells per sample were examined at 400 x magnification under a fluorescence microscope (Leica DM 3000; excitation at 450–490 nm, emission at 520 nm) to assess mitochondrial activity. A high level of yellow/orange fluorescence associated with the sperm midpiece (where the mitochondria are located) indicated high mitochondrial activity. Mitochondria with low activity stained green.

### **Oxidative stress parameters**

Briefly, thawed semen samples were centrifuged at 800g for 20 min at 4 °C to separate the cells from the diluted seminal plasma, and then spermatozoa were washed twice with PBS at 800g for 20 min. After centrifugation, the supernatant was discarded, and the pellet was completed to 500 µl with PBS. Subsequently, the sperm suspension was transferred into a 2 ml beaker filled with ice water and sonicated



with a probe (Bandelin Sonopuls, Bandelin Electronic Heinrichstraße, D-12207, Geräte-Typ: UW 2070, Pro-Nr. 51900037369.004, Berlin, Germany) for 10 s on ice repeated six times at intervals of 30 s to separate the sperm head and tail. For LPO analysis, 10 µl of 0.5 mM BHT (butylhydroxytoluene) was added into 120 µl of the homogenate samples and stored at -86 °C until analysis. The remaining homogenate was centrifuged at 8000g for 15 min at +4 °C, and the supernatant was collected and stored at -86 °C for AOP analysis.

#### **Determination of lipid peroxidation level**

Lipid peroxidation level was determined using commercial kits of LPO 586™ Oxis Research (OxisResearch™, Bioxytech, CA, 92202, USA) by spectrophotometry (UV 2100 UV-VIS Recording Spectrophotometer Shimadzu, Japan). The assay is based on the reaction of a chromogenic reagent, N-methyl-2-phenylindole with MDA and 4-hydroxyalkenals (LPO) at 45 °C. One molecule of either MDA or 4-hydroxyalkenal reacts with two molecules of N-methyl-2-phenylindole in acetonitrile, to yield a stable chromophore with maximal absorbance at 586 nm. The results are expressed as µmol for 10<sup>9</sup> cells ml<sup>-1</sup>.

#### **Determination of Total Antioxidant Potential**

Antioxidant potential was determined with an AOP-490™ Oxis Research kit (OxisResearch™, Bioxytech, CA, 92202, USA) by spectrophotometry. The assay was based on the reduction of Cu<sup>++</sup> to Cu<sup>+</sup> by the combined action of all the antioxidants present in the sample. A chromogenic reagent, bathocuproine (2,9-dimethyl-4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline), selectively forms a 2:1 complex with Cu<sup>+</sup>, which has a maximum absorbance at 490 nm. A standard of known uric acid (a water-soluble antioxidant) concentration is used to create a calibration curve. The results are expressed as mmol for 10<sup>9</sup> cells ml<sup>-1</sup>.

#### **Statistical analysis**

Results were expressed as mean ± SEM. Sperm motility, motion characteristics, abnormality and oxidative stress parameters were analysed by analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test to determine significant differences between the groups. Differences with values of p < 0.05 were considered to be statistically significant. Statistical analyses were performed by using the SPSS 13 package program.

## **RESULTS**

The combination of cysteamine 2 mM and alpha-Lipoic acid 1 mM increased the percentages of post-thawed subjective motility (68 ± 2.7%), and progressive motility (42.9 ± 4.7%), compared with the controls (61 ± 4.2 and 37.5 ± 8%, respectively, with no significant differences p > 0.05) (Table 1). Significant differences were observed between the trehalose 50

mM and control groups for VSL (67.08 ± 14.2, 57.3 ± 6.8 µm/s) and LIN (58.16 ± 6.8, 49.38 ± 3.6 %) levels respectively, (p < 0.05). Combination of cysteamine 2 mM and alpha-Lipoic acid 1 mM provided a higher VCL (122.76 ± 7.9 µm/s) in comparison to the control group (105.24 ± 10.9 µm/s, p < 0.05) (Table 2). The combination of cysteamine 2 mM and alpha-lipoic acid 1 mM increased acrosome integrity and mitochondrial activity (52.02 ± 6.04 and 32 ± 4.1%, respectively), compared with those of the control group (30.5 ± 1.7 and 14.02 ± 3.5%, p < 0.05) (Table 3). Regarding biochemical assays, no significant difference was observed in LPO and AOP levels among groups (p > 0.05) (Table 4).

## **DISCUSSION**

Spermatozoa cryodamage caused by the cryopreservation procedure results in impaired fertility and decrease survival of spermatozoa in female reproductive system (Singh et al., 2012). Cryoinjury leads to ultrastructural damage on the plasma and acrosomal membranes by triggering the production of ROS (Salamon and Maxwell 1995). The antioxidants scavenge free radicals and improve sperm parameters (Bansal and Bilaspuri 2011; Gharagozloo and Aitken 2011). This study investigated the protective effects of the antioxidants cysteamine, trehalose, alpha-lipoic acid and combinations of these antioxidants against cryoinjury with the evaluation of sperm and oxidative stress parameters following freeze-thawing of bull semen. Trehalose acts like non-permeating cryoprotectant which causes dehydration of spermatozoa due to the osmotically driven flow of water. Due to this mild dehydration, spermatozoa have less intracellular water which results in reduced intracellular ice crystal formation consequently preventing spermatozoa from cryodamage (Chhillar et al 2012). In the present study, 50 mM trehalose did not show a significant (p > 0.05) increase in post-thaw sperm subjective and CASA progressive motilities, but it ameliorated mitochondrial activity and acrosome integrity compared to control group. These findings are similar with Cirit et al. (2013), but opposite from (Bucak and Tekin, 2007; Uysal et al, 2007; Gutierrez-Perez et al., 2009; Hu et al., 2010; Reddy et al., 2010; Singh et al., 2012, El-Sheshtway et al., 2015). The differences in the current study may be attributed to the different extender types, doses and cooling and freezing protocols.

Combination of Trehalose 50 mM and cysteamine 2 mM gave better LIN values of sperm characteristics compared to the controls. These findings were similar with Bhattacharyya et al. (2006). The studies showed that cysteamine conferred better cryoprotection on frozen ram sperm (Bucak and Tekin, 2007), and higher embryo development rates

when added into the maturation medium of goat oocytes (Rodriguez-Gonzalez et al., 2003). In this study, while cysteamine alone and combination with alpha-lipoic acid resulted in higher rates of motility, acrosome integrity and mitochondrial activity, it did not cause a significant difference on oxidative stress parameters. Beside this, cysteamine gave lower LPO and higher AOP levels compared the control. These findings are in agreement with the results of our previous study that was performed in ram semen (Bucak and Tekin, 2007; Bucak et al., 2009).

Alpha-lipoic acid is readily distributed and accumulates in several tissues where it is rapidly converted to its more potent antioxidant form dihydrolipoic acid (Packer et al., 1997). Because of its small size and high lipophilicity, it crosses biological membranes easily and quenches free radicals in both lipid and aqueous environments (Suzuki et al., 1991). Alpha lipoic acid also provided a cryoprotective effect on boar semen during the process of freezing-thawing (Shen et al. 2015), and during liquid storage (Pîndaru and Groza, 2015). Also Bucak et al., (2009) reported that, cysteamine enhanced motility and elevated the antioxidant capacity of post-thawed ram sperm. Cysteamine and ALA combination may improve antioxidant defence system via glutathione (GSH) synthesis. Cysteamine induces the uptake of

cysteine by cells thereby enhancing the GSH synthesis (Merton et al. 2013). Glutathione is the major cellular sulfhydryl compound that serves as both a nucleophile and an effective reductant by interacting with numerous electrophilic and oxidizing compounds. Aly et al. (2006) reported that, lipoic acid increased GSH levels on lipopolysaccharide-induced oxidative stress in adult rat Sertoli cells. The present study showed that ALA 1 mM improved the post-thaw subjective motility compared the control. It also gave better results with the combination of cysteamine on sperm motility parameters, sperm motion characteristics and florescant dye results. These findings are in good agreement with researchers; lipoic acid was reported to improve the semen quality and reduced the oxidative stress and DNA damage induced by cyclophosphamide in rats (Selvakumar et al., 2006).

acid increased GSH levels on lipopolysaccharide-induced oxidative stress in adult rat Sertoli cells.

In the present study, it is concluded that combination of cysteamine and alpha-lipoic acid provided a protective effect, by improving the spermatological parameters. The extenders including cysteamine and alpha-lipoic acid combination may be recommended to improve bull semen cryopreservation.

**Table 1:** Mean ( $\pm$ SEM) sperm motility in frozenthawed bull semen.

**Tablo 1:** Dondurulmuş-Çözdürülmüş Boğa Spermasında Ortalama ( $\pm$ SEM) Motilite Değerleri.

Groups	Subjectivemotility (%)	Progressivemotility %
Control	61 $\pm$ 4.2 <sup>abc</sup>	37.5 $\pm$ 8 <sup>a</sup>
Cysteamine 2mM	64 $\pm$ 5.4 <sup>bc</sup>	39.5 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>
LipoicAcid1mM	66 $\pm$ 4.1 <sup>c</sup>	35.4 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>
Trehalose 50mM	58 $\pm$ 5.7 <sup>ab</sup>	42.4 $\pm$ 7.7 <sup>a</sup>
Cysteamine 2mM + Trehalose 50mM	54 $\pm$ 6.5 <sup>a</sup>	38.7 $\pm$ 9.5 <sup>a</sup>
LipoicAcid1mM + Trehalose 50mM	64 $\pm$ 6.5 <sup>bc</sup>	40.5 $\pm$ 9 <sup>a</sup>
Cysteamine 2mM + LipoicAcid1mM	68 $\pm$ 2.7 <sup>c</sup>	42.9 $\pm$ 4.7 <sup>a</sup>
p	*	NS

NS: Not significant a, b ,c: Different superscripts within the same column demonstrate significant differences.

(\*p < 0.05).

**Table 2:** Mean ( $\pm$ SEM) CASA parameters in frozen–thawed bull semen.**Table 2:** Dondurulmuş-Çözdürülmüş Boğa Spermasında Ortalama ( $\pm$ SEM) CASA Parametreler

Groups	VAP	VSL	VCL	ALH	LIN
Control	77.36 $\pm$ 6.4 <sup>a</sup>	57.3 $\pm$ 6.8 <sup>ab</sup>	115.78 $\pm$ 7.1 <sup>ab</sup>	4.32 $\pm$ 0.2 <sup>bc</sup>	49.38 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>
Cysteamine 2mM	81.42 $\pm$ 4.9 <sup>a</sup>	61.48 $\pm$ 4.2 <sup>ab</sup>	123.22 $\pm$ 6 <sup>c</sup>	4.44 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	49.94 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>
LipoicAcid1mM	78.32 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	57.62 $\pm$ 6.3 <sup>ab</sup>	119.16 $\pm$ 5.3 <sup>c</sup>	4.56 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	48.36 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>
Trehalose 50mM	77 $\pm$ 7.1 <sup>a</sup>	67.08 $\pm$ 14.2 <sup>b</sup>	115.02 $\pm$ 16 <sup>ab</sup>	3.94 $\pm$ 0.5 <sup>ab</sup>	58.16 $\pm$ 6.8 <sup>b</sup>
Cysteamine 2mM + Trehalose 50mM	73.32 $\pm$ 7.3 <sup>a</sup>	58.38 $\pm$ 3.9 <sup>ab</sup>	105.24 $\pm$ 10.9 <sup>a</sup>	3.74 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	55.64 $\pm$ 2.4 <sup>b</sup>
LipoicAcid1mM + Trehalose 50mM	74.52 $\pm$ 6.4 <sup>a</sup>	55.9 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>	112.96 $\pm$ 8.9 <sup>ab</sup>	4.2 $\pm$ 0.3 <sup>bc</sup>	49.46 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
Cysteamine 2mM + LipoicAcid1mM	79.32 $\pm$ 5.2 <sup>a</sup>	60.5 $\pm$ 4.3 <sup>ab</sup>	122.76 $\pm$ 7.9 <sup>c</sup>	4.46 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	49.24 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>
p	NS	*	*	*	*

NS: Not significant a, b ,c: Different superscripts within the same column demonstrate significant differences. (\*p < 0.05).

**Table 3:** Mean ( $\pm$ SEM) Flourescent staining in frozen–thawed bull semen.**Table 3:** Dondurulmuş-Çözdürülmüş Boğa Spermasında Ortalama ( $\pm$ SEM) Floresan Boyama Değerleri.

Groups	Acrosome İntegrity(%)	High Mitochondrial Activity (%)
Control	30.5 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	14.02 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>
Cysteamine 2mM	34.58 $\pm$ 5.7 <sup>ab</sup>	19.26 $\pm$ 3.5 <sup>ab</sup>
LipoicAcid1mM	40.7 $\pm$ 12.1 <sup>abc</sup>	26.72 $\pm$ 5.2 <sup>bc</sup>
Trehalose 50mM	47.25 $\pm$ 10 <sup>cd</sup>	20.78 $\pm$ 6.3 <sup>ab</sup>
Cysteamine 2mM + Trehalose 50mM	44.14 $\pm$ 5.6 <sup>bcd</sup>	32.42 $\pm$ 2.9 <sup>c</sup>
LipoicAcid1mM + Trehalose 50mM	40.34 $\pm$ 9.03 <sup>abc</sup>	24.68 $\pm$ 2.9 <sup>bc</sup>
Cysteamine 2mM + LipoicAcid1mM	52.02 $\pm$ 6.4 <sup>d</sup>	32 $\pm$ 4.1 <sup>c</sup>
p	*	*

a, b ,c: Different superscripts within the same column demonstrate significant differences. (\*p < 0.05).

**Table 4:** Mean ( $\pm$ SEM) LPO ( $\mu\text{M}\times 10^9$ ) and AOP ( $\text{mM}\times 10^9$ ) levels in frozen–thawed bull semen.

**Table 4:** Dondurulmuş–çözdürülmüş boğa spermasında ortalama ( $\pm$ sem) lpo ( $\mu\text{m}\times 10^9$ ) ve aop ( $\text{mm}\times 10^9$ ) düzeyleri

Groups	LPO( $\mu\text{M}\times 10^9$ )	AOP ( $\text{mM}\times 10^9$ )
Control	26.38 $\pm$ 8.5 <sup>a</sup>	22.94 $\pm$ 5.6 <sup>a</sup>
Cysteamine 2mM	24.1 $\pm$ 11 <sup>a</sup>	26.74 $\pm$ 12.2 <sup>a</sup>
LipoicAcid1mM	31.64 $\pm$ 27.8 <sup>a</sup>	23.3 $\pm$ 5.7 <sup>a</sup>
Trehalose 50mM	24.14 $\pm$ 7,8 <sup>a</sup>	23.34 $\pm$ 12.3 <sup>a</sup>
Cysteamine 2mM + Trehalose 50mM	21.12 $\pm$ 5.9 <sup>a</sup>	22.42 $\pm$ 8.6 <sup>a</sup>
LipoicAcid1mM + Trehalose 50mM	26.9 $\pm$ 14.7 <sup>a</sup>	26.64 $\pm$ 10.8 <sup>a</sup>
Cysteamine 2mM + LipoicAcid1mM	31.86 $\pm$ 10.1 <sup>a</sup>	20.96 $\pm$ 6.4 <sup>a</sup>
p	NS	NS

NS: No significant a, b ,c: Different superscripts within the same column demonstrate significant differences.

(\*p < 0.05).

## REFERENCES

- Aboagla EME, Terada T.** Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol Reprod.* 2003; 69(4), 1245-1250.
- Aitken RJ, De Iuliis GN, McLachlan RI.** Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl.* 2009; 32(1), 46-56.
- Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS.** Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 1998; 59(5), 1037-1046.
- Aly HA, Lightfoot DA, El-Shemy HA.** Modulatory role of lipoic acid on lipopolysaccharide-induced oxidativestress in adult rat Sertoli cells in vitro. *Chem. Biol. Interact.* 2009; 1822-3,112–118.
- Bailey JL, Blodeau JF, Cormier N.** Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon minireview. *J Androl.* 2000; 21(1), 1-7.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T.** Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell.* 2005; 120, 483–495.
- Bansal AK, Bilaspuri GS.** Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int.* 2011; doi:10.4061/2011/686137.
- Bhattacharyya AK, Chakraborty D, Varghese AC, Bhattachar-yya SM, Kundu S, Banerjee A.** Cryopreservation and post-thaw motility, DNA integrity and acrosome status of pre-freeze prepared human semen frozen in different trehalose concentrations. *Hum Reprod.* 2006; 21(Suppl 1):393.
- Biewenga G, Haenen GRMM, Bast A.** The pharmacology of antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol.* 1997; 29:315-31.
- Bucak MN, Tekin N.** Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Rumin Res.* 2007; 73(1), 103-108.
- Bucak MN, Tuncer PB, Sariözkan S, Akalın PP, Çoyan K, Başpınar N, Özkalp B.** Effects of hypotaurine, cysteamine and amino acids solution on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. *Research in Veterinary Science.* 2009; 87, 468–472
- Bucak MN, Tuncer PB, Sariözkan S, Başpınar N, Taşpınar M, Çoyan K, Bilgili A, Akalın PP, Büyükleblebici S, Aydos S, Ilgaz S, Sunguroğlu A, Öztuna D.** Effects of antioxidants on

- post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*. 2010; 61(3), 248-253.
- Chhillar S, Singh VK, Kumar R, Atreya SK.** Effects of Taurine or Trehalose supplementation on functional competence of cryopreserved Karan Fries semen. *Anim Reprod Sci*. 2012; 135(1), 1-7.
- Cirit Ü, Bağış H, Demir K, Agca C, Pabuccuoğlu S, Varışlı Ö, Clifford-Rathertf C, Agca Y.** Comparison of cryoprotective effects of iodixanol, trehalose and cysteamine on ram semen. *Anim Reprod Sci*. 2013; 139(1), 38-44.
- Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Wistrom CA.** Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem J*. 1987; 242(1), 1.
- De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C.** Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod*. 1997; 2, 48-54.
- De Matos DG, Gasparrini B, Pasqualini SR, Thompson JG.** Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology*. 2002; 57: 1443-1451.
- Desouky OS, Selim, NS, Elbakrawy EM, Rezk RA.** Impact evaluation of alpha-lipoic acid in gamma-irradiated erythrocytes. *Radiat Phys Chem*. 2011; 80(3), 446-452.
- El-Beshbishy, H Bahashwan, S Ali HAA, Fakher H.** Abrogation of cisplatin-induced nephrotoxicity in mice by alpha lipoic acid through ameliorating oxidative stress and enhancing gene expression of antioxidant enzymes. *Eur J Pharmacol*. 2011; 668, 278-284.
- El-Sheshtawy RI, Sisy GA, El-Nattat WS.** Effects of different concentrations of sucrose or trehalose on the post-thawing quality of cattle bull semen. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 2015; 4(1), 26-31.
- Garde JJ, Del Olmo A, Soler AJ, Espeso G, Gomendio M, Roldan ERS.** Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*). *Anim Reprod Sci*. 2008; 108(3), 384-401.
- Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, Dejarnette JM, Marshall CE.** Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod*. 1997; 57(6), 1401-1406.
- Gasparrini B, Sayoud H, Neglia G, de Matos DG, Donnay I, Zicarelli L.** Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development *Theriogenology*. 2003; 60: 943-952.
- Gharagozloo P, Aitken RJ.** The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod*. 2011; 26(7), 1628-1640.
- Grupen CG, Nagashima H, Nottle MB.** Cysteamine enhances in vitro development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Biol Reprod*. 1995; 53: 173-178.
- Gutiérrez-Pérez O, Juárez-Mosqueda Mde L, Carvajal SU, Ortega ME.** Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology*. 2009; 58(3):287-92.
- Hu JH, Li QW, Zan LS, Jiang ZL, An JH, Wang LQ, Jia YH.** The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Anim Reprod Sci*. 2010; 117(1), 11-17.
- Khalili B, Farshad A, Zamiri MJ, Rashidi A, Fazeli P.** Effects of sucrose and trehalose on the freezability of Markhoz goat spermatozoa. *Asian-Aust J Anim Sci*. 2009; 22, 1614-1619.
- Kito S, Bavister BD.** Male pronuclear formation and early embryonic development of hamster oocytes matured in vitro with gonadotrophins, amino acids and cysteamine. *J Reprod Fertil*. 1997; 110: 35-46.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL.** Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*. 2002; 57(1), 327-344.
- Merton JS, Knijn HM, Flapper H, Dotinga F, Roelen BA, Vos PL, Mullaart E.** Cysteamine supplementation during in vitro maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. *Theriogenology*. 2013; 80: 365-371
- Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM.** A triple-stain flow cytometric method to

- assess plasma-and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol Reprod.* 2003; 68(5), 1828-1835.
- Packer L, Witt EH, Tritschler HJ.** Alpha-lipoic as biological antioxidant. *Free Rad Biol Med.* 1995; 19, 227–250.
- Pindaru LP, Groza IS.** Effects of Alpha-Lipoic Acids on Sperm Membrane Integrity during Liquid Storage of Boar Semen. *Animal Science and Biotechnologies.* 2015; 48 (1); 162-165.
- Reddy NSS, Mohanarao GJ, Atreja SK.** Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Anim Reprod Sci.* 2010; 119(3), 183-190.
- Salamon S, Maxwell WMC.** Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci.* 1995; 38(1), 1-36.
- Sanocka D, Kurpisz M.** Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004; 2(12), 1-7.
- Schafer S, Holzmann A.** The use of transmigration and spermacstain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2000; 59: 201-211.
- Selvakumar E, Prahalathan C, Sudharsan PT, Varalakshmi P.** Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm. *Toxicology.* 2006; 217 (1);71–78.
- Shen T, Jiang ZL, Li CJ, Hu XC, Li QW.** Effect of alpha-lipoic acid on boar spermatozoa quality during freezing-thawing. *Zygote.* 2015; 23;1-7.
- Singh VK, Atreja SK, Kumar R, Chhillar S, Singh AK.** Assessment of Intracellular Ca<sup>2+</sup>, cAMP and 1, 2-Diacylglycerol in Cryopreserved Buffalo (*Bubalus bubalis*) Spermatozoa on Supplementation of Taurine and Trehalose in the Extender. *Reprod Dom Anim.* 2012; 47(4), 584-590.
- Suzuki JY, Tsuchiya M, Packer L.** Lipoic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which react with reactive oxygen species. *Free Rad Res Commun.* 1991; 17, 255–263.
- Thibier M, Wagner HG.** World statistics for artificial insemination in cattle *Livestock Production Science.* 2002; 74(2):203-212.
- Tonieto RA, Goularte KL, Gastal GDA, Schiavon RS, Deschamps JC, Lucia T.** Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Rumin Res.* 2010; 93(2), 206-209.
- Uysal O, Bucak MN, Yavas I, Varisli O.** Effect of various antioxidants on the quality of frozen-thawed bull semen. *J Anim Vet Adv.* 2007; 6(2), 1362-1366.
- Vishwanath R, Shannon P.** Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci.* 2000: 62(1), 23-53.
- Watson PF.** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev.* 1995; 7(4), 871-891.
- Woelders H.** Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet Q.* 1997; 19(3), 135-138.

## Stomoxys (Diptera, Muscidae) Sinekleri ve Taşıdığı Bazı Önemli Paraziter Hastalıklar

Bekir OĞUZ<sup>1\*</sup>, Nalan ÖZDAL<sup>1</sup>, Serdar DEĞER<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Yüzüncüyıl University Faculty of Veterinary Medicine , Department of Parasitology , Zeve Campus , Van /TURKEY*

Corresponding author e-mail: bekiroguz@yyu.edu.tr

### ÖZ

Stomoxys sinekleri, çiftlik hayvanlarının ve bazen de insanların deri ve kanlarında yaşayan pek çok patojen için mekanik vektörlük yapmaktadır. İmmün sistem baskılayıcı etkileri yanında, kan kaybı, stres, iştah kaybı, deri lezyonlarına yol açar ve hayvanları oldukça rahatsız ederler. Hayvanların bu sineklerden kendilerini korumak için bir araya toplanmaları da patojen etkenlerin mekanik bulaşmasına katkı sağlar. Stomoxys sinekleri Trypanasoma sp, Besnoitia sp, Habronema microstoma, Onchocerca sp. ve Dirofilaria sp. gibi parazitlere taşıyıcılık yapmaktadırlar. Kozmopolit bir yayılış gösteren Stomoxys calcitrans'ın hayvan ve insanlara patojen etkenleri bulaştırmada önemli bir vektörlük profiline sahip olduğu bilinmektedir. Bu konunun önemi gereği gelecekte yapılacak araştırmalara ışık tutması amacıyla bu insektin morfolojisi, biyolojisi, tıbbi önemleri, kontrol metodları ile ilgili son bilgiler ve literatürler incelenerek derleme yapılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Diptera, Mekanik Vektör, Stomoxys Sinekleri

## Stomoxys (Diptera, Muscidae) and Transmission of Some Important Parasitic Diseases by Stable flies

### ABSTRACT

Stomoxys flies are mechanical vectors of various pathogens existing in the blood and skin of livestock, but sometimes humans. In addition to their immune suppressive effects, they have quite a few disturbance effects on skin lesions, reduction of food intake, stress and blood loss. To protection from flies, the gathering of animals also contribute development of mechanical transmission of pathogens. Dirofilaria sp, Onchocerca sp, Habronema microstoma, Besnoitia sp and Trypanasoma sp are transmitted by Stomoxys. Stomoxys calcitrans indicate a cosmopolitan distribution is known as a profile of an significant vectoring transmitting pathogens to the animals and humans. Due to importance of this subject, a review has been made concerning the morphology, biology, medical importance, control methods of the Stomoxys flies so that future investigations may benefit.

**Key Words:** Diptera, Mechanical Vector, Stomoxys Flies

To cite this article: **Oğuz B, Özdal N, Değer S.** Stomoxys (Diptera, Muscidae) Sinekleri ve Taşıdığı Bazı Önemli Paraziter Hastalıklar. *Kocatepe Vet J.* 2016; 9(2): 97-104.

## GİRİŞ

*Stomoxys* sinekleri kan emen obligat insektler olup bazı türleri dünyanın birçok yerinde çiftlik hayvanlarında ve diğer sıcakkanlı hayvanlarda önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. *Stomoxys* soyunda (Diptera: Muscidae) şimdiye kadar tanımlanmış 18 tür bulunmaktadır (Zumpt 1973). Kozmopolit bir tür olan *Stomoxys calcitrans*'la birlikte diğer *Stomoxys* türleri de (*S. niger*, *S. sitiens* ve *S. indius*) kolaylıkla evcil hayvanlara saldırmaktadırlar (Wall ve Shearer 1997).

Genellikle saldırgan ve ısrarcı bir beslenme şekli gösteren *Stomoxys* sineklerinin hem dişisi hem de erkeği kan emmektedir. Ahır sinekleri de denilen bu sineklerin geniş bir konak çeşitliliği olmasına rağmen sığan, kobay, tavşan, maymun, at, deve, keçi, pelikan ve sığırlar asıl konaklarını oluştururlar (Hale 2011). Bu sinekler çok aktif bir yaşam sürmekle birlikte özellikle çiftliklerde problem olmaktadır. Ayrıca tarımsal üretime yakın yerleşim bölgeleri ve sahillerde görülme potansiyelleri sebebiyle oldukça önemlidirler (Newson 1977). *Stomoxys* sineklerinin şiddetli sokma aktiviteleri süt üretimi ve canlı ağırlık kaybıyla sonuçlanan ciddi problemlere neden olabilmektedir (Mullens ve ark 2006). Canlı ağırlıkta %19 ve süt veriminde %40-60 oranlarında kayıplara neden olduğu rapor edilmiştir (Carn 1996, Campbell ve ark 2001). ABD'de bu sineklerin hayvancılık ekonomisi üzerine yarattığı zararın 100 milyon dolar olduğu tahmin edilmiştir (Campbell 1993). Bunun yanında, *Stomoxys* salgınlarının turizm sektöründe de önemli ekonomik kayıplar oluşturduğu bildirilmiştir (Koehler ve Kaufman 2006).

*Stomoxys* sineklerinin kan kaybı, toksik etkisi ve rahatsızlık vermelerinin yanı sıra çoğunun helmint, protozoa, bakteri ve virüs gibi patojenlere mekanik vektörlük yaptığı da bilinmektedir. Bu derlemede *Stomoxys* sineklerinin morfolojisi ve biyolojisi ile naklettiği bazı önemli paraziter hastalıklar ile bu sineklere karşı koruma ve kontrol önlemlerinden bahsedilmiştir.

### **Stomoxys Sineklerinin Morfoloji ve Biyolojisi**

*Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) insanların, vahşi ve çiftlik hayvanlarının kozmopolit bir ektoparazitidir. *Stomoxys* türleri delici hortumları (proboscis) ve maxillar palpleri ile karakterizedir. Proboscis'leri labrum, hypopharynx ve labium'dan oluşmuştur. Hortumları, dinlenme halindeyken yatay olarak uzanmış olup, başın üstünden görülebilir. *Stomoxys calcitrans*'da palp tek segmentli ve proboscis uzunluğunun yaklaşık dörtte biri kadardır (Zumpt 1973). *Stomoxys calcitrans* düz bir zeminde ön kısmı kalkık, uçak tarzında duruş gösterir. Kanatları şeffaf ve arkaya doğru daha açıktır (Güven ve Kar 2013).

Son 30 yılda moleküler biyolojide kaydedilen gelişmeler, veteriner parazitolojide de önemli uygulama alanları (tanı, tedavi, genetik tiplendirme, sistematik (taksonomi ve filogeni), populasyon

genetiği, ekoloji, epidemiyoloji, antiparazitik ilaç ve aşı geliştirilmesi ve parazit genomu) bulmuştur. Moleküler biyolojideki bu gelişmeler sayesinde *Stomoxys calcitrans*'ın 4'ü resesif mutasyona uğramış 5 çift kromozoma sahip olduğu bildirilmiştir (Hunter ve ark 1992). Mutasyona uğrayan kromozomların göz, kosta, kanat ve pupa'ya ait olduğu bildirilmiştir. *Stomoxys* sineklerinde popülasyonlar arasında genetik farklılıkları belirlemek için lokal bölgelerde yapılan çalışmalarda çok az varyasyon ve yüksek gen akışı (Szalanski ve ark 1996, Gilles ve ark 2007) bildirilirken, küresel alanları kapsayan çalışmalarda ise yüksek seviyede varyasyonlar (Marquez ve ark 2007, Dsouli-Aymes ve ark 2011) tespit edilmiştir.

Konaklarını bulmak için hem koku hem de görsel uyarılara tepki gösteren bu sinekler asıl konaklarını bulamadıklarında insanlara bile saldırabilmektedirler (Birkett ve ark 2004). *Stomoxys* sineklerinin beslenmek için 6 gün ve en az 3 km konak arayabildikleri belirtilmiştir (Bailey ve ark. 1973). Ahır sinekleri her seferde ortalama 11-15 ml olmak üzere her gün birkaç kez kan emebilirler (Schowalter ve Klowden, 1979). Dişi sineklerin yumurtalıklarının gelişimi için günde en az üç kez kan emmesi zorunlu olup, daha sonrası için de günlük kan emmeleri gerekir. Ayrıca erkeklerin de dişileri düzgün döleye bilmeleri için kan emmeleri gereklidir. Yapılan çalışmalarda bu soyda bulunan iki türün (*S. calcitrans* ve *S. niger*) aynı zamanda olgun meyve veya çiçeklerin şekerleriyle de beslenebildikleri bildirilmiştir (Muller ve ark 2012). Lee ve Davies (1979), şekerle beslenmenin *Stomoxys* sineklerinin yaşam sürelerini artırdığını bildirmişlerdir. Moobola ve Cupp (1978)'a göre ise şeker yerine kan ile beslenme uzun ömürlü olmayı etkilemekte, ancak kan bulunmadığı zaman şekerle beslenme, sade suya nazaran yaşam süresini 5 kat daha arttırmaktadır. *Stomoxys* sinekleri Mart sonu veya Nisan başlarında ortaya çıkmaya başlar, Haziran sonunda ise sayılarında büyük bir artış görülür (Kneeland 2011).

Dişi *Stomoxys* sinekleri, gübre (Hall 1992), gübre ile karışık silaj, saman, tahıl ya da kuru ot (Campbell 2006), çim kupürleri, çöp kutuları (Suszkiw ve Core 2003) ve yosun (King ve Lenert 1936) gibi çok çeşitli nemli ve çürümekte olan organik maddeler üzerine yumurtlarlar. Dişiler her siklus başına yaklaşık 20 yumurta olmak üzere hayatları boyunca 100-400 yumurta bırakırlar (Skidmore 1985). Gelişimleri holometabol olan *Stomoxys* sineklerinde yumurta, larva (3.dönem), pupa ve ergin gelişim aşamaları bulunmaktadır (Zumpt 1973).

Yumurtaları uzunlamasına bir oluk ile ventral dışbükey olup yaklaşık 1mm uzunluğunda ve beyaz renktedir. Larvalar 2-4 gün içerisinde yumurtadan çıkar (Zumpt 1973, Skidmore 1985). Larvalar yaklaşık 10 mm uzunluğa kadar gelişirler. Larva evresi uygun koşullarda 2-3 hafta sürer. Ancak bu süre olumsuz hava koşullarında 80 güne kadar uzayabilmektedir. Larvalar pupa aşaması için kuru



alanlara göç ederler; pupa evresi 2-30 gün sürer. Pupalar 6mm uzunluğunda ve kahve renklidir (Skidmore 1985). Ergin sinekler yaklaşık 7mm uzunluğunda olup, abdomenlerinde dama tahtasına benzeyen koyu renkli lekeler ve torakslarında 4 adet uzunlamasına koyu bant bulunmaktadır (Zumt 1973, Skidmore 1985).

Simmons (1944), sineklerin yumurtadan erişkin oluncaya kadarki yaşam süresinin iklim şartlarına göre 13 gün ile birkaç ay arasında, Kunz ve ark. (1977), ise bu gelişmenin çevre sıcaklığına bağlı olarak 280 saat (11.6 gün) ile 400 saat (16.6 gün) arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

### **Stomoxys Sineklerinin Medikal Önemleri**

Bu sineklerin göz çevresinde uçma, deri üzerine konma ve kan emmeleri sonucunda hayvanlara verdiği rahatsızlık özellikle çiftlik hayvanları için önemlidir. Bu rahatsızlıktan kurtulmak için hayvanlarda saklanma, kaçma, kuyruk ve ayaklarıyla kendini koruma, çeşitli cisimlere sürtünme eğilimleri görülür. Bu nedenler hayvanlarda; enerji kaybı, beslenme süresinde azalma, beslenme için yorgun kalma, huzursuzluk ve hatta ölümlere neden olur. (Baldacchino ve ark 2013).

Kan emme esnasında sineklerin ağız organellerinin yapısı ve tükürükteki bazı bileşiklerin lokal bir ağrıya sebebiyet vermesi hayvanlarda stres sebebidir. Isırık alanı civarında eritamatoz papüller yada kabarcıklar görülür. Beslenme esnasında salınan tükürük salgısı irrite edici ve alerjik yapıda olduğundan, buna bağlı olarak gelişen aşırı duyarlılık reaksiyonu lezyonu şiddetlendirir. Ayrıca beslendikleri yerden sızan kanın etrafına çok sayıda yalayıcı emici ağız organellerine sahip sinekler (muscid) toplanır (Güven ve Kar 2013). *Stomoxys calcitrans*'ın sığırların sırt bölgesinde yuvarlak şekilli kıl dökülmelerine, atların ayaklarında eksudatif dermatite ve köpeklerin kulak uçlarında nekrotik dermatit gibi belirgin deri lezyonlarına neden olduğu bildirilmiştir (Yeruham ve Braverman 1995). Bunun yanında, vahşi hayvanlara da zarar verdiği ve salgınları sonucu Kuzey Kongo Cumhuriyeti'ndeki Bongo antiloplarında (*Tragelaphus eurycerus* (Ogilby 1837)) ve diğer çift tırnaklı hayvanlarda ölümlere sebep olduğu bildirilmiştir (Elkan ve ark 2009).

Kan emen sinekler indirekt etkileri ile konak canlıda önemli medikal sorunlara sebep olabilmektedirler. Bu etkiler mekanik bulaştırma şeklinde ağız organellerinin kontaminasyonu ve sindirim içeriğinin regurjitasyonu ile olmaktadır (Butler ve ark 1977). Mekanik bulaştırma enfekte hayvandan kan emmeyle başlar ve genellikle hemağız organellerinin vermiş olduğu acı hem de konağın kendini savunması nedeniyle yarıda kesilir. *Stomoxys* sineklerinin kan emmeye çalışırken ağızda taşıdığı bir önceki hayvana ait kanı (patojen etkenleri) yeni konağa aktarabileceği bildirilmektedir. Ayrıca deneysel çalışmalar ahır sineklerinin başka bir canlıdan kan emmeden önce, önceden emdiği kanın bir kısmını

kusabileceğini göstermiştir. Aslında bu olgu, hastalık etkenlerinin bulaşmasında önemli bir yol olmasına rağmen bazı patojenlerin sokucu sineğin sindirim salgılarından etkilenerek inhibe olmaları ve sonuçta kısa sürede ölmeleri ile sınırlı kalmıştır. Bu sebeple hastalık etkenlerinin bulaştırılmasında regurjitasyona nazaran ağız organellerinin kontaminasyonu daha önemlidir. Kısaca sinekler kan emme sırasında ağız organellerine bulaştırdığı etkenleri daha kolay ve çok sayıda vermektedirler (Butler ve ark 1977). *Stomoxys* sinekleri sık sık beslenirler ve iki beslenme arasındaki süre 4 ile 72 saat arasında değişkenlik göstermektedir (Salem ve ark 2012b).

### **Taşıdığı Önemli Paraziter Hastalıklar**

#### **a) Protozoonlar**

#### **Trypanosomiasis**

Trypanosomiasis Afrika çiftliklerinde sık görülen tehlikeli hastalıklardan birisi olup, *Glossina* soyundaki (çeçe sinekleri) sinek türleriyle biyolojik olarak nakledilen bir hastalık grubudur. Hayvanlarda et ve süt veriminde azalma ve aneminin yanısıra abort ve ölümler görülmektedir. Bilinenin aksine trypanosomiasisde bulaşma sadece çeçe sinekleriyle olmayıp bunun dışında önemli bir bulaşma yolu olan mekanik nakilde *Stomoxys* sinekleri rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda çoğu *Trypanosoma* türünün (*T. evansi*, *T. brucei*, *T. congolense* ve *T. vivax*) mekanik olarak nakledildiği bildirilmiştir (Desquesnes ve Dia 2004). Mekanik naklin önemi *Trypanosoma* türleri arasında farklılıklar göstermektedir. Örneğin *T. evansi* ve *T. vivax* için mekanik nakil çok önemlidir ve neredeyse bulaşmanın tek yoludur. *Trypanosoma evansi*'nin *Stomoxys* sinekleri ile hızlı bir şekilde taşınabileceğinin yanısıra, bulaşmanın en geç 24 ile 72 saat içerisinde olabileceği kanıtlanmıştır. Araştırmacılar, taşıyıcılığı Tabanidlerle karşılaştırdıklarında *Stomoxys*'lerin belirli bir kapasitelerinin olduğunu ancak hızlı olmadıkları takdirde bulaşmanın olmayacağını saptamışlardır (Bouet ve Roubaud 1912).

*Trypanosoma evansi*'nin aynı zamanda köpeklerde de görüldüğü ve bulaştırılmasında *Stomoxys* ve *Tabanus* (Diptera: Tabanidae) cinsi kan emen sineklerin önemli rol oynadıkları bildirilmiştir. Brezilya'da köpeklerde *T. evansi* seroprevalansı %30 civarında bulunmuştur.

Atlardamalde caderas ve surra hastalığının etkeni olan *T. evansi* için köpekler etkin bir rezervuar olarak kabul edilmektedir. Ayrıca enfeksiyon köpeklerde de şiddetli ve ölümcül seyretmektedir. Klinik belirtiler arka bacaklarda ödem, iştahsızlık, ilgisizlik, dehidrasyon, soluk mukoz membranlar, ateş ve kilo kaybı olarak görülmektedir (Dantas-Torres 2008).

Laboratuvar şartlarında *Stomoxys varipes*'in *Trypanosoma evansi*'yi farelere mekanik yolla taşıyabileceği gösterilmiştir (Bouet ve Roubaud 1912). Vahşi hayvanlarda ve evcil memelilerde surra hastalığı kaşeksi, abort, ödem, aşırı zayıflığı takiben dalak ve lenf nodüllerinde büyüme, anemi ve yüksek

ateşle karakterize klinik belirtiler gösterir (Brun ve ark. 1998). Afrika *Stomoxys* türlerinin (*S. niger niger* ve *S. taeniatus*) laboratuvar farelerinde *T. congolense* (Kenya tipi) ve *T. evansi*'yi (Güney Amerika tipi) mekanik yolla bulaştırılma durumu araştırılmıştır. Yapılan çalışmada Afrika trypanosomiasisinin en önemli türlerinden biri olan *T. congolense*'nin *S. niger* tarafından düşük oranda, *Trypanosoma evansi*'nin ise her iki türle de (*S. niger niger* ve *S. taeniatus*) yüksek oranda taşınabildiği bildirilmiştir (Sumba ve ark 1998).

Fransa'da tespit edilen beş trypanosomiasis vakasından üçünün çiftliklerde, ikisinin ise ithal getirilen develerde olduğu tespit edilmiş ve parazitin muhtemelen Temmuz-Eylül aylarında sıkça görülen *S. calcitrans* ve Tabanid cinsi sokucu sinekler tarafından bulaştırıldığı belirtilmiştir. Çiftlikteki diğer hayvanlarda parazit bulunmamış, ancak aynı çiftlikteki bazı koyunlarda PCR ve serolojik yöntemler ile hastalık tespit edilmiştir (Desquesnes ve ark 2008). Brezilya'nın Minas Gerais eyaletindeki bir süt işletmesinde sığırlarda yüksek oranda bulunan *T. vivax* seroprevalansı bölgedeki *S. Calcitrans* popülasyonunun artışıyla ilişkilendirilmiştir (Cuglovici ve ark 2010).

Trypanosomiasis tedavisinde sıklıkla ilaca karşı direnç ortaya çıkmasına rağmen sığır, koyun ve keçilerde Diminazeturat ve Homidium tuzları (H.-Bromid veya H.-Chlorid); at, deve ve köpeklerde Suramin, Quinapyramin kullanılmaktadır. Diminazeturat preparatları deve, at ve köpekler için toksiktir. İsoetamidium chlorid sığırlar hariç diğer hayvanlar için sakıncasızdır (Karaer ve Nalbantoğlu 2010).

### **Besnoitia besnoiti**

Besnoitiosis vahşi ve evcil hayvanlarda, düşük mortalite ve yüksek morbitite ile seyreden ekonomik olarak önemli bir paraziter hastalıktır. Sığırlarda besnoitiosisin etkeni *Besnoitia besnoiti*'dir. Kist formu ve apikompleksan bir protozoon olup evcil ve yabani sığırlar arakonaklık yaparlar. Besnoitiosisin klinik belirtileri, hastalığın seyri sırasında birbirini takip eden üç aşamada ortaya çıkabilmektedir. İlk aşamada solunum ve kalp atış sayısında artış, iştahsızlık, rumen hareketlerinde durma, göz ve burun akıntısı ve fotofobi ile birlikte yüksek ateş gibi bulgular görülebilmektedir. İkinci aşama derinin aşırı duyarlılığı, generalize ödem, lenf yumrularında büyüme ile karakterizedir. Kronik form olan üçüncü aşamada ise sklerodermi, hiperkeratoz, hiperpigmentasyon, geniş alopesi gibi belirtiler görülebilmektedir. İştahın düzelmesine rağmen kilo kaybı göze çarpan bir durumdur ve klinik vakalarda ölüm oranı %10 olabilmektedir (Jacquet ve ark 2010, Lienard ve ark 2010). Hastalığın hızla yayılmasında kan emen sokucu sinekler bir risk faktörü oluşturmaktadırlar. *Stomoxys* sinekleri ile *B. besnoiti*'nin mekanik yolla taşındığı kanıtlanmıştır (Lienard ve ark 2013). Hastalığın risk faktörleri kapsamında mevsim ön plana çıkmaktadır. Klinik bulguların yaz

mevsiminde sürülerin otlakları ortak kullanmaya başlamaları ile ortaya çıktığı dikkat çekmektedir. Bu nedenle hastalığın mekanik naklinde kan emici *Glossina*, *Stomoxys* ve *Tabanus* cinsine ait sineklerin önemli rol oynayabilecekleri ileri sürülmektedir (Sevinç 2013).

Besnoitiosisin kesin tedavisi bilinmemektedir. Antibiyotikler, quinoline deriveleri, diamidinler ve sulfanamidler denenmiş, ancak etkili olmadıkları görülmüştür. Uzun süre etkili, oxytetracyclinin 200mg/kg, tek dozda i.m. verilmesinin hayvanları besnoitiosis'e karşı koruduğu, halofugione lactate'ın invitro kültürde parazitli hücrelerin yüzdesinde azalma sağladığı tespit edilmiştir (Sevgili 2010).

### **Diğer Protozoonlar**

Deneysel bir çalışma ile *Stomoxys calcitrans*'ın kan emme esnasında *Leishmania tropica*'yı bulaştırabileceği bildirilmiştir. Ancak doğal yollarla bulaşma epidemiyolojik olarak kanıtlanmamıştır (Berberian 1938).

### **b) Helmintler**

#### ***Habronema microstoma***

Habronemosis *Habronema microstoma*'nın neden olduğu paraziter bir hastalıktır. *Habronema microstoma*'nın arakonaklığını *Musca domestica* ve *S. calcitrans*'ın yaptığı bildirilmektedir (Yarmut ve ark 2008). *Stomoxys calcitrans*'ın *H. microstoma*'nın vektörü olduğu hem laboratuvarında yetiştirilen hemde sahadan toplanan sineklerin farklı anatomik parçalarında (baş, thoraks ve abdomen) nematod DNA'sının bulunmasıyla kanıtlanmıştır (Traversa ve ark 2008). *Habronema* türleri atların mide mukozası yüzeyinde, kalın bir mukus tabakası içinde yerleşir. Mukozada yangıyı ve sindirim bozukluklarını takiben kronik gastritis ile ülserlere neden olurlar. Ovovivipar olan *Habronema* sp. dişileri dışkıyla dışarı embriyonlu yumurtalar atmaktadır. Embriyonlu *Habronema* sp. yumurtalarının (içinde L<sub>1</sub> olan) yada larvalarının arakonak sineğin dışkıda gelişen larvaları (*Musca* ve *Stomoxys* larvaları) tarafından alınmaları gerekmektedir. Bunlar arakonak sineklerin larvaları tarafından alındıklarında L<sub>1</sub>'ler bu sineklerin larvalarında L<sub>3</sub>'e kadar gelişmektedirler (Traversa ve ark 2008). Bu işlem genellikle sinek larvasının pupa dönemine girmesiyle birlikte tamamlanmaktadır. Sinek larvaları erişkin hale geldiklerinde enfektif L<sub>3</sub>'ler de gelişmiş durumda olup, pupadan ergin sinek çıktığında, L<sub>3</sub>'ler sineğin vücut boşluğundan tükürük bezlerine göç etmektedir. Sinekler beslenme amacıyla tek tırnaklıların ağız etrafına konduğunda L<sub>3</sub>'ler sineğin ağız organellerinden tek tırnaklının ağız kenarındaki deri üzerine bırakılmaktadır. Bu larvalar hayvanın yalanması sırasında veya enfekte sineklerin yutulmasıyla alınmaktadır. Alınan L<sub>3</sub>'ler yutularda mideye ulaşmakta ve midenin fundus kısmında 2 ayda gelişmesini tamamlamaktadır (Köroğlu 2013). Hem mide, hem de deri habronemiosisin tedavisinde ivermectin 0.2-0.3 mg/kg, moxidectin 0.4 mg/kg dozda oral yolla kullanılmaktadır. Mide

habronemiosisinin tedavisinde albendazole, oxfendazole ve oxibendazole 10 mg/kg dozda oral yolla kullanılmaktadır. Ayrıca 18 mg/kg dozda ve %6'lık solüsyon halinde oral yolla verilen triklorfon deri habronemiosisine etkili bulunmuştur (Umur ve ark 2006).

### **Diğer Helmintler**

Sığırların deri altına yerleşen *Onchocerca gibsoni*, kangurularda subkutan nodüllere sebep olan *Dirofilaria romeri* ve köpek ve kedilerde subkutan nodüllerde bulunan *Dirofilaria repens* gibi nematodların da *Stomoxys* sinekleri ile mekanik yolla taşınabilecekleri düşünülmektedir (Krinsky 1976).

### **Stomoxys Sineklerine Karşı Kontrol Önlemleri**

Steril insekt salınımı, tuzaklar, biyolojik kontroller, insektisidler gibi kontrol metodlarının çoğu *Stomoxys* sinekleri için test edilmiştir (Black ve Krafur 1985, Mihok ve Carlson 2007). *Stomoxys* popülasyonları için tek bir kontrol metodu etkili olmayıp, bu sinekler için tavsiye edilen birden fazla vektör kontrol stratejisi kullanılmalıdır. *Stomoxys* sineklerinin başarılı bir şekilde durdurulmasında vektör kontrolü üç taktik üzerine dayandırılmıştır: sanitasyon, biyolojik ve kimyasal kontrol (Betke ve ark 1986).

Sanitasyon, çiftliklerde *Stomoxys* sinek popülasyonunun azaltılmasında en önemli yöntemdir. En yaygın larva alanları yetersiz drene edilmiş araziler, gübre atlıkları ve çöplüklerdeki çürümüş vejetatif materyallerdir. Bu tip alanların temizliğine dikkat edilmesi, bu alanların ortadan kaldırılması, altlık ve dışıkların sineğin larvaları için uygun üreme alanı olmaktan çıkarılması korunmada çok yararlı olmaktadır (Güven ve Kar 2013).

*Pteromalidae* (*Hymenoptera*) ailesinde bulunan pupal parazitoid *Spalangia* türleri, *Stomoxys* sineklerinin biyolojik kontrolünde önemli bir yere sahiptir (Skovgard ve Steenberg 2002). Bu parazitoid arıcıklar ovipozitorlarıyla yumurtalarını olgunlaşmamış *Stomoxys* sineklerine bırakırlar. *Stomoxys* sinek larvalarında veya pupalarında gelişen parazitoid arıcıkları biyolojileri gereği larva veya pupaları üreme materyali olarak kullanarak onları öldürürler.

Fakat bu arıcıklar kısmen biyolojik kontrol imkânı sunmalarına rağmen hızlı sonuç vermezler (Baldacchino ve ark 2013).

Insektlerin toplanmasında ve kontrolünde kullanılan metodlar çok çeşitlidir ve hala yeni teknikler geliştirilmektedir (Heath 2002). *Stomoxys* sinekleri fenilpropanoid bileşikler, amonyak, karbondioksit gibi belirli kokulara ilgi duymaktadırlar (Gibson ve Torr 1999). Aynı zamanda UV ışıklarının yanında yansıyan alsinit fiberglas gibi görme uyarıcı nesnelere ilgi duymaktadırlar (Black ve Krafur 1985). Ayrıca maviye boyanmış materyaller, insektisit emdirilmiş kafesler veya Nzi ve Vavoua tuzaklarının da kullanıldığı bildirilmektedir (Mihok ve Carlson 2007).

Sineklerin kontrolü için ilgi çekici cihazlarla birlikte ATSB (ilgi çekici toksik şekerli tuzak) metodunun

birleştirilmesine yönelik yeni deneyler yapılmıştır. *Stomoxys* sineklerine karşı kullanılan materyaller ele alındığında insektisitli şekerli tuzaklar ve mavi boyalı kafesler onları öldürmektedir (Beier ve ark 2012, Muller ve ark 2012). Ose ve Hogsette (2014) *Stomoxys* sineklerinin yakalanmasında alsinitli silindirik fiberglas tuzacı (AFT) ile mavi-siyah bezle modifiye edilmiş silindirik tuzacını (BCT) karşılaştırmış ve çalışmanın yürütüldüğü 10 bölgenin 8'inde alsinitli silindirik fiberglas tuzacının daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmada yakalanan toplam 12.557 *Stomoxys* sineğinin %80'ni alsinitli silindirik fiberglas tuzacıdan (AFT), %20'si ise mavi-siyah bezle modifiye edilmiş silindirik tuzacıdan elde edilmiştir (Ose ve Hogsette 2014).

Karşılıklı translokasyon ve genetik cinsiyet belirleme yöntemleri gibi DNA rekombinasyon teknikleri de sinek kontrol programlarında uygulanabilir. Bu amaçla *Stomoxys* sineklerinin genetik kontrolünde kimyasal duyarlılık genleri veya mutant pupa geni kullanılmaktadır (Bartlett ve Staten 1996).

Bütün kontrol önlemlerine rağmen sineklere yönelik problemler halen devam ediyorsa insektisitler kullanılmalıdır. Çoğu bileşikler *Stomoxys* sineklerinin hem larvahem de erişkinlerinin üreme ve gelişmelerini baskılamaktadır. Yoğun enfestasyon dönemlerinde günlük düzenli bir şekilde uygulanan repellentler ile kemoproflaksi sağlanabilir. Altlıkların biriktiği alanlara, tavla içerisine, sineklerin konakladığı yüzeylere sprey tarzında pyrethroidler veya OF insektisitler uygulanabilmektedir (Hogsette 1987). Hayvanların üzerine avermectin (epinomectin) veya organofosfat (phoxim), çevreye ise insekt büyüme düzenleyici (cyromazin, triflumuron) kullanılması tavsiye edilmektedir (Salem ve ark 2012a).

## **SONUÇ**

Ülkemizin iklimsel koşulları çoğu ektoparazitler için uygun bir habitat oluşturmaktadır. *Stomoxys* sinekleri hem direkt etkileri hem de naklettikleri enfeksiyöz patojenleri düşünüldüğünde ciddi ekonomik kayıplara sebep olurlar. Özellikle çiftlik hayvanlarında görülen bazı hastalıkları biyolojik ve mekanik yolla taşınmaları çok önemlidir. Bu hastalıklara karşı kontrol programlarının yapılabilmesi için bu sineklerin biyolojileri ve epidemiyolojilerinin iyi bilinmesi gerekir. Geniş kapsamlı literatür taramasının ardından bu sineklerin Türkiye'de bulunmasına rağmen konunun yeterince araştırılmamış olduğu dikkati çekmektedir. Bu derlemede konuyla ilgilenenlere Dünya'da ve Türkiye'de eklem bacaklı popülasyonunun önemli bir bölümünü oluşturan *Stomoxys* sinekleri ile ilgili daha kapsamlı bilgiler sunulmuştur. Ayrıca taşıdıkları hastalıkların tanısı, hayat döngüleri ve patogenezi gibi bilinmeyen bazı hususların moleküler biyolojik teknikler kullanılarak araştırılması önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Bailey DL, Whitfield TL, Smittle BJ.** Flight dispersal of stable fly. *J Econ Entomol.*1973; 66:410-411.
- Baldacchino F, Muenworn V, Desquesnes M, Desoli F, Charoenviriyaphap T, Duvallet G.** Transmission of pathogens by *Stomoxys* Flies (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite.* 2013; 20:26.
- Bartlett AC and Staten RT.** The Sterile Insect Release Method and other Genetic Control Strategies. Radcliffe's IPM Word Textbook, 1996.
- Beier JC, Muller GC, Gu W, Arheart KL, Schlein Y.** Attractive toxic sugar bait (ATSB) methods decimate populations of *Anopheles malaria* vectors in arid environments regardless of the local availability of favoured sugar-source blossoms. *Malaria Journal.* 2012; 11:31.
- Berberian DA.** Successful transmission of cutaneous leishmaniasis by the bites of *Stomoxys calcitrans*. *Exp Biol Med.* 1938; 38:254-256.
- Betke P, Schultka H, Ribbeck R.** A *Stomoxys calcitrans* outbreak on a dairy farm. *Angew Parasitol.*1986; 27:39-44.
- Birkett MA, Agelopoulos MV, Jensen JB, Jespersen JA, Pickett HJ, Prijs G, Thomas JJ, Trapman LJ, Wadhams and Woodcock CM.** the role of volatile semiochemicals in mediating host location and selection by nuisance and disease-transmitting cattle flies. *Med Vet Entomol.*2004; 18:313-322.
- Black WC, Krafur ES.** Use of sticky traps to investigate seasonal trends in the spatial distribution of house flies and stable flies (Diptera: Muscidae). *J Med Entomol.* 1985; 22:550-557.
- Bouet G, Roubaud E.** Experiences de transmission des trypanosomiasis animales d'Afrique occidentale franc aise par les stomoxes. *Bull Soc Pathol Exot.*1912; 5:544-550.
- Brun R, Hecker H, Lun ZR.** *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Vet Parasitol.*1998;79:95-107.
- Butler JF, Kloft WJ, Dubose LA, Kloft E.** Recontamination of food after feeding a 32P food source to biting Muscidae. *J Med Entomol.*1977; 27:874-877.
- Campbell JB.** The economics of the fly problem. In: Thomas GD, Skoda SR, (Ed) *Rural Flies in the Urban Environment.* Lincoln, Nebraska: Institute of Agriculture and Natural Resource, University of Nebraska, 1993;pp. 34-39.
- Campbell JB.** A Guide for the Control of Flies in Nebraska Feedlots and Dairies. University of Nebraska-Lincoln Extension, Institute of Agriculture and Natural Resources, University of Nebraska-Lincoln, 2006, 355.
- Campbell JB, Skoda SR, Berkebile DR, Boxler DJ, Thomas GD, Adams DC, Davis R.** Effects of stable flies (Diptera: Muscidae) on weight gains of grazing yearling cattle. *J Econ Entomol.*2001; 94:780-783.
- Carn VM.** The role of dipterous insects in the mechanical transmission of animal viruses. *Br Vet J.*1996; 152:377-393.
- Cuglovici DA, Bartholomeu DC, Reis-Cunha JL, Carvalho AU, Ribeiro MF.** Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. *Vet Parasitol.*2010; 169:320-326.
- Dantas-Torres F.** Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasit Vectors.* 2008; 1:25.
- Desquesnes M, Dia ML.** Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. *Vet Parasitol.*2004; 119:9-19.
- Desquesnes M, Bossard G, Patrel D, Herder S, Patout O, Lepetitcolin E, Thevenon S, Berthier D, Pavlovic D, Brugidou R, Jacquiet P, Schelcher F, Faye B, Touratier L, Cuny G.** First outbreak of *Trypanosoma evansi* in camels in metropolitan France. *Veterinary Rec.* 2008; 162:750-752.
- Dsouli-Aymes N, Michaux J, De Stordeur E, Couloux A, Veuille M and Duvallet G.** Global population structure of the stable fly (*Stomoxys calcitrans*) inferred by mitochondrial and nuclear sequence data. *Infection, Genetics and Evolution.* 2011;11:334-342.
- Elkan PW, Parnell R, Smith JLD.** A die-off of large ungulates following a *Stomoxys* biting fly out-break in lowland forest, northern Republic of Congo. *Afr J Ecol.*2009; 47:528-536.
- Gibson G, Torr SJ.** Visual and olfactory responses of haematophagous Diptera to host stimuli. *Med Vet Entomol.*1999; 13:2-23.
- Gilles J, Litrico I, Tillard E and Duvallet G.** Genetic Structure and Gene Flow Along an Altitudinal Gradient Among Two Stomoxysine Species (Diptera: Muscidae) on La Reunion Island. *Journal of Medical Entomology.* 2007; 44:433-439.
- Güven E, Kar S.** Tabanid ve Muscid Enfestasyonları, In: Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları 1., Özcel MA (Ed), Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları no: 24, İzmir. 2013; pp.486-489.
- Hale KM.** Proximate Causation of Stable Fly (*Stomoxys calcitrans* [L.]) Host Use: The Influence of Phenology and Host Blood Suitability. PhD thesis, Montana State University, Montana, 2011.

- Hall RD.** Biotic Agents Affecting Stable Fly Populations. In: Thomas, G.D. and Skoda, S.R. (eds). The Stable Fly: A Pest of Humans and Domestic Animals. *Proc Entomol Soc Am*, Baltimore, MD. 1992; pp. 53-71.
- Heath AC.** Distribution, seasonality and relative abundance of *Stomoxys calcitrans* (stablefly) (Diptera: Muscidae) in New Zealand. *New Zeal Vet J.* 2002; 50:93-98.
- Hogsette JA, Ruff JP, Jones CJ.** Stable fly biology and control in northwest Florida. *J Agr Entomol.* 1987; 4:1-11.
- Hunter FF, Sutcliffe JF and Stratton C.** Subcostal Incomplete: A New Genetic Mutant of *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae). *The Journal of Heredity.* 1992; 83:453-455.
- Jacquet P, Lienard E, Franc M.** Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects. *Vet Parasitol.* 2010;174:30-36.
- Karaer Z, Nalbantoğlu S.** Trypanosomatidae, In: Veteriner Protozooloji 1. Baskı, Dumanlı N, Karaer Z (Ed), Medisan Yayınevi Ltd. Şti, Ankara. 2010; pp.23-42.
- Kneeland KM.** Genetic variability of the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae) assessed on a global scale using Amplified Fragment Length Polymorphism. *Dissertations and Student Research in Entomology.* 2011; pp. 11.
- King WV and Lenert LG.** Outbreaks of *Stomoxys calcitrans* (L.) ("dog flies") along Florida's Northwest coast. *Fla Entomol.* 1936; 19(3):33-39.
- Koehler PG and Kaufman PE.** Stable fly (dog fly) control. University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences Extension Service Document ENY-267. 2006; pp. 1-4.
- Köroğlu E.** Habronemosis ve Draschiosis, In: Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları 1. Özcel MA (Ed), Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları no: 24, İzmir. 2013; pp. 393-398.
- Krinsky WL.** Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). *J Med Entomol.* 1976; 13:225-275.
- Kunz SE, Bery IL and Foerster KW.** The development of the immature forms of *Stomoxys calcitrans*. *Ann Entomol Soc Am.* 1977; 70:169-172.
- Lee RM KW and Davies DM.** Feeding in the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) I. Destination of blood, sucrose solution and water in the alimentary canal, the effects of age on feeding, and blood digestion. *J Med Entomol.* 1979; 15:541-554.
- Lienard E, Salem A, Grisez C, Prevot F, Bergeaud JP, Franc M, Gottstein B, Alzieu JP, Lagalisse Y, Jacquet P.** Longitudinal study of *Besnoitia besnoiti* infections and seasonal abundance of *Stomoxys calcitrans* in a dairy cattle farm of southwest France. *Vet Parasitol.* 2010;177:20-27.
- Lienard E, Salem A, Jacquet P, Grisez C, Prevot F, Blanchard B, Bouhsira E, Franc M.** Development of a protocol testing the ability of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) to transmit *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Parasitol Res.* 2013; 112:479-486.
- Marquez JG, Cummings MA and Krafur FS.** Phylogeography of Stable Fly (Diptera: Muscidae) Estimated by Diversity at Ribosomal 16S and Cytochrome Oxidase I Mitochondrial Genes. *J Med Entomol.* 2007; 44:998-1008.
- Mihok S, Carlson DA.** Performance of painted plywood and cloth Nzi traps relative to Manitoba and Greenhead traps for tabanids and stable flies. *J Econ Entomol.* 2007; 100:613-618.
- Moobola SM and Cupp EW.** Ovarian development in the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, in relation to diet and juvenile hormone control. *Physiol Entomol.* 1978;3:317-321.
- Mullens BA, Lii KS, Meyer JA, Peterson NG, Szijj CE.** Behavioural responses of dairy cattle to the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, in an open field environment. *Med Vet Entomol.* 2006; 20:122-137.
- Muller GC, Hogsette JA, Beier JC, Traore SF, Toure MB, Traore MM, Bah S, Doumbia S, Schlein Y.** Attraction of *Stomoxys* sp. to various fruits and flowers in Mali. *Med Vet Entomol.* 2012; 26:178-187.
- Newson HD.** Arthropod problems in recreation areas. *Annu Rev Entomol.* 1977; 22:333-353.
- Ose GA, Hogsette JA.** Spatial distribution, seasonality and trap preference of stable fly, *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae), adults on a 12-hectare zoological park. *Zoo Biol.* 2014;33(3):228-33.
- Salem A, Bouhsira E, Lienard E, Melou AB, Jacquet P, Franc M.** Susceptibility of two European strains of *Stomoxys calcitrans* (L.) to Cypermethrin, Deltamethrin, Fenvalerate,  $\lambda$ -cyhalotrin, permethrin and Phoxim. *Intern J Appl Res Vet Med.* 2012a; 10:3.
- Salem A, Franc M, Jacquet P, Bouhsira E, Lienard E.** Feeding and breeding aspects of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) under laboratory conditions. *Parasite.* 2012b;19:309-317.
- Sevgili M.** Toxoplasmatidae (*Besnoitia*, *Hammondia*), In: Veteriner Protozooloji 1. Baskı, Dumanlı N, Karaer Z (Ed), Medisan Yayınevi Ltd. Şti, Ankara. 2010; pp.23-42.
- Sevinç F.** Sığırlarda *Besnoitia besnoiti* infections and seasonal abundance of *Stomoxys calcitrans* in a

- MA (Ed), Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları no: 24, İzmir. 2013; pp.71-74.
- Simmons SW.** Observations on the biology of the stable fly in Florida. *J Eco Entomol.* 1944; 37(5):680.
- Skidmore P.** The Biology of the Muscidae of the World (Series entomologica, volume 29). Dr W. Junk Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1985; 550.
- Schowalter TD, Klowden MJ.** Blood meal size of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, measured by the HiCN method. *Mosquito New.*1979; 39:110-112.
- Skovgard H, Steenberg T.** Activity of pupal parasitoids of the stable fly *Stomoxys calcitrans* and prevalence of entomopathogenic fungi in the stable fly and the house fly *Musca domestica* in Denmark. *Bio Control.* 2002; 47:45-60.
- Sumba AL, Mihok S, Oyieke FA.** Mechanical transmission of *Trypanosoma evansi* and *T. congolense* by *Stomoxys niger* and *S. taeniatus* in a laboratory mouse model. *Med Vet Entomol.* 1998; 12:417-422.
- Suszkiw J and J Core. ARS.** Project aims to clean house on filth flies. Agricultural research (Washington, D.C.) Agricultural research. 2003; 51(11):20-22.
- Szalanski AL, Taylor DB and Peterson RD.** Population Genetics and Gene Variation of Stable Fly Population (Diptera: Muscidae) in Nebraska. *Journal of Medical Entomology.* 1996; 33:413-420.
- Traversa D, Otranto D, Iorio R, Carluccio A, Contri A, Paoletti B, Bartolini R, Giangaspero A.** Identification of the intermediate hosts of *Habronema microstoma* and *Habronema muscae* under field conditions. *Med Vet Entomol.*2008; 22:283-287.
- Umur Ş, Köroğlu E, Güçlü F, Tınar R.** Nematoda, In: Helminтологи 1. Baskı, Tınar R (Ed), Nobel Yayın Dağıtım, Ankara. 2006; pp. 406.
- Wall R and Shearer D.** Veterinary Entomology. Chapman & Hall, London. 1997; pp. 163.
- Yarmut Y, Brommer H, Weisler S, Shelah M, Komarovskiy O, Steinman A.** Ophthalmic and cutaneous habronemiasis in a horse: case report and review of the literature. *Isr J Vet Med.* 2008; 63:87-90.
- Yeruham I, Braverman Y.** Skin lesions in dogs, horses and calves caused by the stable fly *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae). *Rev Elev Med Vet Pays Trop.*1995; 48:347-349.
- Zumpt F.** The Stomoxyine biting flies of the world. Taxonomy, biology, economic importance and control measures. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 1973; pp. 175.

## Gıda Kaynaklı Bakteriyel Patojenler

Didem SAĞLAM<sup>1</sup>, Esra ŞEKER<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarabısar/TÜRKİYE

<sup>2</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarabısar/TÜRKİYE

Corresponding author e-mail: esraseker@hotmail.com

### ÖZ

Gıdalar çok çeşitli mikroorganizma gruplarını içerebilmektedir. Bunlardan bazıları gıda üretiminde kullanılırken, birçoğu ise gıdalarda bozulmaya veya gıda kaynaklı hastalıklara neden olmaktadır. Gıda kaynaklı hastalıklar genel anlamda patojen mikroorganizmalar ya da mikrobiyel toksinler ile kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi ile oluşan ve daha çok gastrointestinal semptomlarla seyreden klinik tablolardır. Bu mikrobiyel kökenli hastalıklar; gıda kaynaklı enfeksiyonlar ve gıda kaynaklı mikrobiyel intoksikasyonlar şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Gıda enfeksiyon ve intoksikasyonlarına neden olan çok sayıda bakteri bulunmakla birlikte, en önemlileri *Salmomella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium spp.*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio spp.*, *Brucella spp.* ve *Aeromonas spp.* olarak bilinmektedir. Bu derlemede, gıda kaynaklı bakteriyel patojenler, patojenlerin bulaşma yolları ve enfeksiyonlardan korunma konusunda kısa bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Epidemiyoloji, Gıda Kaynaklı Bakteriyel Hastalık, Gıda Kaynaklı İntoksikasyon, Gıda Kaynaklı Bakteriyel Patojen

## Food-borne Bacterial Pathogens

### ABSTRACT

Foods can comprise the wide range of microorganism groups. While some of these are used for food production, a great many of these cause food deterioration and food-borne diseases. Food-borne diseases caused by consuming of food contaminated with pathogen microorganisms or microbial toxins are the clinical findings seen mainly gastrointestinal symptoms. These microbial diseases can appear to be food-borne infections and food-borne microbial intoxications. Although a numerous bacteria cause food-borne infections and intoxication, *Salmomella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium spp.*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio spp.*, *Brucella spp.* and *Aeromonas spp.* are known to be the most important pathogens. The aim of this review was to give the short information on food-borne bacterial pathogens, their transmission routes and the protection from infections.

**Key Words:** Epidemiology, Food-Borne Bacterial Disease, Food-Borne Intoxication, Food-Borne Bacterial Pathogen

To cite this article: Sağlam D, Şeker E. Gıda Kaynaklı Bakteriyel Patojenler. *Kocatepe Vet J.* 2016; 9(2): 105-113.

## GİRİŞ

Gıdalar çok çeşitli mikroorganizma gruplarını içerebilmektedir. Bunlardan bazıları gıdalarda normal yaşam fonksiyonlarını sürdürürken, bazıları gıda üretiminde kullanılmakta (örneğin fermente gıdaların üretimi), birçoğu ise gıdalarda bozulmaya veya gıda kaynaklı hastalıklara neden olmaktadır (Schlundt ve ark. 2004, Erkmen 2011). Gıda kaynaklı hastalıklar genel anlamda patojen mikroorganizmalar ya da mikrobiyel toksinler ile kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi ile oluşan ve daha çok gastrointestinal semptomlarla seyreden klinik tablolarıdır (CDC 2007, Carrique-Mas ve Bryant 2013). Gıdaların aracı olduğu bu hastalıklar; gıda kaynaklı infeksiyonlar ve gıda kaynaklı mikrobiyel intoksikasyonlar şeklinde ortaya çıkabilmekte (Scallan ve ark. 2011), bu hastalıklar arasında ise *Salmonella* ve *Campylobacter* türlerinin neden olduğu enteritiser ilk sırayı almaktadır (Scallan ve ark. 2011, Håstein ve ark. 2014). Gıda kaynaklı infeksiyon ve intoksikasyonlarına neden olan çok sayıda bakteri bulunmakla birlikte, en önemlileri ve en sık karşılaşılanları *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp., *Brucella* spp. ve *Aeromonas* spp. olarak bilinmektedir (CDC 2007, Carrique-Mas ve Bryant 2013).

Sunulan derlemede, en önemli ve en sık karşılaşılan gıda kaynaklı bakteriyel patojenler, patojenlerin bulaşma yolları ve infeksiyonlardan korunma konularında kısa bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

### **Salmonella spp.**

*Salmonella* türleri Enterobacteriaceae familyasında yer alan Gram negatif çomak şeklinde, sporsuz, çoğu peritrik flagellaları ile hareketli, fakültatif anaerofilik, katalaz pozitif ve oksidaz negatif özellikte bakterilerdir. Asidik çevre koşullarına kolay uyum sağlayabilen *Salmonella* türleri ısıl işleme duyarlı olup, 60 °C'de 1-6 dakika arasında ölürlür (Quinn ve ark. 2004).

Etkenlerin gıdalara bulaşmasının 3 ana yolu vardır. İlki, *Salmonella* taşıyıcısı hayvanların et ve süt üretiminde kullanılmasıdır. Kanatlı etleri ve yumurtaları, kırmızı et ve süt bulaşmada en önemli gıdalardır. İkinci yol, çevreye ve sulara dışkı, mezbaha atıkları gibi atıkların karışması ile bulaşmanın gerçekleşmesidir. Bu şekilde *Salmonella* türleri sulama suyu ve gübreleme ile ya da çevre aracılığı ile meyve ve sebzelere bulaşabilmektedir. Üçüncü yol ise, çapraz kontaminasyon sonucu etkenlerin çiğ tüketime hazır gıdalara bulaşmasıdır (Finstad ve ark. 2012). Et ve tavuk ürünleri, tavuk karkasları, yumurta, çiğ kıymalar, süt ve süt ürünleri, deniz ürünleri, salatalar, hazır yiyecekler, pastane ürünleri, kuru çorbalar, çocuk mamaları bulaşmada aracı gıdalardır. Bu gıdalarda en sık bulunan türler ise

*Salmonella Enteritidis* ve *Salmonella Typhimurium*'dur (Linam ve Gerber 2007, Finstad ve ark. 2012).

*Salmonella* infeksiyonlarından korunmada, bulaşma yolu ve kaynağına göre farklı kontrol yöntemleri kullanılır. Bunlar; hayvanların *Salmonella* taşıyıcılığının azaltılmasına yönelik önlemler, hayvanların *Salmonella* içermeyen yemlerle beslenmesi, suların dezenfeksiyonu, kesimhanelerde hijyenik koşullar sağlanarak çapraz bulaşmanın önlenmesi, gıdaların işlenmesi sırasında çapraz bulaşmanın önlenmesi, gıdaların uygun sıcaklıkta pişirilmesi, uygun ısıda soğutulması ve soğukta muhafaza edilmesi, kirli ve kırık yumurta kullanımının engellenmesi, işletmede çalışan personelin taşıyıcılık kontrolünün yapılması, işletmede kemirgen ve böceklerin kontrolünün yapılmasıdır (Håstein ve ark. 2014).

### **Escherichia coli O157:H7/H-**

*Escherichia coli* Enterobacteriaceae familyasında yer alan en önemli türdür. Gram negatif, kısa çomak şeklinde, fakültatif anaerofilik, sporsuz bir bakteri olan *E. coli*'nin bazı suşları peritrik flagelları ile hareketlidir. Mezofilik bir bakteri olan *E. coli* 4 °C ile 45 °C arasında üreme gösterir (İzgür 2006).

Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) grubunda yer alan *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> serotipi, insanlarda ciddi ve çoğu kez letal etkili infeksiyonlara neden olmakta, son yıllarda tüm dünyada gıdalar ile bulaşan patojenler arasında en önemlilerinden birisi olarak kabul edilmekte, halk sağlığı açısından büyük bir tehlike oluşturmaktadır (Karmali ve ark. 2010). Dünyanın hemen her yerinde yapılmış çalışmalarda, ruminantlar, özellikle de sağlıklı sığırlar, dışkılarında yoğun ölçüde patojeni bulundurmalarından dolayı *E. coli* O157:H7 infeksiyonları için primer rezervuarlar olarak kabul edilmektedir (Şeker ve Yardımcı 2008, Şeker ve ark. 2010). Bu nedenle de, sığır dışkısı ile kontamine olmuş her türlü gıda maddesi *E. coli* O157:H7 infeksiyonları için potansiyel tehlike taşımaktadır. Dünyanın bir çok bölgesinde görülmüş infeksiyonların büyük çoğunluğu, başta yetersiz pişirilmiş etler ve pastörize edilmemiş çiğ sütler olmak üzere sığır kaynaklı gıdalar ile oluşmuştur (Dean-Nystrom ve ark. 1999, Karmali ve ark. 2010). İnsanlarda infeksiyon nedeni olarak ilk sırayı, kesim sırasında sığır dışkısıyla kontamine olmuş etlerin yeterince pişirilmeden tüketilmesi almaktadır (Dean-Nystrom ve ark. 1999). Diğer bulaşma kaynakları ise; dışkıyla kontamine sebze, meyve, içme ve kullanma suları, pastörize edilmemiş çiğ süt, yoğurt ve meyve suları, kanatlı eti, kuzu eti, domuz eti ve deniz ürünleri olarak bilinmektedir. (Dean-Nystrom ve ark. 1999; Karmali ve ark. 2010).

İnsanlarda infeksiyonun meydana gelebilmesi için gerekli minimal infektif doz 10<sup>1</sup> olarak bildirilmektedir. İnfeksiyonlarda; oldukça tipik ve sert geçen hemorajik kolitis, hemolitik üremik sendrom ve trombotik trombositopenik purpura olmak üzere üç temel klinik bulgu (Padhye ve Doyle 1992, Karmali ve ark. 2010) dışında; hemorajik



sistitis, konvülziyonlar, sepsis ve anemi gibi komplikasyonlar görülebilmektedir (Padhye ve Doyle 1992).

İnfeksiyonlardan korunmada, genel hijyenik kurallara uyulması önem taşımaktadır. Bu amaçla başta kesimhaneler olmak üzere tüm gıda üretimi ve işlenmesi ile ilgili yerlerin, fekal kontaminasyon ve bir gıdadan diğerine çapraz kontaminasyon riskinin azaltılması amacıyla sanitize edilmeleri önerilmektedir. Karkasların su veya uygun solüsyonlarla yıkanmasının da fekal kontaminasyonun engellenmesinde etkili olduğu belirtilmektedir. Ayrıca, özellikle, çiftlik hayvanları yetiştiriciliği yapılan yerlerde periyodik olarak hayvanlardan dışkı örneği alınarak, *E. coli* O157:H7'ye yönelik izolasyon ve fekal saçılım taramaları yapılması önerilmektedir (Karmali ve ark. 2010).

#### **Campylobacter spp.**

*Campylobacter*'ler Campylobacteriaceae familyasının bir üyesi olan Gram negatif, ince, kıvrımlı, spiral ya da martı kanadı görümlü, sporsuz, çoklu flagellaları ile hızlı hareket eden, mikroaerofilik özellikte bakterilerdir. Optimal üreme ısıları 37 °C olmakla birlikte, 42 °C'de üreyenler termofilik *Campylobacter*'ler olarak isimlendirilmektedir (Quinn ve ark. 2004). Sıcaklığa *Salmonella* türlerinden daha duyarlı olan *Campylobacter* türleri, pişirme ve pastörizasyona duyarlıdır. Ayrıca 30 °C'nin altındaki sıcaklıklarda çok yavaş ürerler. Gıda kaynaklı infeksiyonlar açısından en önemli olan türler termofilik *Campylobacter*'ler olarak bilinen *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*, *Campylobacter lari* ve *Campylobacter coli*'dir. Özellikle *C. jejuni* subsp. *jejuni*, insanlarda görülen enteritislerin %90-95'inden sorumludur (Alter ve Scherer 2006).

*Campylobacter* türlerinin en önemli kaynağını yabani ve evcil hayvanlar ile kuşların sindirim sistemi oluşturur. Etkenler kasaplık hayvanların bağırsaklarında bulunabildiğinden kesim sırasında etlere bulaşabilirler. Çiğ ya da yetersiz pişirilmiş kanatlı eti, kıyma, yumurta, mantar, süt ve kontamine sularla sulanmış sebzeler *Campylobacter* infeksiyonlarına neden olan başlıca gıdalardır. *Campylobacter* türleri, soğukta muhafaza, dondurma ve donmuş muhafaza işlemlerine duyarlı olmalarına rağmen, gıdaların yapısına bağlı olarak yaşamlarını sürdürebilirler. Örneğin dondurulmuş kanatlılarda birkaç ay canlı kalabilirler (Alter ve Scherer 2006, Taylor ve Keelan 2006).

*Campylobacter*'lerin infeksiyon oluşturabilmesi için gıda ile birlikte 10<sup>6</sup> kob/g düzeyinde alınmaları gerekir. İnfeksiyonlarda inkübasyon süresi ortalama 2-7 gün arasında değişmektedir. *C. jejuni* suşlarının neden olduğu hastalık; diyare, kusma, baş ağrısı, kas ve karın ağrıları ile kendini gösterir (Taylor ve Keelan 2006).

*Campylobacter* infeksiyonlarının asıl kaynağı hayvanlar olduğundan çiftlikten tüketiciye tüm aşamalarda

gerekli önlemler alınmalı, kesimhanelerde hijyen kuralına dikkat edilmelidir. Gıdaların yeterince pişirildiğinden emin olunmalıdır. Gıdaların hazırlanmasında temiz su kullanılmalı ve düzenli temizlik ve dezenfeksiyon yapılmalıdır (Hâstein ve ark. 2014).

#### **Shigella spp.**

Enterobacteriaceae familyasında yer alan *Shigella*'lar Gram negatif, küçük çomak şeklinde, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, fakültatif anaerofilik bakterilerdir. *Shigella*'lar mezofilik bakterilerdir ve optimum üreme sıcaklıkları 37 °C'dir (Quinn ve ark. 2004). *Shigella* cinsi içerisinde yer alan önemli türler *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Shigella boydii* ve *Shigella flexneri* olmakla birlikte, gıdaları kontamine eden ve daha sık rastlanılanı *S. sonnei*'dir (Baylis ve ark. 2006).

*Shigella* infeksiyonlarının yaklaşık %20'sinde tavuk eti, balıketi veya deniz ürünlerini içeren salatalar, çiğ olarak tüketilen sebzeler, çiğ kıyma, midye ve diğer deniz ürünleri, uygun koşullarda üretilmeyen içme suları gibi gıdalar aracılık eder. Kontaminasyon, özellikle sıcak ülkelerde gıdaların ve suların insan dışkı ile kirlenmesi sonucunda ortaya çıkar. Bu nedenle, bulaşmada en büyük etkenin su ve su kaynakları olduğu kabul edilmektedir. İnsandan insana bulaştığı, gıdalarla da taşınabildiği ancak, gıdaların bu bakterilerin çoğalmasında olanak tanımadığı, sadece vektör olarak rol aldığı da bilinmektedir (Baylis ve ark. 2006, Halkman 2013).

En çok bilinen adıyla Şigellozis veya basillar dizanteri, *Shigella* cinsi bakteriler tarafından meydana getirilen, insanlarda kanlı ishale sebep olan bir infeksiyondur. Etkenlerin hastalık oluşturma dozu genel olarak 10<sup>1</sup>-10<sup>2</sup> hücre/g düzeyindedir. Şigellozis, gıda kaynaklı hastalıkların %10'unu oluşturmada ve yılda 300,000-450,000 kişi bu hastalıklardan etkilenmektedir. *Shigella* infeksiyonlarında en önemli belirtiler; karın ağrısı, ateş, kusma ve kanlı ishaldir. Belirtilerin ortaya çıkma süresi 12 saat ile 50 saat arasında değişmektedir (Baylis ve ark. 2006, Halkman 2013).

*Shigella* infeksiyonlarının kontrolünde gıda işleme alanında çalışan personelin hijyen konusunda eğitilmesi, kanalizasyon sularının tarımsal alanlarda kullanımının önlenmesi, içme sularının kontrolü ve klorlanması, kirli sularda yetmiş deniz ürünlerinin tüketilmesinin önlenmesi, gıdaların hazırlanmasında soğuk zincire dikkat edilmesi ve bulaşmada aracı olan kemirgen, sinek ve böceklerin kontrolü alınabilecek önlemler arasındadır (Hâstein ve ark. 2014).

#### **Yersinia enterocolitica**

*Yersinia enterocolitica* Enterobacteriaceae familyasında yer alan, Gram negatif, kokobasil ya da düzensiz çomaklar şeklinde, sporsuz, kapsülsüz, fakültatif anaerofilik bir bakteridir. Psikrofilik bir bakteri olmakla birlikte 1 °C-40 °C arasında üreyebilmektedir. Optimal üreme ısısı ise 28-30 °C'dir (Prentice 2006).

*Y. enterocolitica* insanlar, vahşi hayvanlar, ev hayvanları ve kesim hayvanlarının bağırsaklarında, zaman zaman da kabuklu ve kabuksuz deniz canlılarında bulunabilmektedir (Quinn ve ark. 2004). Primer hastalık sonrası iyileşen birçok hayvan taşıyıcı olarak kalmakta; dışkıları ile bakterileri büyük miktarda dışarı atmakta ve böylece toprak, dere, göl, su, sebze ve meyveler etken ile kontamine olmaktadır. *Y. enterocolitica* infeksiyonlarına aracı olan gıdalar arasında çiğ veya iyi ısı işlemi görmemiş et, çiğ ya da pastörize süt, süt tozu, krema, yumurta, çiğ sebzeler, iyi ısı işlemi görmemiş deniz ürünleri ve nadiren pastane ürünleri bulunmaktadır (Prentice 2006, Halkman 2013). *Y. enterocolitica*'nın +4 °C'lik buzdolabı ısısında bile üreyebilmesi, buzdolabında bekletilen gıdalar için de kontaminasyon riskidir (Prentice 2006).

*Y. enterocolitica*'nın hastalığa neden olan minimum dozu 10<sup>9</sup> hücre/g'dir. Hastalığın ortaya çıkmasında serotipler önemlidir. İnsanlarda hastalığa neden olan serotipler arasında O:3, O:8, O:9 ve O:5 yer almaktadır. Kontamine besinler ile alınan bakteri, alındıktan 16-48 saat sonra ateş, kusma, karın ağrısı ve ishale neden olur. Belirtiler genellikle 5-14 gün sürer. *Y. enterocolitica* infeksiyonlarına özellikle çocuklarda yetişkinlere oranla daha sık rastlanmaktadır (Prentice 2006).

*Y. enterocolitica*, pastörizasyon sıcaklıklarına, tuza (%5) ve yüksek asitliğe duyarlı bir bakteridir. Fakat buzdolabı sıcaklıklarında dahi üreyebildiği için, kontrolde sanitasyon koşullarına dikkat edilmesi en önemli aşamadır. *Y. enterocolitica* taşıyıcısı olabilecek hayvanların damızlık olarak kullanılmasının önlenmesi, hayvanların kesimi ve taşınması sırasında hijyenik koşulların iyileştirilmesi, personel eğitimi, gıdaların pişirme koşullarına dikkat edilmesi, pastörizasyon koşullarının denetlenmesi, su kaynaklarının insan ve hayvan dışkısıyla bulaşmasının önlenmesi, üretimde kullanılan suyun içme suyu kalitesinde olmasına dikkat edilmesi, alet, ekipman ve personelden kaynaklanabilecek çapraz bulaşmaların önlenmesi oldukça önem taşımaktadır (Prentice 2006).

### ***Vibrio* spp.**

Vibrionaceae familyasına ait *Vibrio*'lar Gram negatif, kıvrık, virgül, eğri çomakçıklar şeklinde, sporsuz, aerofilik ya da fakültatif anaerofilik, polar flagellalı ile hareketli etkenlerdir. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* ve *Vibrio vulnificus* insanlar için en patojen türlerdir (Quinn ve ark. 2004).

Su bakterileri olarak da isimlendirilen etkenler, dünyada yüzey sularında en yaygın bulunan bakterilerdir. *V. cholerae* kontamine yüzey ve içme suları aracılığı ile ölümcül salgınlara neden olur. *V. vulnificus* sıcak deniz sularında rastlanan halofilik bir bakteridir ve çiğ olarak tüketilen istiridye aracılığı ile insanlarda kusma ve ishale neden olur. *V. parahaemolyticus* ise başta deniz kıyıları olmak üzere nehirlerin denize döküldüğü bölgelerde ve fazla

akıntılı olmayan körfez bölgelerinde yaygın olarak bulunmaktadır. (Cheasty 2006, Halkman 2013). Özellikle kirli sular ve bu sulardan avlanılan balık, istiridye, karides ve yengeçler *Vibrio*'ların bulunabileceği riskli gıdalardandır. Etkenler dondurulmuş gıdalarda da canlılığını sürdürebildiği için özellikle çözündükten sonra uygun şekilde muhafaza edilmeyen gıdalarda kolaylıkla üreyebilirler (Håstein ve ark.. 2014).

*V. cholerae* 01 ve *V. cholerae* 0139'un neden olduğu ve bakterinin vücuda alındıktan sonra ince bağırsağa tutunarak kolera toksinini salgılaması sonucu oluşan endemik ve pandemik kolerada, karın bölgesinde kramplar, kusma, enteritis ve sıvı kaybı gözlenir (Cheasty 2006). *V. vulnificus* kontamine deniz ürünlerinin tüketilmesi ile kusma, ishal ve karın ağrısı şeklinde görülen, bağışıklık sistemi baskılanmış ve özellikle kronik karaciğer hastalığı olan bireylerde ise, %50 ölümlü sonuçlanan septisemiye yol açabilir (Cheasty 2006, Halkman 2013). Bakterinin vücuda alınından sonra bağırsaklarda hızla üremesi sonucu gastroenteritis ile ortaya çıkan *V. parahaemolyticus* infeksiyonları ise yüksek ateş, şiddetli karın ağrısı, ishal ve kusma ile seyredir (Cheasty 2006).

*Vibrio* infeksiyonlarından korunmada, midye, istiridye ve yengeç gibi deniz kabuklularının ve balıkların çiğ veya yetersiz ısı işlemi uygulanarak tüketilmesinden kaçınılmalı, çapraz bulaşmanın önlenmesi amacıyla çiğ ve pişmiş ürünler ayrı olarak işlemelidir. Özellikle ılıman mevsimlerde kirli sulardan elde edilen deniz ürünleri ve kirli sularla sulama yapılan sebzelerin kullanımından kaçınılmalı, işletmelerde kullanılan su ve su kaynakları dezenfekte edilmelidir. *Vibrio*'lar mezofilik bakteriler olduklarından, gıdaların buzdolabında saklanması bakterilerin gelişimini engelleyebilir. Kaynatma, merkez sıcaklığının 60 °C olmasını sağlayacak işlemler, pastörizasyon, radyasyon, pH'nın ve su aktivitesinin düşürülmesi gibi uygulamalar genellikle etkenlerin ölmesi için yeterlidir (Håstein ve ark.. 2014).

### ***Aeromonas* spp.**

Aeromonadaceae familyası içerisinde yer alan *Aeromonas* cinsine ait türler; Gram negatif, kıvrık ya da düz çomak şeklinde, genellikle polar flagellaları ile hareketli, kapsülsüz, sporsuz, oksidaz pozitif, fakültatif anaerofilik özellikteki etkenlerdir. Üreme sıcaklıkları 0 °C-42 °C arasında olup, optimal üreme ısıları 28 °C'dir (Quinn ve ark. 2004). *Aeromonas* türleri kesin olarak tanımlanmış iki alt grup içerisinde değerlendirilmektedir. Psikrofilik ve hareketsiz türleri içeren birinci grupta özellikle balıklar için patojenik olan *Aeromonas salmonicida* bulunmaktadır. Mezofilik özellikteki türlerden oluşan diğer grupta ise; hareketli *Aeromonas*'lar olarak bilinen *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* ve *Aeromonas caviae* bulunmaktadır. Hareketli ve mezofilik türler insan ve hayvanlarda çeşitli infeksiyonlardan sorumlu olmaları açısından önem taşımaktadır (Janda ve Abbott 2010).

Doğada yaygın olarak bulunan *Aeromonas*'lar, genellikle tatlı ve tuzlu durgun sularda yaşayabilmekte, sular içinde gömülü bulunan eşyalar üzerinde, distile sularda, musluk suyunda, su depolarında, drenaj borularında ve su oluklarında saptanmaktadır. İnsanlara bulaşma kaynağı genellikle su ve su ürünleridir. Kontamine suların tüketilmesi ile *Aeromonas* gastroenteritlerinde artış olması dikkat çekicidir. Balık, karides ve diğer kabuklu deniz ürünleri, sığır eti, kanatlı eti gibi taze et ve sakatatlar, çiğ süt ve süt ürünleri, kontamine su kullanımına bağlı olarak ıspanak, lahana gibi çeşitli sebzeler, insan patojeni olan *Aeromonas*'ların sık bulunduğu gıdalardır. Epidemiyolojik çalışmalar, son 20 yıldır *Aeromonas* türlerinin gıdalar aracılığıyla bulaşan önemli patojenler arasında bulunduğunu göstermektedir. Özellikle çiğ sütlerde bulunabilen *A. hydrophila*'nın, sütün 5 °C'de 7 gün süreyle muhafaza edilmesi durumunda sütteki miktarının arttığı ve buzdolabı ısısında da virulens faktörlerini sentezlemeye devam ettiği bilinmektedir (Janda ve Abbott, 2010).

Etkenler, insanlarda septisemi, endokarditis, gastroenteritis, selülit, peritonitis, meningitis, otitis, sistitis ve pnömonilere neden olmaktadır. Özellikle *A. hydrophila*'ya bağlı akut gastroenteritler, en sık karşılaşılan vakalar arasında olup, vakalarının büyük bir kısmı çocuklarda ve immunsuprese yaşlı bireylerde gözlemlenmektedir. İnfektif doz  $10^4-10^{10}$  hücre/g arasında olup, belirtiler genellikle *Aeromonas* türlerini içeren gıdaların tüketiminden yaklaşık 24 saat sonra ortaya çıkmaktadır. (Janda ve Abbott 2010).

Gıda kaynaklı birçok patojenin üremesi buzdolabı sıcaklığında engellenebilirken, *Aeromonas*'ların bu sıcaklıkta da üreyebilmeleri nedeniyle, kontrollerinde düşük sıcaklık uygulaması tek başına yeterli olmamakta, vakum paketleme, NaCl<sub>2</sub> kullanımı, su aktivitesi ve pH'nın düşürülmesi gibi faktörlerinin bir arada kullanılması önerilmektedir. Etkenler, pH 5,5'in altındaki ve %5'lik NaCl<sub>2</sub> üzerindeki değerlere, asetik, laktik, tartarik, sitrik asit gibi organik asitlere ve H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl gibi inorganik asitlere duyarlıdır. Bakterinin kontrol altında tutulmasında gıdalara uygulanan pişirme işlemi yeterli olduğu için gıda kaynaklı *Aeromonas* infeksiyonlarının engellenmesinde, yeterli pişirme yapılması, pişirme sonrası bulaşmanın engellenmesi, içme ve kullanma sularının dezenfeksiyonu önemlidir (Janda ve Abbott 2010).

### ***Brucella* spp.**

Brucellaceae familyasında bulunan *Brucella* cinsine ait türler, Gram negatif, küçük kokoid çomak şeklinde, hareketsiz, sporsuz, aerofilik bakterilerdir. Ancak *Brucella abortus* ilk izolasyonunda %5-10 CO<sub>2</sub>'li ortama gereksinim duyar. Optimal üreme ısıları 37 °C olmakla birlikte 10 °C-40 °C arasında da üreyebilirler (Young 2006). *Brucella* cinsi içerisinde yer alan türler; *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella canis*, *Brucella ovis*, *Brucella neotomae*,

*Brucella cetaceae*, *Brucella pinnipedialis*, *Brucella microti* ve *Brucella inopinata*'dır. *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* ve deniz memelilerine ait *Brucella* türleri insanlar için patojen türlerdir. Günümüzde insanlarda Brusellozis hastalığına özellikle çeşitli hayvan türlerinde görülen infeksiyonların kontrol altına alınmadığı ülkelerde sık rastlanmaktadır (Xavier ve ark. 2010).

*Brucella* türleri insanlara sıklıkla deri, konjunktiva, sindirim ve solunum sistemi aracılığı ile bulaşmaktadır (Young 2006). Geniş kitleri etkileyen sindirim sistemi aracılığı ile bulaşma, çiğ süt, çiğ süttten yapılmış peynirler, taze peynirler, krema, et, kemik iliği, sakatat, infekte hayvanların dışkı veya idrarları ile bulaşmış çiğ bitkisel gıdalar ve suların tüketilmesiyle olur (Xavier ve ark. 2010, Godfroid ve ark. 2011).

Brusellozis, insanlarda çok çeşitli belirtileri olan sistemik bir infeksiyondur. İnsanlarda Brusellozise neden olan türler arasında akut ciddi hastalık tablosuna yol açan ve komplikasyonlara neden olan en virulent tür *B. melitensis*'tir (Xavier ve ark. 2010). *B. suis* infeksiyonları ise daha çok subakut ve kronik seyirli, suppuratif destrüktif lezyonlarla seyretme eğilimindedir. *B. abortus* sporadik seyirli ve daha az komplikasyona sahip bir infeksiyon oluştururken, *B. canis* genellikle sinsi başlangıçlı, sıklıkla nüks eden, genellikle kronikleşmeyen bir infeksiyona neden olur (Young 2006, Xavier ve ark. 2010). Hastalık geceleri artan dalgalı ateş, terleme, iştahsızlık, halsizlik, baş ağrısı, miyalji, yorgunluk, titreme ve sırt ağrısı gibi genel belirtilerle başlar (Godfroid ve ark. 2011). Bazı hastalık olgularında hepatomegali, şipenomegali ve lenfadenopati şekillenebilir (Young 2006). Kemik, eklemler, deri, sindirim ve solunum sistemi, kardiovasküler ve sinir sisteminde oluşabilen bozukluklardan dolayı hastalığın klinik görünümü birçok infeksiyöz ve infeksiyöz olmayan hastalığı düşündürülebilir (Young 2006, Godfroid ve ark. 2011). Erkeklerde Brusellozise bağlı sterilite görülürken, kadınlarda *Brucella* türlerinin üremeleri üzerine olumlu etki yapan eritritolün plasentada bulunmaması nedeniyle abortus şekillenmez (Young 2006).

Brusellozisin insidensi ve insanlardaki kontrolü doğrudan hayvanlarda görülme sıklığı ile ilgilidir (Young 2006). Brusellozisin insanlarda kullanılan uygun ticari bir aşısı yoktur. Bu sebeple korunmada etkenin hayvan konakçılarındaki kontrolü oldukça önemlidir. İnfekte hayvanlarla yakın temasta olan tüm insanların hijyenik önlemler alması, iyi pişirilmiş et ve et ürünleri ile iyi ısı işlemi görmüş süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi, mezbaha ve çiftlik çalışanları dahil kamuoyunun hastalık konusunda bilinçlendirilmesi ve hastalık çıkan odalarda hastalığın resmi kurumlara zaman geçirilmeden bildirilmesi korunmada etkili olacak faktörler arasındadır (Godfroid ve ark. 2011).

### ***Listeria monocytogenes***

Listeriaceae familyasında yer alan *Listeria* türleri içerisinde en patojen tür *Listeria monocytogenes* olarak bilinmektedir. Etken, Gram pozitif kısa kokobasil şeklinde, fakültatif anaerofilik, katalaz pozitif, oksidaz negatif, sporsuz ve kapsülsüz bir bakteridir. Optimum üreme sıcaklıkları 37 °C olmakla birlikte, 0-48 °C gibi geniş ısı aralıklarında da yaşamlarını sürdürürler (Lorber 2014).

Doğada yaygın bulunan bakteriler, tatlı ve tuzlu sularda, kanalizasyon sularında, çürümüş veya canlı bitkilerde, ayrıca hastalık belirtisi göstermeyen taşıyıcı insanlarda, koyun, sığır, ördek, hindi ve tavuk dışkılarında, deniz ürünlerinde, sinek ve böcek larvalarında bulunabilirler. *L. monocytogenes* açısından en riskli gıdalar tüketime hazır ve soğukta uzun süre depolanmış, dolayısı ile *L. monocytogenes*'in gelişebildiği ve 10<sup>2</sup> kob/g'dan fazla sayıda *L. monocytogenes* içeren gıdalardır. Buzdolabı sıcaklığında da çoğalabilmesi ve gıdalarda kullanılan pek çok koruyucu maddeden etkilenmemesi nedeniyle salgınlar görülebilmektedir (Halkman 2013). *Listeria* infeksiyonlarında en çok rol oynayan gıdalar çiğ ve pastörize süt, yumuşak peynir, dondurma kreması, çiğ sebze ve meyveler, fermente et ürünleri, salatalar, çiğ veya tütsülenmiş balık, kabuklu deniz ürünleri, tüketime hazır yiyecekler, kıyma ve kümes hayvanları ürünleridir (Lorber 2014). İnsanlarda infeksiyon gelişimi için 10<sup>9</sup> bakteri gerekmektedir. İnkubasyon periyodu genellikle 11-70 gün arasında olup, etken bireylerde grip, menenjit, konjunktivitis ve solunum yolu infeksiyonlarına kadar değişen bir klinik seyir gösterir (Lorber 2014).

*L. monocytogenes* infeksiyonlarının kontrolünde; ham madde ve ambalajlama, gıdanın işlenmesi, depolama ve dağıtım sırasında hijyenik şartlara uyulmalı, sıcaklık, pH gibi koşullar kontrol edilmelidir. İşletmelerde kirliliği ve temiz bölümler birbirlerinden ayrılmalı, çapraz bulaşma riski en aza indirilmelidir. Gıdaların pişirilmesinde merkez sıcaklığın en az 72 °C'ye ulaştığından emin olunmalıdır. Gıdalar soğukta saklanmalı, işletmelerde temizlik ve sanitasyon programları düzenli şekilde uygulanmalıdır (Lorber 2014).

### ***Staphylococcus aureus***

Staphylococcaceae familyasındaki en patojen tür olan *Staphylococcus aureus*, Gram pozitif, kok şeklinde, hareketsiz, sporsuz, bazı suşları kapsüllü, fakültatif anaerofilik özellikte, uygun ortam koşullarında 7-48 °C arasında üreyebilen mezofilik bir bakteridir (Peacock 2006). Etken, insan ve hayvanların deri, üst solunum sistemi, alt ürogenital sistem ve sindirim sistemi mukozalarında kommensal olarak bulunmasının yanı sıra, insan ve hayvanlarda çok çeşitli infeksiyonlar ve besin zehirlenmelerinden en sık izole edilen patojendir (Quinn ve ark. 2004, Peacock 2006). Etkenler hava, toz, kanalizasyon suları, gıda ve gıda ekipmanlarında da bulunabilmektedir (Peacock 2006).

*S. aureus*, başta ısı işlem olmak üzere mikroorganizmaların indirgenmesine yönelik tüm uygulamalara karşı yüksek bir duyarlılık göstermesine rağmen, insanlarda özellikle gıda zehirlenmelerine neden olan ve yüksek derecede ısı stabilitesi gösteren enterotoksinler üretmektedir. *S. aureus* enterotoksinleri, su ve tuzda çözülebilen, ısıya dayanıklı, bir kısmı uzun yıllardır stafilokokal gıda zehirlenmelerinden sorumlu tutulan, antijenik yapıda ekstraselüler proteinlerdir (Argudin ve ark. 2010). Birer süperantijen olarak kabul edilen enterotoksinlerin ilk olarak A, B, C (C1, C2, C3), D ve E olmak üzere beş tipi tanımlanmış, daha sonra bunlara F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R ve U tipleri eklenmiş, son olarak ise S ve T tipleri isimlendirilmiştir. Bunlar arasında, besin zehirlenmelerinde en sık karşılaşılanlar Stafilokokal enterotoksin A ve D'dir (Ortega ve ark. 2010).

*S. aureus* intoksikasyonunun görülebilmesi için uygun koşullarda bulunan *S. aureus*'un çoğalması ve enterotoksin üretmesi, bu enterotoksinin en az 1 mg'ının gıdalarla vücuda alınması gerekmektedir. Gıda kaynaklı intoksikasyonlarda *S. aureus*'un gıdaya bulaşmasındaki en önemli etkenin insan olduğu saptanmıştır. İnsanlar taşıyıcı olarak bu bakteriyi diğer insanlara ve gıdalara bulaştırırlar. Benzer şekilde, bakterinin hava, toz, lağım ve sudan kolaylıkla izole edilebilmesi gıdaların kontaminasyonu için çok sayıda kaynağın bulunduğunu göstermektedir. Etken yarıçıl bir bakteri olmadığından, mastitisli sütler hariç, işlem görmemiş gıdalarda genellikle hastalık yapacak kadar yüksek sayılara kolay erişemez. Bu nedenle, Stafilokokal hastalıklar daha çok işlem gördükten sonra işletme personelinden ya da ekipmanlardan dolayı kontamine olmuş gıdalardan kaynaklanmaktadır. İntoksikasyona neden olan gıdaların ortak özelliği; çoğunlukla pişirilmiş, elle hazırlanan ve tüketime kadar buzdolabında muhafaza edilen gıdalar olmalarıdır (Argudin ve ark. 2010). Tüketime hazır hale getirilmiş et ürünleri, tavuk ve benzeri yiyecekler, jambon gibi ısı işlem görmüş ve tütsülenmiş etler, şarküteri ürünleri, pişmiş yumurta ve yumurta ile hazırlanan ürünler, süt ve süt ürünleri, dondurma, pasta kremaları, mayonezli salatalar, mastitisli hayvan sütlerinden çiğ olarak yapılan peynirler ve ezme haline getirilmiş ürünler Stafilokokal intoksikasyonlarda aracı gıdalardır (Argudin ve ark. 2010, Halkman 2013).

*S. aureus*'un enterotoksinleri aracılığı ile oluşturduğu hastalık, gıdanın tüketiminden 1-7 saat sonra bulantı, kusma, mide krampları ve ishal şeklinde ortaya çıkmaktadır (Argudin ve ark. 2010).

*S. aureus*'un kontrol edilmesinde en önemli nokta, ısı işlem gördükten sonra gıda maddelerinin hızla soğutulması ve buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilmesidir. Diğer önemli nokta ise personel hijyenidir. Patojen, ısı işlem görmüş gıdalarda genellikle işletme personelinden geçtiği için çalışanlar

besinlerin hazırlanması, pişirilmesi ve servisi sırasında hijyen kurallarına uymalıdır. Ayrıca işletmede çapraz bulaşma noktaları sık sık kontrol edilmelidir (Håstein ve ark. 2014).

### ***Bacillus cereus***

Bacillaceae familyası *Bacillus* cinsine ait bir bakteri olan *Bacillus cereus*, Gram pozitif, çomak şeklinde, sentral ve subterminal lokalizasyonda elipsoidal sporlara sahip, peritrik flagellası ile genellikle hareketli, aerofilik özellikte, kemoorganotrofik bir bakteridir. Üreme ısısı, 10-45 °C olmakla birlikte, optimal üreme ısısı 37 °C; spor oluşumu için gerekli minimum sıcaklık -1 °C, maksimum sıcaklık 59 °C ve optimum sıcaklık ise 30 °C'dir (Logan ve Rodríguez-Díaz 2006).

*B. cereus* enterotoksin ve emetik toksin olmak üzere infeksiyonların patogeneğinde önemli iki farklı toksin oluşturur. İnsanlarda diyare tipi sendroma neden olan, ısıya dayanıklı protein yapıdaki enterotoksin, gıda zehirlenmelerinden sıklıkla izole edilir. Emetik toksinse kusma tipi sendroma neden olan, peptid yapıda ve ısıya duyarlı bir toksindir (Logan ve Rodríguez-Díaz 2006).

Etkenin toprak kökenli olması nedeniyle tarla ve bahçe ürünlerinde etkene sıklıkla rastlanır. Çiğ sütlerle özellikle sağım sırasında bulaşan *B. cereus*, psikrotrof özelliği nedeni ile soğutulmuş olsa dahi çiğ sütte gelişebilir ve ekstraselüler proteolitik enzimler salgılar. Sütün UHT ile sterilizasyonu sırasında sporlu bakteriler ölse dahi, önceden salgılanan bu enzimler imha olmazlar (Halkman 2013). *B. cereus* ile kontamine olmuş gıdalar pişirildikten sonra yeterince ve hızlı olarak soğutulmadıklarında veya gıdaların hazırlanması ile tüketimi arasındaki süre uzadığında, mikroorganizma çoğalıp, gıda zehirlenmesine neden olabilecek düzeyde toksin oluşturabilir (Kaleli ve Durlu-Özkaya 2000). Gıda zehirlenmelerinin oluşabilmesi için gıdadaki bakteri sayısının 10<sup>6</sup> kob/g olduğu belirtilmektedir (Logan ve Rodríguez-Díaz 2006). *B. cereus*'la ilişkili gıda zehirlenmelerine aracı olan gıdalar arasında pişmiş pirinç, makarna, et, kümes hayvanları etleri, sebze yemekleri, patates püresi, çeşitli çorbalar, pudingler, baharat ve soslar sayılabilir. Bunlardan, kızartılmış ya da pişirilmiş pirinç, şehriye, pizza hamuru ve makarnalar genellikle emetik sendroma; mısır ve tahıl içeren gıdalar, patates püresi, sebzeler, kıyma, puding ve çorbalar ise genellikle diyare tipi sendroma neden olan gıdalardır (Kaleli ve Durlu-Özkaya 2000).

Genellikle, pişirilmiş ve pişirildikten sonra sıcak olarak tüketilen gıdalar, güvenilir olarak kabul edilmektedir. Gıdaların pişirilmesi sırasında uygulanan sıcaklıkların vejetatif bakteri ile birlikte sporları da öldüğü kabul edilmekte, ancak 100 °C'nin altındaki sıcaklıklarda sporlar canlı kalabilmektedir. Sporların aktivasyonlarının önlenmesi için; pH ve aw uygulamaları etkili olmakta, gıdaların sıcak olarak servis edilmesi halinde ise, gıdanın sıcaklığının 60

°C'nin üzerinde olmasına dikkat edilmelidir (Logan ve Rodríguez-Díaz 2006).

### ***Clostridium* spp.**

Clostridiaceae familyasında bulunan *Clostridium*'lar, Gram pozitif uzun çomak şeklinde, hem *in vivo* hem *in vitro* şartlarda sporlu, çoğu zorunlu anaerofilik, bir kısmı aerotolerant özellikte, *Clostridium perfringens* hariç kapsülsüz ve hareketli etkenlerdir (Quinn ve ark. 2004). Bugün bilinen 130 civarında *Clostridium* türü bulunmakta olup, 30 kadarı insan ve hayvanlar için patojendir. Bu patojenlerden gıda kaynaklı olanları ise *C. perfringens* ve *Clostridium botulinum*'dur. *Clostridium*'lar, doğada, toprakta, taze sular ve deniz sularında, atıklarda, omurgalı ve omurgasızların gastrointestinal sisteminde doğal olarak bulunurlar (Poxton 2006).

Aerotolerant özellikteki *C. perfringens*'in doğada çok yaygın bir bakteri olması gıdalara bulaşmasını da kaçınılmaz kılmaktadır. Etkenin patojenitesinde etkili faktör, alfa, beta, epsilon ve iota olarak isimlendirilen letal etkili ekstraselüler toksinlerdir. Sentezlenen bu toksin tiplerine göre de etken; A, B, C, D ve E serotiplerine ayrılmakta, Tip A ve daha az oranda Tip C insanlarda gıda zehirlenmelerine neden olmaktadır (Poxton 2006). *C. perfringens* için bir iki gün önce buzdolabında tutulup sonrasında yeniden ısıtılıp tüketilen gıdalar, ızgara, kaynatılmış veya hafif kızartılmış et, et suyu, sosis, etli börekler ve salatalar en önemli kaynaklardır (Poxton 2006, Halkman 2013). Türkiye'de sucuk *C. perfringens* açısından oldukça riskli bir gıda olarak gösterilmektedir. Etlar büyük parça halinde pişirildiğinde, ısının transferi ve pişikten sonraki soğuma yavaş olduğundan, ısıtma ile ortamdan oksijenin uzaklaşması sonucu oluşan anaerobik koşullar ortamı etkenin gelişmesine ideal bir hale getirir. Toprak kökenli ve zorunlu anaerofilik bir bakteri olan *C. botulinum* ise hem hayvansal hem de bitkisel gıdalarda bulunabilen bir bakteridir. Patojen; et ve ürünlerinde, balıklarda, düşük asitli sebze konservelerinde, balda, toprak kökenli bir bakteri olmasından dolayı da pek çok sebze ve meyvede doğal olarak bulunabilir. Özellikle yeterli ısı işlem görmeden yapılan ve tüketim öncesi pişirilmeden yenilen ev yapımı konserveler ve et ürünleri botulizme neden olan gıdaların başında gelir. Salata olarak kullanılan ev yapımı bezelye konservesi, evlerde tuz-sirke karışımına yatırılarak ve baharatla çeşnilendirilerek hazırlanan sebzeler, çiğ jambon, tütülenmiş veya fermentasyon yolu ile lezzetlendirilmiş balıklar, buharla az pişirilen balıklar, salamura et ürünleri, ciğer ezmesi, çeşitli salata sosları gibi yiyecekler botulizme aracı olan gıdalardır (Halkman 2013).

*C. perfringens*'e bağlı gıda zehirlenmesi enterotoksijenik *C. perfringens*'in vejetatif halinin uygun gıdada çoğalmasını takiben gıdalla birlikte yüksek sayıda alınması, etkenlerin çoğunun mide asidinden etkilenmeden ince bağırsağa geçerek burada çoğalması, spor oluşumu ve enterotoksin

açığa çıkması ile gelişir. Gıdanın tüketiminden 8-24 saat sonra akut karın ağrısı, mide bulantısı ve ishal belirtileri ile başlayan intoksikasyonda, 24-48 saat arası iyileşme görülür (Halkman 2013). *C. botulinum*'un neden olduğu botulizmde en önemli faktör, etkenin, sindirim sistemi üzerine etkili, yaklaşık 0,1 mg'ı bir insanı öldürmeye yetebilen, bilinen en güçlü ekzotoksin olan botulismus toksindir. *C. botulinum* intoksikasyonunun görülebilmesi için uygun koşullarda bulunan *C. botulinum*'un çoğalması, toksin üretmesi ve üretilen toksinin gıdalarla vücuda alınması gerekmektedir (Poxton 2006). Belirtiler gıdanın tüketiminden 2-8 saat sonra başlayıp 8 güne kadar uzayabilmektedir. Toksin önce baş ve boyun bölgesindeki sinir sistemini etkilemekte ve bunun sonucunda çift ve bulanık görme, konuşma güçlüğü, yutkunma güçlüğü, ağız kuruluğu, solunum güçlüğü ve buna bağlı ölüm meydana gelebilmektedir (Shapiro ve ark. 1998).

*C. perfringens*'in kontrolünde ısı işlem görmüş gıdalarda işlemin 70 °C'nin üzerinde yapılması, ısı işlem sonrasında bulaşmanın engellenmesi için sanitasyon kurallarına uyulması, gıdaların hızla soğutulması buzdolabında saklanması, tekrar ısıtma yapılacağı zaman vejetatif bakterinin ölmesini sağlayacak 60 °C'nin üzerinde ısı işlem uygulanması önemlidir (Halkman 2013). *C. botulinum*'un kontrolünde ise, gıda maddelerinde etken kontaminasyonunun önlenmesi, bakterinin gelişmesi ve toksin üretiminin engellenmesi, bakteri veya toksinin elimine edilmesi ve şüpheli gıdaların tüketilmemesi önem taşımaktadır. pH değeri 4,6'nın altında olan asidik gıdalarda *C. botulinum* gelişimi olmamakla beraber, patojenin inhibisyonu için, pH değeri 4,6'nın üzerinde olan gıdalara en az 121 °C'de 3 dakikalık ısı işlem uygulanmalıdır. *C. botulinum* gelişebilecek gıdalar, pH, tuz, koruyucu gibi antimikrobiyal uygulamalar ile korunmalıdır (Shapiro ve ark. 1998).

## SONUÇ

Gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesi, ham ürünlerin ve hazırlanmış besinlerin çiftlikten sofraya getirildiği tüm aşamalarda dikkatlice işlenmesine ve besinlere bulaşmayı önleyen ve azaltan teknolojilere bağlıdır. Patojen mikroorganizmaların özgün karakterleri, teknolojik uygulamaların seçiminde ve potansiyel tehlike olasılıklarının değerlendirilmesinde büyük önem taşımaktadır. Gıdaları patojen mikroorganizmalardan korumak için uygulanan teknolojiler arasında en sık kullanılanlar; ısı işlem, düşük sıcaklık, düşük su aktivitesi, modifiye atmosfer ve radyasyon uygulamaları ile antimikrobiyal madde kullanımıdır. Günümüzde ticari amaçlı gıda üretimi yapan işletmelerin HACCP, iyi üretim uygulamaları ve iyi hijyen uygulamaları gibi sistemleri uygulaması, gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların yol açtığı

infeksiyonların minimum seviyeye indirgenmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

## KAYNAKLAR

- Alter T, Scherer K.** Stress response of *Campylobacter* spp. and its role in food processing. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2006; 53: 351-357.
- Argudin MA, Mendoza MC, Rodicio MR.** Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Toxins. 2010; 2: 1751-1773.
- Baylis CL, Penn, CW, Thielman NM, Guerrant RL, Jenkins C, Gillespie SH.** *Escherichia coli* and *Shigella* spp. In: Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Ed; Gillespie SH, Hawkey PM, John Wiley&Sons Ltd., England. 2006; pp. 347-365.
- Carrique-Mas JJ, Bryant JE.** A review of foodborne bacterial and parasitic zoonoses in Vietnam. Eco Health. 2013; 10: 465-489.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention).** *Bacterial Foodborne and Diarrheal Disease National Case Surveillance. Annual Report, 2005.* Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2007.
- Cheasty T.** *Vibrio* spp. In: Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Ed; Gillespie SH, Hawkey PM, John Wiley&Sons Ltd., England. 2006; pp. 407-417.
- Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, O'brien AD, Moon HW.** Bovine infection with *Escherichia coli* O157:H7. In: *Escherichia coli* O157 in Farm Animals, Ed; Stewart CS, Flint HJ, CABI Publishing, Wallingford, UK. 1999; pp. 51-58.
- Erkmen O.** Gıda Mikrobiyolojisi. 3. Baskı, Eflatun Yayınevi, Ankara. 2011; pp. 40-172.
- Finstad S, O'bryan CA, Marcy JA, Crandall PG, Ricke SC.** *Salmonella* and broiler processing in the United States: Relationship to foodborne salmonellosis. Food Res Int. 2012; 45: 789-794.
- Godfroid J, Scholz HC, Barbier T, Nicolas C, Wattiau P, Fretin D, Whatmore AM, Cloeckert A, Blasco JM, Moriyon I, Saegerman C, Muma JB, Al Dahauk S, Neubauer H, Letesson J.** Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. Prev Vet Med. 2011; 102: 118-131.
- Halkman AK.** Gıda mikrobiyolojisi II ders notları. Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara. 2013; pp. 89.
- Håstein T, Hjeltnes B, Lillehaug A, Skare JU, Bertssen M.** Food safety hazards that

occur during the production stage: challenges for fish farming and the fishing industry. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2014; 25: 607-625.

- İzgür M.** Enterobakteri Enfeksiyonları (Enterobacteriaceae). In: Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). İlke-Emek Yayınları, Ankara. 2006; pp. 109-127.
- Janda JM, Abbott SL.** The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenity, and infection. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23: 35-73.
- Kaleli D, Durlu-Özkaya F.** *Bacillus cereus*. In: Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ed; Akçelik M, Ayhan K, Çakır İ, Doğan HB, Gürgün V, Halkman AK, Kaleli D, Kuleaşan H, Durlu-Özkaya F, Tunail N, Tükel Ç, Sim Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara. 2000; pp. 395-401.
- Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM.** Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol.* 2010; 140: 360-370.
- Linam WM, Gerber MA.** Changing epidemiology and prevention of *Salmonella* infections. *Pediatr Infect Dis J.* 2007; 26: 747-748.
- Logan NA, Rodríguez-Díaz M.** *Bacillus* spp. and related genera. In: Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Ed; Gillespie SH, Hawkey PM, John Wiley&Sons Ltd., England. 2006; pp. 139-158.
- Lorber B.** *Listeria monocytogenes*. 2014. Erişim: [<http://www.antimicrobe.org/new/b111.asp>]. Erişim tarihi: 26.05.2015.
- Ortega E, Abriouel H, Lucas R, Gálvez A.** Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. *Toxins.* 2010; 2: 2117-2131.
- Padhye NV, Doyle MP.** *Escherichia coli* O157:H7: Epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. *J Food Protect.* 1992; 55: 555-565.
- Peacock S.** *Staphylococcus aureus*. In: Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Ed; Gillespie SH, Hawkey PM, John Wiley&Sons Ltd., England. 2006; pp. 73-98.
- Poxton IR.** Other *Clostridium* spp. In: Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Ed; Gillespie SH, Hawkey PM, John Wiley&Sons Ltd., England. 2006; pp. 567-574.
- Prentice MB.** *Yersinia* spp. In: Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Ed; Gillespie SH, Hawkey PM, John Wiley&Sons Ltd., England. 2006; pp. 397-406.
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC.** Veterinary Microbiology and Microbial Diseases, Blackwell Publishing Professional, Iowa. 2004.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M, Roy SL, Jones JL, Griffin PM.** Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17: 7-15.
- Schlundt J, Toyofuku H, Jansen J, Herbst SA.** Emerging food-borne zoonoses. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2004; 23: 513-533.
- Shapiro RL, Hatheway C, Swerdlow DL.** Botulism in the United States: a clinical and epidemiologic review. *Ann Intern Med.* 1998; 129: 221-228.
- Şeker E, Kuyucuoğlu Y, Sareyyüpoğlu B, Yardımcı H.** PCR detection of Shiga toxins, enterohaemolysin and intimin virulence genes of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from faeces of Anatolian water buffaloes in Turkey. *Zoonoses Public Health.* 2010; 57: e33-e37.
- Şeker E, Yardımcı H.** First isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from faecal and milk specimens from Anatolian water buffaloes (*Bubalus bubalus*) in Turkey. *J S Afr Vet Assoc.* 2008; 79: 167-170.
- Taylor DE, Keelan M.** *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. In: Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Ed; Gillespie SH, Hawkey PM, John Wiley&Sons Ltd., England. 2006; pp. 485-502.
- Xavier MN, Paixão TA, Hartigh AB, Tsolis RM, Santos RL.** Pathogenesis of *Brucella* spp. *Open Vet Sci J.* 2010; 4: 109-118.
- Young EJ.** *Brucella* spp. In: Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Ed; Gillespie SH, Hawkey PM, John Wiley&Sons Ltd., England. 2006; pp. 265-271.

## Biyojen Aminler ve Etkileri

Mürüvvet DÜZ<sup>1\*</sup>, A. Fatih FİDAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Afyonkarahisar/TÜRKİYE

<sup>2</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Afyonkarahisar/TÜRKİYE

Corresponding author e-mail: muruvvetduz@aku.edu.tr

### ÖZET

Aminoasit dekarboksilasyonu sonucu oluşan biyojen aminler, hem vücudumuzda sentezlenmekte hem de gıdalarla alınabilmektedir. Meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunmalarının yanında proteince zengin ve fermente edilmiş gıdaların olgunlaşması veya bozulması sonucu da ortaya çıkabilmektedirler. Gıdalarda aminoasitleri dekarboksilaz enzimi ile indirgeyen ve biyojen amin oluşumuna neden olan birçok mikroorganizma izole edilmiştir. Biyojen aminler, büyük ölçüde sucuk gibi et ürünleri yanı sıra balık ürünleri, peynir, bira, şarap ve turşu gibi fermente gıdalar ve maya ekstraktları gibi pek çok üründe bulunmaktadır. Besin hijyeni ve sağlıklı beslenme bilincinin artmasıyla birlikte gıdalardaki biyojen amin varlığı gıda bozulması ve gıda güvenliği açısından tüketiciler için büyük önem taşımaya başlamıştır. Biyojen aminler gıdalarda iki nedenle önem arz etmektedirler: Bunlar biyojen amin miktarının kalite indikatörü olarak kabul ediliyor olması ve sağlık açısından riskli toksik etkilerinin bulunmasıdır. Bu çalışmada biyojen aminlerin oluşumu ve sağlığa etkileri incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyojen Amin, Dekarboksilasyon, Histamin, Tiramin

### Biogenic Amines and Effects

#### ABSTRACT

Amino acid decarboxylation caused by biogenic amines, as well as to synthesize in our bodies and can be taken with food. Besides naturally present in fruits and vegetables protein-rich food and maturation of the fermented or degradation as a result may occur. Many microorganisms that cause reducing amino acid with decarboxylase enzyme and formation of biogenic amine was isolated in foods. Biogenic amines, largely meat products such as sausages and fish products, including cheese, beer, wine and fermented foods, pickles, yeast extract and are present in many products. Due to the increase of consciousness of food hygiene and healthy nutrition, the presence of biogenic amines in foods is increasing emphasis on both food security and food spoilage for consumers. Biogenic amines in foods are important for two reasons. These are the amount of biogenic amines is considered as quality indicators and the presence of risky toxic health effects. In this study the formation and the health effects of biogenic amines were investigated.

**Key Words:** Biogenic Amines, Decarboxylation, Histamine, Tyramine

To cite this article: **Düz M, Fidan AF.** Biyojen Aminler ve Etkileri. *Kocatepe Vet.J. 2016; 9(2): 114-121.*



## GİRİŞ

Biyojen aminler canlı hücrelerde önemli metabolik aktiviteye sahip moleküllerdir (Bardöcz 1989). Bu aminlerin “biyojen aminler” olarak adlandırılmalarının nedeni, canlı organizmanın aktivitesi sonucu oluşmalarıdır. Aminoasitlerin karboksil kökünün parçalanmasıyla söz konusu aminoasitin amini oluşur. Bu olaya dekarboksilasyon, ilgili enzime ise dekarboksilaz adı verilir (Sinell 1978). Dekarboksilasyondan sorumlu enzimler hayvansal ve bitkisel dokularda bulunabilir. Diğer yandan mikroorganizmalar tarafından da üretilebilir (Yerlikaya ve Gökoğlu 2002). Gıdalarda mikrobiyal aktivite sonucunda oluşan biyolojik aminler daha düşük molekül ağırlığına sahiptir. Hemen hemen tüm besinler serbest amino asitler veya proteinleri içerir. Mikrobiyal veya biyokimyasal aktivite şartları sağlandığında biyojen amin oluşumu beklenen bir olgudur (Ten Bring ve ark. 1990).

Biyojen aminler insan ve hayvanlarda fizyolojik fonksiyonların yerine getirilmesinde önemli rol oynamaktadırlar. DNA, RNA ve protein sentezinin neredeyse tüm basamaklarında rol aldıkları için hücre büyüme ve çoğalmasında önemlidir (Yeğin ve Üren 2008). Bazı aminlerin insanlarda hormon olarak, kan sirkülasyonunun regülasyonunda transmitter madde olarak sinir sisteminde ve düz kaslarda önemli rolleri vardır (Graf 1992).

Gıdalarda ise biyojen aminler iki nedenden dolayı önem arz etmektedirler. Birincisi, biyojen amin miktarının kalite indikatörü olarak kabul edilir olması diğeri ise sağlığa etkili toksik etkilerinin bulunmasından ileri gelmektedir. Gıdaların mikrobiyal bozulması sırasında dekarboksilaz aktivitesi arttığından biyojen aminlerin varlığı gıda bozulmasının göstergesi olması açısından önem taşımaktadır (Bardöcz 1995).

Bu çalışmada biyojen aminlerin oluşumu ile fizyolojik ve toksikolojik etkileri ele alınarak güncel literatürler eşliğinde tartışılmıştır.

### BIYOJEN AMİNLERİN OLUŞUMU

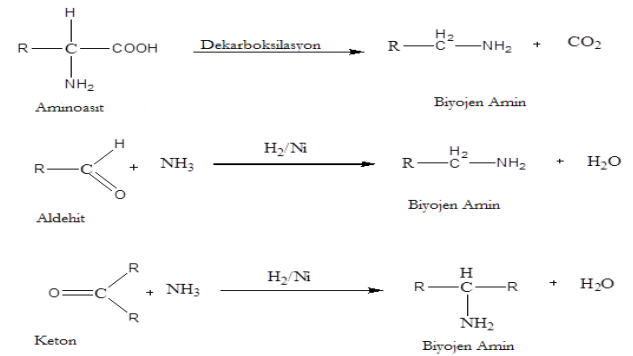
Protein yıkımı ile oluşan biyojen aminler temel olarak, azottan serbest metabolizma ürünlerinin aminleşmesi, amino asitlerin sekonder dönüşümü, azotlu bileşiklerin ve azotlu parçalanma ürünlerinin hidrolize olmaları ile meydana gelmektedir. (Gökoğlu ve Varlık 1995).

İçerdikleri azot sayısına göre ise biyojen aminler; monoaminler, diaminler ve poliaminler olarak gruplandırılırlar (Özdestan 2009). Diğer yandan biyojen aminler kimyasal özelliklerine göre aromatik ve heterosiklik aminler, alifatik di-, tri- ve poli-aminler ve alifatik uçucu aminler olmak üzere üç gruba ayrılmaktadırlar (Mafra ve ark. 1999). (Şekil 1.) (Azim 2002).

Kimyasal Yapılarına Göre		
Aromatik ve Heterosiklik Aminler	Alifatik Di-, Tri- ve Poliaminler	Alifatik Uçucu Aminler
Histamin Tiramin B-feniletılamin Triptamin Serotonin	Putresin Kadaverin Agmatin Spermin Spermidin	Etilamin Metilamin İzoamilamin Etanolamin
İçerdikleri Azot Sayısına Göre		
Monoaminler	Diaminler	Poliaminler
Metilamin Etilamin İzopentilamin Etanolamin B-feniletılamin Tiramin	Histamin Triptamin Putresin Kadaverin Serotonin	Agmatin Spermin Spermidin

Şekil 1: Biyojen Aminlerin Sınıflandırılması (Azim 2002).  
Figure 1: Classification of Biogenic Amines (Azim 2002).

Biyojen aminlerin oluşumu içerisinde en önemli olan, amino asitlerin dekarboksilasyonu sonucu şekillenen sekonder değişikliklerdir. Bu olay doku ya da mikrobiyal kaynaklı dekarboksilaz enzimleri aracılığı ile meydana gelmektedir. Gıdalarda mikrobiyal parçalanma sonucu oluşan dekarboksilasyona daha sık rastlanmaktadır (Vatansever 2004). Fermente gıdalarda, proteinlerin yıkılmasına bağlı olarak amin oluşumu Şekil 2.'de gösterildiği gibi aldehit ve ketonların aminasyonu, spesifik amino asitlerin mikrobiyal dekarboksilasyon yolu ile sekonder dönüşümü ya da azotlu bileşiklerin ve azotlu parçalanma ürünleri gibi nitrojen içeren komponentlerin hidrolizi şeklinde meydana gelmektedir (Leuschner ve ark. 1998, Nout 1994, Silla-Santos 1996, Sözbilir ve Bayşu 2008, Shalaby 1996).

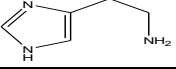
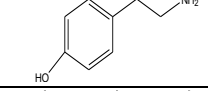
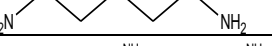
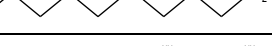

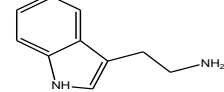
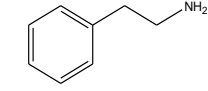
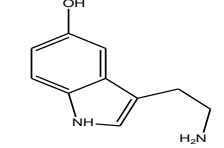
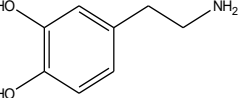
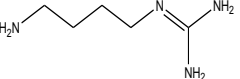


Şekil 2. Biyojen Aminlerin Oluşum Mekanizması (Silla-Santos 1996).

Figure 2. Formation Mechanism of Biogenic Amines (Silla-Santos 1996).

Gıdalarda oluşan başlıca biyojen aminler; Putresin, Kadaverin, Histamin, Tiramin, Triptamin, 2-feniletılamin, Spermin, Spermidin, Metilamin,

Agmatin, Etilamin ve Etanolamin'dir (Shalaby 1996). (Şekil 3.) (Toy 2010). Histidin, Lizin ve Ornitin amino asitleri bakteriyel faaliyetlerle sırasıyla Histamin, Kadaverin ve Putresin'e dönüşebilmektedir. Tiramin, Triptamin ve  $\beta$ -feniletilamin gibi biyojen aminlerde yine bakteriyel dekarboksilasyon yoluyla sırasıyla Tiyrosin, Triptofan ve Fenilalanin aminoasitlerinden oluşmaktadır. Arjinin aminoasidi Agmatin'e kolayca dönüşebilmekte veya bakteriyel aktivitenin bir sonucu olarak Ornitine indirgenebilmektedir. Ornitin ise dekarboksilasyon yoluyla Putresine dönüşmektedir (Özoğul ve ark. 2004).

Histamin (HİS)	
Tiramin (TYR)	
Kadaverin (CAD)	
Spermidin (SPD)	
Spermin (SPM)	
Triptamin (TRPT)	
Feniletilamin (PHEN)	
Serotonin (SER)	
Dopamin (DOP)	
Agmatin (AGM)	

**Şekil 3:** Biyojen Amin Çeşitleri ve Kimyasal yapıları (Toy 2010).

**Figure 3.** Biogenic Amines Type and Chemical Structure (Toy 2010).

Poliaminler ve Putresin canlının büyüme ve gelişmesi için zorunludur. Putresin, Kadaverin, Spermin ve Spermidin gibi biyojen aminlerin nükleik asitlerin regülasyonu, protein sentezi ve membranların stabilizasyonunda önemli olduğuna değinilmektedir. Serotonin, Histamin ve Tiramin gibi diğer aminler sinir sisteminin çalışmasında ve kan basıncının kontrolünde gereklidir (Ten Bring ve ark. 1990). Histamin'in, vücutta ki en önemli etkisi, kalp ve kaslardır. Kalbi uyarabilir ekstrasvasküler yüzey kaslarının kasılmasına veya gevşemesine neden olabilir ve gastrik asit salgılanmasını kontrol edebilir.

Histaminin organizmada lokal kanamaları regüle edici olarak da etki gösterdiği bildirilmiştir. (Stratton ve ark. 1991).

Histamin'in aksine Tiramin vücutta önemli bir metabolit değildir ve çok düşük konsantrasyonlarda bulunur, genellikle kan basıncının artmasına, kalp çarpıntısına ve baş ağrısına neden olur (Bakırcı 2000, Joosten 1988).

Putresin, Kadaverin ve Agmatin insanlarda histamin oksidasyonunu engelleyerek histamin toksisitesini arttırmaktadır. Histamin, Triptamin, Tiramin ve  $\beta$ -feniletilamin gibi biyolojik aktif aminler, psikoaktif veya vasoaktif etkileri nedeniyle önemlidir (Ölmez 2000). Serotonin kan basıncında etkili olmakla birlikte ve barsak mukozasında oluşmakta ve peristaltik hareketleri arttırmaktadır (Graf 1992, Yerlikaya ve Gökoğlu 2002).

Spermin, Spermidin ve Putresin gibi poliaminler yapılarındaki amin grubu sayısı ile orantılı olarak çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu önleyici bir antioksidan özeliğine sahiptirler. Tiramin de, yapısındaki amin ve hidroksil grupları nedeniyle güçlü bir antioksidan etkiye sahiptir (Ölmez 2000).

Biyojen aminler bu fonksiyonları yanında; aroma ve lezzet maddeleri olarak kullanılabilir, enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarında rol almaktadır. Nükleik asit, alkaloid ve protein sentezinde azot kaynağı olarak kullanılmakta, nitritle reaksiyona girerek kanserojenik nitrozaminleri oluşturmaktadırlar (Ölmez 2000, Uzaşçı 2011).

Decarboksilasyonların hemen hepsinde mikrobiyel proteoliz gözlenmektedir. Bu nedenle proteinli yapılarda biyofiziksel, kimyasal, biyokimyasal ve mikrobiyolojik değişimlerde biyojen aminlerin oluşumu göz önünde bulundurulmalıdır. Çünkü proteince zengin ve fermente gıdaların elde edilmesi, işlenmesi, hazırlanması ve depolanması sırasında bu tip aminler oluşabilmektedir (Rice ve ark. 1976, Yerlikaya ve Gökoğlu, 2002).

Gıdalarda biyojen aminler mikrobiyel aktivite sonucu oluştuklarından ve aynı zamanda ısıya karşı dirençli olduklarından birçok çalışmada taze ve işlenmiş et ürünlerinin kalitesinin belirlenmesinde kullanılabilir yararlı bir ölçüt olarak ileri sürülmüşlerdir. Böylelikle, ürünlerin biyojen amin düzeyi, ürünü oluşturan materyalin kalitesinin ve üretim sırasındaki hijyenik şartların bir göstergesi olabilir (Vatansever 2004).

Biyojen aminler, balık ve balık ürünleri, et ve et ürünleri, peynir, çikolata, fermente alkollü içecekler gibi gıdalarda işleme, olgunlaşma ve depolama sırasında, proteinlerin biyokimyasal ve/veya mikrobiyolojik etkileşimlerine bağlı olarak serbest kalan aminoasitlerin dekarboksilasyonu sonucu oluşabilmektedir (Ergen 2006, Silla-Santos 1996).

Mikroorganizmaların biyojen amin oluşturabilmeleri için gerekli koşullar şu şekildedir: serbest amino asitlerin bulunması, dekarboksilaz pozitif mikroorganizmaların bulunması, bu

mikroorganizmaların gelişebileceği ve dekarboksilaz enziminin aktif olabileceği pH, sıcaklık, tuz konsantrasyonu gibi uygun ortamın sağlanmış olması gerekmektedir (Silla-Santos 1996). Starter kültürlerin varlığı da önemli faktörlerdendir (Çolak ve Uğur 2002).

Gıdalarda 20-37°C 'lık uygun ısı ve 5-7 pH aralığında yeterli miktarda amin oluşturabilen mikroorganizma olması durumunda amin oluşumunun hızlandığı, ancak tuz oranının %5'ten fazla olması durumunda ise biyojen aminlerin oluşumunun azaldığı bildirilmektedir (Aygün 2003).

Gıdalardaki aminlerin miktarı ve çeşitliği, ürünün yapısına ve mikroorganizma varlığına bağlıdır (Dadáková ve ark. 2009). *Enterobacteriaceae* familyasındaki bakterilerin çoğu, *Pediococcus*, *Enterococcus* ve *Lactobacillus* türü bakteriler biyojen amin oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir (Halasz ve ark. 1994).

Gıdalarda ki biyojen amin derişimleri hijyenik koşullardan etkilenmekte, gıda işleme ve muhafaza sırasında değişime uğrayabilmektedir. Bu nedenle gıdalardaki biyojen aminlerin belirlenmesi ile gıda kalitesi hakkında bilgi edinilmesini mümkün kılmaktadır (Karahan 2003).

Vakum paketlenme ve CO<sub>2</sub>-modifiye atmosfer paketlenme teknikleri, düşük ısılarda depolama son yıllarda etlerin uzun süre muhafaza edilmesi için kullanılan yöntemlerdendir. Düşük ısıda paketlenme teknikleri ile paketlenen etlerin baskın florasını laktik asit bakterileri oluşturmaktadır. Bu nedenle bu etlerin yenilebilir olmalarına rağmen biyojen aminlere duyarlı kişilerde sağlık riski oluşturabileceği rapor edilmiştir. Vakumlu paketlerden çıkarılan etlerin yıkanması ve böylece daha çok yüzeyde yerleşen biyojen aminlerin uzaklaştırılması önerilmektedir (Vatansever 2004).

Depolama ve olgunlaştırma şartlarının yetersiz ve elverişsiz olması, olgunlaşma süresinin uzunluğu ve depolama ısısı gibi unsurlar da biyojen amin oluşumu üzerinde etkilidir (Varlık ve Çifçioğlu 2000).

Biyojen amin oluşumunda rol oynayan dekarboksilaz pozitif mikroorganizmalar *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Betabacterium*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Streptococcus* ve *Pediococcus* türleridir (Taylor ve ark. 1994). *Escherichia*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Bacillus* ve *Lactobacillus* türü bakteriler histidin dekarboksilaz aktivitesine sahiptirler (Halasz ve ark. 1994).

Çoğu fermente üründe laktik asit bakterileri fermentasyonda rol almakta, bu ürünlerde Putresin, Histamin, Kadaverin ve Tiramin oluşmaktadır (Ten Brink ve ark. 1990).

## **BIYOJEN AMİNLERİN TOKSİSİTELERİ**

Memelilerin intestinal bölgelerinde bulunan detoksifikasyon sistemleri, günlük diyetle alınan biyojen aminleri metabolize etme yeteneğindedir. Normal koşullarda gıdalarla birlikte alınan biyojen

aminler, amin oksidazlarla reaksiyona girerek hızla detoksifiye edilir ve dolaşıma ulaşmaları engellenerek toksik etki oluşturamazlar. Ancak alerjik bireylerde, monoaminooksidaz ve diaminooksidaz enzimlerinin genetik olarak eksikliğinde, bu enzimleri inhibe eden ağrı kesiciler, stres ve depresyon ilaçları, Alzheimer ve Parkinson tedavisinde kullanılan ilaçlar alındığında, gastrointestinal rahatsızlık durumunda veya çok yüksek düzeylerde biyojen amin içeren gıdaların tüketilmesi sonucunda detoksifikasyon işlemi gerçekleşmemekte, biyojen aminler vücutta birirmektedir (Gürbüz ve Değirmencioğlu 2003, Özdehan 2013, Silla Santos 1996).

Farklı fizyolojik etkiler meydana getirirse de biyojen aminlerin temel etki mekanizmaları psikoaktif veya vasoaktifdir. Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin gibi psikoaktif aminlerin etkileri merkezi sinir sisteminde neurotransmitter, Tyramin, Histamin gibi vasoaktif aminlerin etkileri ise doğrudan veya dolaylı olarak vasküler sistem üzerinedir (Vatansever 2004). Tüm biyojen aminler aynı toksik etkiye sahip değildir. Histamin, Tiramin ve β-feniletılamin aminler içinde en fazla toksik etkiye sahip olanlardır (Shalaby 1996). Biyojen amin içeren gıdaların tüketimi sonucu bir çok farmakolojik etki meydana gelebilir ki bunlar histamin zehirlenmesi, Tiramin toksisitesi gibi çeşitli rahatsızlıkların oluşmasına neden olabilir (Vatansever 2004).

Biyojen amin zehirlenmesinin tipik semptomları ishal, bulantı, baş ağrısı, hiper veya hipotansiyondur. Hastalık, hastalarda görülen semptomlar, başlama zamanı ve antihistamin tedavi etkisine dayalı olarak teşhis edilir (Yerlikaya ve Gökoğlu 2002).

Biyojen aminlerin toksisitesi ile ilgili kesin limitler vermek çok zordur. Çünkü tüketilen gıdanın çeşidi, miktarı ve amin içeriği gibi faktörler ile inhibitörlerin varlığı biyojen aminlerin toksisitesi ile ilgili limitlerin belirlenmesini güçleştirmektedir (Silla Santos 1996). Bununla birlikte 1000 mg amin /kg gıda seviyesi sağlık için tehlikeli limit olarak kabul edilmektedir. Bu seviye, gıda amin konsantrasyonu ile ilişkili gıda kaynaklı histamin zehirlenmesi bazlı olarak hesaplanmaktadır (Taylor 1985). Tiramin için 100-800 mg/kg ve feniletılamin için 30 mg/kg değerleri gıdalarda toksik doz olarak bildirilmiştir. Gıdalarda 100 mg/kg ve alkollü içeceklerde 2 mg/L Histamin için bir yasal üst sınır olarak önerilmektedir (Halasz ve ark. 1994, Ten Brink ve ark. 1990).

Histamin balık, peynir, et ürünleri ve fermente alkollü içeceklerde tespit edilen en toksik amindir. Histamin toksisitesini ortamda bulunan Kadaverin, Putresin ve alkol arttırmaktadır (Ten-Brink ve ark. 1990). Bozulmuş gıdalarda Histamin, Putresin ve Kadaverinle sinerjetik etkiye girer (Bjeldanes ve ark. 1978). Bu nedenle Histamin'in yüksek miktarlarda alımı gıda zehirlenmesine neden olmaktadır. 8-40 mg histamin alımı "düşük" 40-100 mg histamin alımı "orta" 100 mg'ın üzerinde histamin alımı ise "şiddetli" gıda zehirlenmesine neden olur (Özdehan

ve Üren 2012). Biyojenik amin kaynaklı intoksikasyonlardan en sık görüleni “scombroid balık zehirlenmesi” olarak adlandırılan Histamin zehirlenmesidir. Vücutta meydana getirdiği toksik etkiler ilk kez uskumru yemiş kişilerde saptandığı için bu zehirlenmeye çok eskiden beri scombroid/uskumru balık zehirlenmesi adı verilmiştir (Gökoğlu ve Varlık 1995, Olgunoğlu 2007).

Tiramin ve  $\beta$ -feniletilamin gibi biyojen aminler hipertansiyon krizi ve diyet kaynaklı migrene neden olabilirler (Özdehan ve Üren 2012). Tiramin sempatik sinir uçlarına etki edip, indirekt olarak adrenal ve nöradrenalinin salınmasını sağlayan önemli bir metabolittir (Bardocz 1995). Vücutun pek çok fonksiyonu sempatik sinir sistemiyle kontrol edildiğinden, Tiramin alımıyla birlikte, bu sistemle ilgili bazı reaksiyonları meydana gelebilmektedir (Varlık ve Berker 2001). Tiramin miktarı yüksek gıda tüketimi durumunda hipertansif kriz, kalp çarpıntısı, baş ağrısı, hipertansiyon ve migren gözlemlendiği, bazı vakalarda akciğer ödemi, solunum ve kalp yetmezliği, nörolojik bozukluklar ve intrakranial hemorajilere izlendiği bildirilmiştir (Jones 1995, Varlık ve Berker 2001).

Bazı biyojen aminler ise et ve et ürünlerinde kullanılan nitrit ve diğer kürlenme ajanları ile karsinojenik bileşikler oluşturmaktadır (Shalaby 1996).

### **GIDALARDA BİYOJEN AMİNLER**

Biyojen aminler, balık ve balık ürünleri, et ve et ürünleri yumurta, peynir gibi proteince zengin gıdalar, fermente sebzeler, soyalı ürünler, fermente alkollü içkiler, meyveler, fındık ve çikolata gibi gıdalar da görülmektedir (Turgut 2006).

Histamin oluşumu özellikle balık ve balık ürünlerinde dikkat çekmektedir. Histamin, ısıya dirençli olması nedeniyle taze balık yanında balık konservelerinde de kendini göstermektedir. Hammadde olarak hijyenik kalitesi düşük balık kullanılması veya taze balığın uygun olmayan koşullarda depolanması veya işlenmesi konserve balık ürünlerinde toksik etki oluşturacak miktarlarda Histamin oluşmasına neden olabilir. Bu nedenle balık ve ürünlerinde kalite kriteri olarak kullanılan Trimetilamin, pH, volatil nitrojen ve hipoksantin analizlerine alternatif olarak biyojen amin düzeylerinin belirlenmesi günümüzde önem kazanmıştır (Yerlikaya ve Gökoğlu 2002).

Et ve et ürünlerinin de önemli düzeyde biyojen amin içerdiği, bunun sebebinin mikrobik kontaminasyon ve uygunsuz depolama koşullarının olabileceği bildirilmiştir (Hutarova ve ark. 2013). Bu nedenle, yüksek biyojen amin düzeyleri et kalitesinin düşük olduğunun göstergesi olarak kabul edilir (Duru Özkaya ve ark. 2001). Özellikle taze etlerde biyojen aminlerden Spermin ve Spermidinin yaygın olarak rastlanıldığı bildirilmektedir. Buna karşılık et bozulmalarından Tiramin, Kadaverin, Putresin ve

Histamin gibi biyojen aminler sorumlu tutulmaktadır. Diğer yandan bazı pişirilmiş et ürünlerinde de yüksek miktarlarda biyojen aminlere rastlanmış, bu durum hijyenik kalitesi düşük et kullanımının bir sonucu olarak değerlendirilmiştir (Alper ve Temiz 2001, Karahan 2003, Kurt ve Zorba 2008). Fermente sucuklarla ilgili yapılan bir çok çalışma önemli miktarlarda biyojen amin rapor etmiştir. Sucuklarda oluşan en önemli biyojen aminler Putresin, Histamin, Kadaverin, Tiramin, Triptofan,  $\beta$ -feniletilamin, Spermidin ve Spermin'dir (Shaply 1996). Gençcelep ve ark. (2008) tarafından gerçekleştirilen çalışmada 30 farklı sucuk örneğinde biyojen amin analizleri yapılmış en önemli biyojen aminler Tiramin ve Putresin olarak belirtilmiştir. Bauer ve ark. tarafından yapılan çalışmada, uzun süre depolanmış etlerde ve bu etlerin ya da bozulmuş etlerin fermente sucuk üretiminde kullanılması durumunda tiramin miktarının uygun bir indikatör olduğu bildirilmiştir (Bauer 1994). Nitekim fermente sucuklarda yüksek düzeyde histaminin mevcut olması, kullanılan etin depolanma süresi ve histamin oluşturan mikroorganizmaların varlığının bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Yalçın ve Kolsarıcı (1995) Türk sucuğunda olgunlaşma sırasında tiramin miktarının, olgunlaşmanın ilk üç gününde önemli bir artış gösterdiğini ve 6. günde maksimum seviyeye ulaştığını ve daha sonraki günlerde ise hafif bir azalma gösterdiğini belirlemişlerdir (Yalçın ve Kolsarıcı 1995).

Peynirler yüksek oranda protein içermeleri nedeniyle enzimatik ve mikrobiyal etkinlik sonucu biyojen amin oluşumuna yatkın gıda maddeleridir (Innocente ve ark. 2007). Nitekim, peynir balıktan sonra histamin zehirlenmesinden sorumlu tutulan ikinci gıdadır. Peynirde bakterilerin fermentatif işlevleri sonucu amino asitlerden Tiramin, Histamin, Serotonin, Noradrenalin ve Triptamin gibi aminler fazla miktarda oluşabilmektedir. Tiramin, monoamin oksidaz (MAO) inhibitörü alan hastalarda baş ağrısı ve hipertansiyon krizlerini de içeren bazı olumsuzluklardan sorumlu tutulan peynirdeki diğer önemli biyojen aminlerdir (Alper ve Temiz 2001). Aygün ve ark. (1999) tarafından çeşitli sert, yarı sert ve yumuşak peynirlerde biyojen aminlerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmada, peynir örneklerinde Histamin, Tiramin, Putresin ve Kadaverin bulunmuştur.

Biyojen amin varlığına fermente alkollü içkilerde de rastlanmaktadır. Fermente alkollü içkilerdeki; Histamin ve Tiramin gibi biyojen aminlerin baş ağrısı ve yüzde kızarmalara neden oldukları bilinmektedir (Dönmezer 2014). Şarapta bulunan tiramin ve histamin gibi ögeler sulu çözeltilerde barsakta parçalanabildiği halde ortamda alkol bulunması halinde toksik etkilidirler. Alkol ve MAO inhibitörlerinin birlikte etkisi daha fazla olmaktadır (Alper ve Temiz 2001).

Protein bakımından önemli bir besin kaynağı olan balık ve balık ürünleri hasat aşamasından tüketim noktasına kadar uygun koşullarda tutulmadığı takdirde bakteriyel bozulma başlar başlamaz putresin ve kadaverin üretimi sürekli olarak artar. Bu nedenle bu aminler balık kalitesi için potansiyel bir indikatör olarak düşünülmektedir (Fernandez-Salguero ve Mackie 1987).

Muz ceviz, domates, karpuz ve ananas suyu önemli miktarda serotonin (5-hidroksi triptamin) içeren bitkisel gıdalardır. Yapraklı sebzelerdeki biyojen amin miktarı ile ilgili bilgiler henüz yeterli düzeyde değildir. Meyve ve sebzelerde tiramin ve diğer aromatik aminler, poliaminlere göre daha az miktarlarda bulunmaktadır, fakat özellikle bazı sebzelerde bu biyojen aminlerin de yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu belirlenmiştir (Alper ve Temiz 2001). Meyve suları, nektarlar, portakal, ahududu, limon, greylift, mandalina, çilek ve üzüm örnekleri çeşitli konsantrasyonlarda biyojen amin içermektedir (Silla Santos 1996).

### **GIDALARDA BİYOJEN AMİN TAYİNİ**

Gıdalarda biyojen aminlerin tespit edilmesi genel olarak ekstraksiyon, saflaştırma ve türevlendirme aşamalarından oluşur (Bjeldanes ve ark. 1978). Biyojen aminlerin örneklerden izolasyonu ve miktar tayini için pek çok metod bildirilmektedir. Ancak gıdalara rutin olarak kullanılacak tek bir kantitatif metodun olmayışı, ince tabaka kromatografisi, yüksek basınç tabaka kromatografisi (over pressure-layer LC), yüksek performanslı likit kromatografisi (HPLC) ve gaz kromatografisi (GC) gibi teknolojilerin biyojenik amin ve amin derivatlarının gıdadan ayrılması ve tanımlanması için kullanılır hale getirmiştir (Uylaşer ve Konak 2004). Gaz kromatografisi, türevlendirmenin sık kullanılması ve atık sorunları ile karşılaşılması nedeniyle biyojen aminlerin belirlenmesi için çok sık kullanılan bir uygulama değildir (Dadáková ve ark. 2009). İyon kromatografisinin ise özellikle karmaşık matrisler için uygun olduğu bildirilmektedir (Favaro ve ark. 2007). HPLC yöntemi gıdalarda biyojen amin analizinde en fazla kullanılan yöntemdir. Bu yöntemle biyojen aminlerin belirlenebilmesi için genel olarak C18 kolon kullanılmakta, dereceli elüsyon tekniği kullanılarak absorban dedektör veya floresans dedektörde analizler gerçekleştirilmektedir (Özdehan 2009).

### **SONUÇ**

Tüketicilerin sağlıklı ve güvenli gıda konusunda bilinçlenmeleri gıdalarda var olan, sağlık üzerine olumsuz etkilere sahip bileşiklerin belirlenmesi konusunda yapılan çalışmaların artmasına neden olmuştur. Bunlardan önemli birisi olan biyojen aminler, özellikle proteince zengin gıdalar, fermente gıdalar ve içkilerin üretimi, işlenmesi ve depolanması

sırasında oluşur, gıdalarla yüksek miktarlarda alındığında toksik etkilere neden olur. Gıdalarda analiz edilerek belirlenmesi bu nedenle önem arz etmektedir. Gıdalarda biyojen aminlerin oluşumu allerjik reaksiyonlara da sebep olabilmektedir. Taze ve işlenmiş gıdalarda biyojen aminlerin analiz edilerek belirlenmesi potansiyel toksik etkileri ve tazelik indikatörü olmaları açısından da önemlidir. Biyojen amin içermeyen sağlıklı ürünlerin üretimi için kaliteli hammadde seçimi, işlem hattında etkili sanitasyonun sağlanması ve biyojen amin üretmeyen suşların starter kültür olarak kullanılması gerekmektedir.

Sonuç olarak, gıdalarda biyojen aminlerin oluşumunun kontrol altına alınması, ham madde seçimi, üretim, işleme ve depolama için gerekli optimum koşulların araştırılması, biyojen amin alımını ve oluşacak gıda zehirlenmelerini önlemede faydalı olacaktır. Bununla birlikte, biyojen aminlerin fazla miktarda alımı toksisiteye sebep olduğundan teşhis ve tedavisi çalışmalarına gerekli önem verilmeli bu konuda daha fazla araştırma yapılmalıdır. Diğer yandan hem tüketicinin hemde üreticinin bilinçlendirilmesi ile biyojen aminlerden kaynaklanan toksikasyonların önüne geçilebileceği düşünülmektedir.

### **KAYNAKLAR**

- Alper N and Temiz A.** Gıdalarda Biyojen Aminler ve Önemi. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 2001; 58 (2): 71 – 80.
- Aygün O, Schneider E, Scheuer R, Usleber E, Gareis M, Martlbauer M.** Comparison of Elisa and HPLC for the determination of histamine in cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1999; 47: 1961-1964.
- Aygün O.** Biyojen Aminler- Süt ve Süt Ürünlerindeki Varlığı ve Önemi.. *Uludağ Üniv. J. Fac. Vet. Med.* 2003; 22 (1-2-3): 91-95.
- Azim Ö.** Gıdalarda Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Biyojen Amin Analizleri. *Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.* 2002; pp, 89.
- Bakırcı İ.** Peynirlerde Biyojen Amin Oluşumu ve Etkili Faktörler. *Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri. VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı.* 2000; 328-336, Tekirdağ.
- Bardocz S.** Polyamines in Food and Their Consequences for Food Quality and Human Health, *Trends in Food Science and Technology.* 1995; (6): 341–346.

- Bardocz S.** Polyamines in tissue regeneration. In: U. Barhrach and Y.M. Heimer (Eds.), *Physiology of Polyamines*. 1989; Vol. 1, C.R.C. Press, Boca Raton, FL, U.S.A, pp. 96-106.
- Bauer F, Seus I, Paulsen P, Vali S.** The formation of biogenic amines in meat and meat Products. 40 th International Congress of Meat Science and Technology, Netherlands. 1994.
- Bjeldanes LF, Schutz DE and Morris MM.** On the aetiology of scombroid poisoning: Cadaverine potentiation of histamine toxicity in the guinea-pig. *Food Cosmetol. Toxicol.* 1978; 16: 157-159.
- Çolak H, Uğur M.** Farklı muhafaza sıcaklığı ve süresinin fermente sucuklarda biyojen aminlerin oluşumu üzerine etkisi. *Türk. J. Vet. Anim. Sci.* 2002; 26: 779-784.
- Dadáková E, Krížek M, Pelikánová T.** Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. 2009; 116: 365–370.
- Dönmezer G.** “Migrenli Hastaların Beslenme Durumları İle Antropometrik Ölçümlerinin Belirlenmesi”. 2014. Yüksek Lisans Tezi, Başkent Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Beslenme ve Diyetetik Bölümü.
- Durlu-Özkaya F, Ayhan K, Vural N.** Biogenic amines produced by Enterobacteriaceae isolated from meat products. *Meat Sci* 2001; 58: 163-6.
- Ergen KÖ.** “Sofralık Zeytinlerde Biyojen Amin Miktarlarının Belirlenmesi” 2006. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Favaro G, Pastore P, Sacconi G, & Cavalli S.** Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by ion chromatography and integrated pulsed amperometric detection on Au electrode. *Food Chemistry*. 2007; 105(4):1652–1658.
- Fernandez-Salguero J, Mackie IM.** Comparative Rates of Spoilage of Fillets and Whole Fish during Storage of Haddock (*Melanogammus aeglefinus*) and Herring (*Clupea arenngus*) As Determined by the Formation of Non-volatile and Volatile Amines. *Int. J. Food Sci. Technol.* 1987; (22): 385–390.
- Gençcelep H, Kaban G, Aksu Mİ, Öz F and Kaya M.** Determination of Biogenic Amines in Sucuk. *Food Control*. 2008; 19: 868-872.
- Gökoğlu N, Varlık C.** Sardalya Konservelerinin Histamin Biyojen Amini Yönünden İncelenmesi. 1995; *Gıda*: (5): 273-279.
- Graf W.** Untersuchungen zum Vorkommen und zur Bildung von Histamin in Hartkaese. Dissertation med. Vet. MÜNCHEN. 1992.
- Gürbüz D ve Değirmencioglu N.** Gıdalarda Biyojen Amin Oluşumu. *Gıda*. 2003; 28(6): 565-570.
- Halasz A, Barath A, Simon-Sarkadi L and Holzapfel W.** Biogenic Amines and Their Production by Microorganisms In Food, *Trends in Food Science and Technology*. 1994; 5: 42-49.
- Hutařová Z, Večerek V, Steinhäuserová I, Maršálek P, Bořilová G.** Effects of storage temperature on biogenic amine concentrations in meat of unviscerated pheasants (*Phasianus colchicus*). *ACTA VET. BRNO* 2013; 82: 061–065; doi:10.2754/avb201382010061.
- Innocente N, Biasutti M, Padovese M, Moret S.** Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. *Food Chemistry*. 2007; 101: 1285–1289.
- Joneja JM.** Tyramine sensitivity. *Food Allergy and Intolerance*. Hall Publications, Vancouver, B.C. 1995; 219-223.
- Joosten HMLJ.** The biogenic amine contents of Dutch Cheese and their toxicological significance. *Neth. Milk Dairy, J.* 1988; 42: 25-42.
- Karahan GA.** Gıdalarda Biyojen Aminler. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*. 2003; 01(5): 21-32.
- Kurt Ş, Zorba Ö.** Et ve Fermente Et Ürünlerinde Biyojen Aminler. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*; 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.
- Leuschner RGK, Heidel M and Hammes PW.** Histamine and Tyramine Degredation by Food Fermenting Microorganisms, *International Journal of Food Microbiology*. 1998; 39: 1-10.
- Mafra I, Herbert P, Santos L, Barros P and Alves A.** Evaluation of Biogenic Amines in Some Portuguese Quality Wines by HPLC Fluorescence Detection of OPA Derivatives, *American Journal of Enology and Viticulture*. 1999; 50 (1):128-132.
- Nout MJR.** Fermented Foods and Food Safety, *Food Research International*. 1994; 27(3): 291–298.

- Olgunoğlu Aİ.** "Marine Edilmiş Hamside (Engraulis engrasicholus L., 1758) Duyusal, Kimyasal ve Mikrobiyolojik Değişimler". Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalı. 2007; 122.
- Ölmez HK.** Biyojenik Aminler. Gıda-Dergisi. 2000; 5(6): 51-57.
- Özdestan Ö, Üren A.** Biyojen Amin Analiz Yöntemleri, Akademik Gıda. 2006; 4(20): 19-24.
- Özdestan Ö, Üren A.** Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi. 2012; 12: 32-40.
- Özdestan Ö.** Peynirde Biyojen Aminler. Analiz 35 Dergisi. 2013; 18: 42-47.
- Özdestan Ö.** Türkiye'de Üretilen Bazı Fermente Gıdalarda Biyojen Aminlerin Belirlenmesi Üzerine Bir Çalışma. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2009.
- Özoğul F, Küley E, Özoğul Y.** Balık ve balık ürünlerinde oluşan biyojenik aminler. E.Ü. Su Ürünleri Dergisi. 2004; 21 (3-4): 375-381.
- Rice SL, Eitenmiller RR, Koehler PE.** Biologically active amines in food: a review. J. Milk Food Technol. 1976; 39: 353-358.
- Shalaby AR.** Significance of biogenic amines to food safety and human health. Food Res. Int. 1996; 29: 675-690.
- Silla-Santos MH.** Biogenic amines: their importance in foods. Int. J. Food Microbiol. 1996; 29: 213-231.
- Sinell HJ.** Biogene Amino als Risikofaktoren in der Fischhygiene. Archiv für Lebensmittelhygiene. 1978; (29): 206-210.
- Sözbilir BN, Bayşu N.** Biyokimya. Güneş Tıp Kitabevleri. 2008; ISBN:978-975-277-171-1.
- Stratton JE, Hutkins WR and Taylor SL.** Biogenic amines in cheese and other fermented foods: A review. J. Of Food Protect. 1991; 54(6): 460-470.
- Taylor SAN, Shulman KI, Walker SE, Moss J and Gardner D.** Hypertensive Episode Associated with Phenelzine and Tap Beer-A Reanalysis of the Role of Pressor Amines in Beer. Journal of Clinical Psychopharmacology. 1994; 14(1): 5-14.
- Taylor SL.** Histamine poisoning associated with fish, cheese and other foods. World Health Organization. 1985; WPH/FOS/85: 11, I-47.
- Ten Brink B, Damink C, Joosten HMLJ and Huis In't Veld JHJ.** Occurrence and Formation of Biologically Active Amines in Foods, International Journal of Food Microbiology. 1990; 11: 73-84.
- Toy N.** "Laktik Asit Bakterileri Serbest Hücre Ekstraktlarının Patojenik Bakterilerin gelişimine Ve Biyojenik Amin Üretimine Etkisinin Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 2010; 87.
- Turgut Z.** "Starter Kültür Kullanılarak Üretilen Hıyar Turşularında Biyojen Amin Oluşumu Üzerine Araştırma". Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. 2006.
- Uylaşer V, A Konak.** Gıdalardaki Biyojen Aminler ve İnsan Sağlığı Açısından Önem, Gıda ve Yem Bilimi-Teknolojisi. 2004; 3 (6):26-33.
- Uzaşçı S.** "Misel Elektrokinetik Kromatografi Lif Yöntemiyle Şarap ve Nar Ekşisi Örneklerinde Biyojenik Amin Tayini", Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2011; 55.
- Varlık H, Berker A.** Gıda Intoksikasyonlarında Histamin ve Tiraminin Önemi. Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi, Bursa. 2001; 20: 97-102.
- Varlık H, Çiftçioğlu G.** Peynirde Biyojenik Amin Oluşumu ve Amin Oluşumuna Etki Eden Faktörler. İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi. 2000; 26(2): 503-511.
- Vatansever L.** Et ve Et Ürünlerinde Biyojenik Aminler. Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi. 2004; 10: 203-208.
- Yalçın S, Kolsarıcı N.** Change in Tyramine Level During the Ripening of Turkish Fermented Sausage, Gıda. 1995; 20(6): 353-355.
- Yeğin S, Üren A.** Gıdalarda biyojen amin oluşumunu etkileyen faktörler. Türkiye 10. Gıda Kongresi. 2008; 21-23 Mayıs, Erzurum.
- Yerlikaya P, ve Gökoğlu N.** Biyojen Aminler ve Önemi, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Dergisi. 2002; (6): 24-30.

## Gıdalarda Antibiyotik Kalıntılarının Saptanması için Enzim İmmunoassay Geliştirilmesi

Ulaş ACARÖZ<sup>1</sup>, Damla ARSLAN-ACARÖZ<sup>2\*</sup>, Zeki GÜRLER<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Afyonkarahisar/TÜRKİYE

<sup>2</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Afyonkarahisar/TÜRKİYE

Corresponding author e-mail: damlaarslan06@hotmail.com

### ÖZ

Veteriner hekimlikte tedavi ve koruyucu amaçla çok sayıda farmakolojik madde kullanılmaktadır. En yaygın ve bilinçsiz kullanılanların başında ise antibiyotikler yer almaktadır. Antibiyotikler, hastalıkların tedavisinde önemli rol oynamalarına rağmen yanlış kullanımına bağlı olarak et, süt, yumurta, bal gibi hayvansal kökenli gıdalarda kalıntı sorununa neden olmaktadır. Antibiyotik kalıntısı içeren gıdalar halk sağlığı açısından tehlike oluşturmaktadır. Halk sağlığını koruma amacıyla, Avrupa Birliği hayvansal kökenli gıdalarda farmakolojik aktif maddeler için maksimum kalıntı limitleri belirlemiştir. Günümüzde gıdalarda antibiyotik kalıntılarının tespiti için geliştirilmiş mikrobiyal inhibisyon testleri, immunoassayler ve kromatografik metotlar mevcuttur. Enzim-linked immunosorbent assay (ELISA) metodu laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmakta, güvenilir sonuçlar vermekte ve kısa sürede çok sayıda örnekle çalışma imkanı sunmaktadır. Bu metodun geliştirilmesinde dikkat edilmesi gereken en önemli aşama immunojenin sentezidir. Antibiyotikler küçük moleküler ağırlığa sahip olduğundan genellikle immün yanıt oluşturmazlar. İmmün yanıt oluşturabilmek için antibiyotik yeterli büyüklükte bir proteine bağlanarak immunojen elde edilir. Antibiyotüğün proteine bağlanması çoğunlukla karbodiimid, glutaraldehid ve aktif ester gibi metotlar ile gerçekleştirilir. Hangi metodun kullanılacağı ilgili antibiyotüğün kimyasal yapısına bağlıdır. Sentezlenen immunojen ile deney hayvanları immunize edilerek, spesifik antikorlar elde edilir. Daha sonra metot optimize edilerek çeşitli gıda maddeleri için geliştirilir.

**Anahtar Kelimeler:** Hayvansal Kökenli Gıdalar, Antibiyotik Kalıntısı, Enzim-Linked İmmunosorbent Assay, Metot Geliştirme.

## Enzyme Immunoassay Development for the Detection of Antibiotic Residues in Foods

### ABSTRACT

In veterinary medicine, a large number of pharmacological agents are used for prophylactic purpose and treatment. Antibiotics are in the first place among most commonly and inappropriately used pharmacological agents. Although antibiotics play a crucial role in the treatment of the illnesses, misuse of them causes residue problem in the food of animal origin such as milk, eggs, meat, and honey. The food containing antibiotic residues endanger public health. To protect the public health, maximum residue limits for pharmacologically active substances in foods of animal origin have been established by the European Union. To detect the antibiotic residue in foodstuff, several methods such as microbial inhibition tests, immunoassays and chromatographic methods have been established. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method is widely used in a laboratory gives reliable results and offers to work with a large number of samples in a short time. The most important step in the development of this method is the immunogen synthesis. Antibiotics are generally not able to stimulate the immune response because of their low molecular weight. To stimulate the immune response, the immunogen is synthesized by conjugating antibiotics to a protein of sufficient size. The conjugation of antibiotic to protein is mostly performed using some methods such as carbodiimide, glutaraldehyde, and the active ester. Conjugation method is chosen depending on the chemical structure of used antibiotics. Specific antibodies are generated by immunizing the experimental animals with the obtained immunogen. Then, methods are optimized and developed for various foodstuff.

**Key Words:** Foods of animal origin, Antibiotic residue, Enzyme-linked immunosorbent assay, Method development.

To cite this article: **Acaröz U, Arslan-Acaröz D, Gürler Z.** Gıdalarda Antibiyotik Kalıntılarının Saptanması için Enzim İmmunoassay Geliştirilmesi. *Kocatepe Vet J.* 2016; 9(2):122-126.



## GİRİŞ

Dünyanın pek çok ülkesinde olduğu gibi Türkiye’de de antibiyotikler yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Dünyada yıllık 100.000-200.000 ton antibiyotik üretildiği tahmin edilmektedir ve bunun büyük bir kısmı tarım, balıkçılık ve veteriner hekimlik alanında kullanılmaktadır (Laxminarayan ve ark 2013, Howard ve ark 2013, Pullukçu 2013, Aalipour ve ark 2014). Bilinçsiz antibiyotik kullanımı ve kalıntı arınma süresine dikkat edilmemesi sonucunda hayvansal kökenli gıdalarda antibiyotik kalıntısı bulunmaktadır (Yüksek 2001). Gıdalardaki antibiyotik kalıntıları insan sağlığını doğrudan ve dolaylı olarak etkilemektedir. Hassasiyete sahip bireylerde antibiyotikler doğrudan alerjik reaksiyonlara sebep olabilmektedir (Reig ve Toldrá 2011, Lim ve ark 2013). Dolaylı etkiye ise günümüzde önemli bir halk sağlığı sorunu olan antibiyotik direncini örnek verebiliriz. Bu durum hem hastalıkların tedavisinde güçlükler ortaya çıkarmakta hem de fermente ürün teknolojisinde starter kültürleri etkileyerek ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Wise ve ark 1998, Reig ve Toldrá 2011, Zheng ve ark 2013). Gıdalardaki antibakteriyel maddelerin saptanması için birçok ülkede kontrol programları oluşturmuştur ve Avrupa Birliği tüketicilerin gıda güvenliğini sağlamak amacıyla hayvansal kökenli gıdalarda antibakteriyel maddelerin maksimum kalıntı limitlerini belirlemiştir (Bittencourt ve ark 2012, EC. No. 37/2010). Gıdalardaki antibiyotik kalıntı kontrolü immunolojik, mikrobiyolojik ve kromatografik metotlar ile gerçekleştirilir. Mikrobiyolojik metotlar ucuz olmalarına karşın uzun inkübasyon süresine ihtiyaç duyarlar, belirlenmek istenen maddeye spesifik değildirler ve hassasiyetleri zaman zaman yasal olarak belirlenen maksimum kalıntı limitleri için yeterli değildir. Kromatografik metotlar kalıntı maddelerini spesifik olarak ve yüksek hassasiyet ile saptayabilirler ancak pahalı olmaları, kalifiye teknik eleman gerektirmeleri nedeniyle daha çok doğrulama metodu olarak kullanılmaktadır (Le ve ark 2011, Galarini ve ark 2014, Wang ve ark 2015).

### İmmunolojik Metotlar

İmmunolojik metotlar (immunoassayler) antijen-antikor reaksiyonlarına dayalı yöntemler olup, bu metotlarda antijen-antikor bağlanması çeşitli indikatörler ile görünür hale getirilir. İlk olarak 1950’li yıllarda radyo aktif izotopların kullanıldığı radioimmunoassayler (RIA) geliştirilmiştir (Bremus 2012). RIA ile endojen plazma insülin düzeyini ölçen Yalow 1977’de Nobel ödülü almıştır. Radyo aktivite kaynaklı güvenlik sorunlarında ötürü radyo aktif izotopların enzimle yer değiştirilmesi sonucu RIA modifiye edilerek enzim immunoassayler (EIA) geliştirilmiştir (Gan ve Patel 2013). Geliştirilen EIA metodu ise renk reaksiyonu temellidir. Bu renk, horseradish peroksidaz (HRP) gibi çeşitli enzimlerin

kendilerine özgü substratları katalize etmesi sonucu oluşmaktadır (Engvall ve Perlmann 1971, Bremus 2012). Diğer bir deyişle, bu yöntemde, antijen ya da antikor bir enzimle işaretlenmekte ve immunolojik reaksiyon, enzimatik bir aktivite sonucu ölçülmektedir. Antijen-antikor reaksiyonuna dayanan birçok metot olmasına rağmen son yıllarda en çok kullanılanı Enzim-linked immunosorbent assay (ELISA) testidir (Uçan ve ark 2010a; Uçan ve ark 2010b). ELISA farklı kriterlere göre sınıflandırılabilir, ancak antibiyotik gibi küçük moleküler ağırlıklı maddeler tek bir bağlanma noktasına sahip oldukları için sadece kompetitif sistemler ile saptanabilir. Kompetitif sistemlerde saptanacak olan serbest antijen ile işaretli antijen sınırlı sayıdaki antikor için yarışır. Kompetitif sistem kendi içinde doğrudan (direkt) ve dolaylı (indirekt) olarak ikiye ayrılır. Doğrudan metotta spesifik antikorlar doğrudan ya da ikincil antikorlar aracılığı ile taşıyıcı materyale bağlanır. Serbest ve enzime bağlı antijen, antikor yüzeyindeki boş olan antikor bağlanma noktaları için rekabet ederler. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, bağlanmamış olan maddeler yıkanarak uzaklaştırılır. Bu işlemde sonra enzime spesifik substrat eklenir. Bu substrat enzim tarafından serbest antijen miktarına ters orantılı olacak şekilde katalize edilir. Dolaylı metotta ise proteine bağlı olan antijen taşıyıcı yüzeye bağlanır ve bu antijen ile serbest antijen, serbest haldeki antikoron sınırlı bağlanma noktaları için yarışır. Daha sonra, bağlanmış olan spesifik antikoru saptayabilmek için enzime bağlı olan türe özgü ikincil antikor eklenir ve inkübe edilir. Yıkama aşamasından sonra, enzim spesifik substrat eklenir ve yukarıda belirtildiği gibi reaksiyondaki serbest antijen miktarına ters orantılı olarak renk değişimi gözlenir (Tijssen 1985, Märtilbauer 1993, Acaröz 2015).

Diğer bir yönden bu sistemler homolog ve heterolog olarak gruplandırılır. Homolog sistemlerde hem immunojen hem de antijen-konjugatları aynı haptene ve bağlama metodu ile sentezlenir. Heterolog sistemler de kendi içinde farklı gruplara ayrılabilir. Örneğin haptene heterolojisinde, hedef haptene benzer fakat farklı bir antijen kullanılır, köprü heterolojisinde immunojenin sentezlenmesinde kullanılan farklı bir bağlama ajanı kullanılır, ya da yan heterolojide haptene molekülünün farklı kısımlarından konjugasyon yapılır. Heterolog sistemlerde, hassasiyet kullanılan antikoron affinitesine bağlı olarak yükseltilebilir (Van Weemen ve Schuur 1975, Tijssen 1985).

### Metodun geliştirilmesinde dikkat edilmesi gereken hususlar

Mikotoksin, pestisid ve antibiyotik gibi düşük moleküler ağırlığa sahip bileşikler genellikle immun yanıt oluşturmazlar. Bu tür bileşiklere karşı antikor üretilebilmesi için bağışıklık sistemini uyarabilme yeteneğine sahip, yüksek moleküler ağırlıklı bir

proteine kovalent bağlanarak immunojen sentezi gerçekleştirilir (Spinks ve ark 1999, Thirumala-Devi ve ark 2002, Kim ve ark 2003, Strasser ve ark 2003). Antibiyotiklere karşı immunojen sentezinde, antibiyotiklerin üzerindeki fonksiyonel grupların varlığı çok önemlidir. Zira bazı antibiyotiklerin üzerindeki fonksiyonel gruplar sayesinde direkt olarak proteine bağlama işlemi yapılabilirken (Chen ve ark 2008), bazı antibiyotiklerde ise bağlama işleminden önce derivatizasyon işleminin uygulanması gerekir (Campbell ve ark 1984). Hatta grup spesifik antikor üretebilmek amacıyla kimyasal olarak yeni bir hapten sentezine ihtiyaç duyulabilir (Pinacho ve ark 2012). ELISA sisteminin oluşturulabilmesi ve optimizasyonu için immunojenin yanı sıra protein konjugatlarının da sentezlenmesi gerekmektedir. Hem immunojen hem de protein konjugatları çeşitli konjugasyon metodlarıyla sentezlenir. En yaygın kullanılanları karbodiimid, glutaraldehid, aktif ester ve anhidrit metodlarıdır (Wang ve ark 2007, Chen ve ark 2008). Üretilen immunojen ile poliklonal ya da monoklonal antikor sentezlemek için deney hayvanları immunize edilir. Elde edilen poliklonal ve monoklonal antikorlar ELISA metodunun geliştirilmesinde kullanılır. Her iki antikorun da avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Poliklonal antikorların üretilmesi monoklonal antikorlara göre daha kısa süre, daha az maliyet ve daha az teknik beceri gerektirmektedir. Poliklonal antikorların en önemli problemi ise elde edilen miktarının sınırlı olmasıdır. Zira aynı immunojen ile immunize edilen hayvanların ürettikleri antikorların hassasiyeti ve spesifitesi farklıdır. Yani bir poliklonal antikor tükendiğinde aynı şartlar altında tekrar üretilmeye çalışılsa bile aynı özelliklere sahip olmaz. Monoklonal antikorlar ise sınırsız miktarda ve homojen olarak üretilebilir (Ritter 2000, Lipman ve ark 2005). Antikorların elde edilmesinden sonra, metot optimize edilir ve çeşitli gıdalar için geliştirilir. Gıdaların bileşenleri antijen-antikor reaksiyonlarını olumsuz etkileyebilir, ancak ELISA metodu ile gıdalardaki kalıntı analizinin yapılabilmesi için genellikle basit bir ekstraksiyon aşaması yeterli olmaktadır. Örneğin sütte santirifüj işlemi ve metot solüsyonunun da seyreltme yeterli olabilmektedir. Et örnekleri fosfat tampon solüsyonu veya fosfat tampon solüsyonu/metanol gibi karışımlar ile homojenize edilir, santrifüj işleminden sonra elde edilen ekstrakt seyreltilerek ilgili ELISA'da kullanılır. Metot geliştirilirken ilgili gıda maddesi yapay olarak antibiyotik ile kontamine edilir ve yukarıda belirtildiği gibi bir ekstraksiyon işlemi uygulandıktan sonra geri kazanım değeri belirlenerek metot geliştirilmiş olur (Burkin ve Galvidis 2010, Huet ve ark 2006, Suryoprabowo ve ark 2014, Acaröz 2015).

### SONUÇ

Hastalıkların tedavisinde bilinçsiz antibiyotik kullanılması ve yasal bekleme sürelerine uyulmaması

sonucunda hayvansal kökenli gıdalardaki antibiyotik kalıntı problemi ile karşı karşıya kalmaktayız. Bu problem halk sağlığı açısından tehlike arz etmektedir. Avrupa Birliği, tüketicileri korumak amacıyla farmakolojik aktif maddelerin gıdalardaki kalıntı miktarları ile ilgili yasal düzenleme yaparak maksimum kalıntı limitleri belirlemiştir. Yasal kontrollerinin yapılabilmesi için çeşitli metotlar mevcuttur. ELISA, antibiyotik kalıntılarının gıdalardaki tespiti için kolay uygulanabilen, yüksek spesifite ve sensitiviteye sahip olan bir metottur. Aynı zamanda, kısa sürede çok sayıda örneğin incelenmesine olanak sağladığından önem arz etmektedir.

### KAYNAKLAR

- Aalipour F, Mirlohi M, Jalali, M.** Determination of antibiotic consumption index for animal originated foods produced in animal husbandry in Iran, 2010. *J Environ Health Sci and Eng.* 2014; 12(1): 42.
- Acaröz U.** Entwicklung und Anwendung von generischen monoklonalen Antikörpern zum Nachweis von Chinolon-Antibiotika in Lebensmitteln. Doctoral Dissertation, Universitätsbibliothek der Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2015.
- Bittencourt MS, Martins MT, de Albuquerque FG, Barreto F, Hoff R.** High-throughput multiclass screening method for antibiotic residue analysis in meat using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a novel minimum sample preparation procedure. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2012; 29(4): 508-516.
- Bremus AC.** Optimierung und Evaluierung von Enzymimmuntests zum Nachweis von Cephalosporin-Antibiotika in Milch. Doctoral Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2012.
- Burkin MA, Galvidis IA.** Development of a competitive indirect ELISA for the determination of lincomycin in milk, eggs, and honey. *Journal Agr And Food Chem.* 2010; 58(18): 9893-9898.
- Campbell GS, Mageau RP, Schwab B, Johnston RW.** Detection and quantitation of chloramphenicol by competitive enzyme-linked immunoassay. *Antimicrob Agents And Chemother.* 1984; 25(2): 205-211.
- Chen Y, Wang Z, Wang Z, Tang S, Zhu Y, Xiao X.** Rapid enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay for kanamycin and tobramycin in swine tissues. *J Agri Food Chem.* 2008; 56(9): 2944-2952.
- EC.** Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in

- foodstuffs of animal origin. *Off J Eur Communities*. 2010; L 15: 1–72.
- Engvall E, Perlmann P.** Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin antigen-coated tubes. *J Immunol*. 1971; 109: 129-135.
- Galarini R, Diana F, Moretti S, Puppini B, Saluti G, Persic L.** Development and validation of a new qualitative ELISA screening for multiresidue detection of sulfonamides in food and feed. *Food Control*. 2014; 35(1): 300-310.
- Gan SD, Patel KR.** Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol*. 2013; 133(9): e12.
- Howard SJ, Catchpole M, Watson J, Davies SC.** Antibiotic resistance: global response needed. *The Lancet Infect Dis*. 2013; 13(12): 1001-1003.
- Huet AC, Charlier C, Tittlemier SA, Singh G, Benrejeb S, Delahaut P.** Simultaneous determination of (fluoro) quinolone antibiotics in kidney, marine products, eggs, and muscle by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Agri Food Chem*. 2006; 54(8): 2822-2827.
- Kim YJ, Cho YA, Lee HS, Lee YT, Gee SJ, Hammock BD.** Synthesis of haptens for immunoassay of organophosphorus pesticides and effect of heterology in hapten spacer arm length on immunoassay sensitivity. *Analytica Chimica Acta*. 2003; 475(1): 85-96.
- Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So A, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R.** Antibiotic resistance-the need for global solutions. *The Lancet Infect Dis*. 2013; 13(12): 1057-1098.
- Le T, Yi SH, Zhao ZW, Wei W.** Rapid and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for the detection of chlortetracycline residues in edible animal tissues. *Food Addit Contam Part B*. 2011; 28(11): 1516-1523.
- Lim WS, Kim DH, Jin SY, Choi YS, Lee SH, Huh HJ, Chae SL, Lee Y.** A case of fixed drug eruption due to doxycycline and erythromycin present in food. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2013; 5(5): 337-339.
- Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garci F.** Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR Journal*. 2005; 46(3): 258-268.
- Märtlbauer E.** Enzymimmuntests für antimikrobiell wirksame Stoffe. Enke Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1993.
- Pinacho DG, Sanchez-Baeza F, Marco MP.** Molecular modeling assisted hapten design to produce broad selectivity antibodies for fluoroquinolone antibiotics. *Anal Chem*. 2012; 84(10): 4527-4534.
- Pullukçu H.** Toplum Kökenli İnfeksiyonlarda Olgularla Akılcı Antibiyotik Kullanımı. *ANKEM Derg*. 2013; 27(2): 111-112.
- Reig M, Toldrá F.** Patents for ELISA tests to detect antibiotic residues in foods of animal origin. *Recent Pat Food Nutr Agric*. 2011; 3(2): 110-114.
- Ritter MA.** Polyclonal and monoclonal antibodies. In *Diagnostic and Therapeutic Antibodies*. Humana Press. 2000; pp. 23-34.
- Spinks CA, Wyatt GM, Lee HA, Morgan MRA.** Molecular modeling of hapten structure and relevance to broad specificity immunoassay of sulfonamide antibiotics. *Bioconjugate chemistry*, 1999; 10(4): 583-588.
- Strasser A, Usleber E, Schneider E, Dietrich R, Bürk C, Märtlbauer E.** Improved enzyme immunoassay for group-specific determination of penicillins in milk. *Food and agricultural immunology*. 2003; 15(2): 135-143.
- Suryoprabowo S, Liu L, Peng J, Kuang H, Xu C.** Development of a Broad Specific Monoclonal Antibody for Fluoroquinolone Analysis. *Food Analytical Methods*. 2014; 7(10): 2163-2168.
- Thirumala-Devi K, Mayo MA, Hall AJ, Craufurd PQ, Wheeler TR, Waliyar F, Subrahmanyam A, Reddy DVR.** Development and application of an indirect competitive enzyme-linked immunoassay for aflatoxin M1 in milk and milk-based confectionery. *J Agri Food Chem*. 2002; 50(4): 933-937.
- Tijssen P.** Practice and theory of enzyme immunoassays. Elsevier, Amsterdam, Holland, 1985.
- Uçan US, Aras Z, Zorlutuna M.** Detection of canine brucellosis by a rapid agglutination test using *Rhizobium tropici* as antigen. *Revue Med Vet*. 2010a; 161: 51-56.
- Uçan US, Aras Z, Semacan A.** Serodiagnosis of *Brucella canis* infection in dogs by a dipstick enzyme immunoassay. *Eurasian J Vet Sci*. 2010b; 26(2): 109-112.
- Van Weemen BK, Schuur A.** The influence of heterologous combinations of antiserum and enzyme-labeled estrogen on characteristics of estrogen enzymeimmunoassays. *Immunochemistry* 1975; 12: 667-670.
- Wang Z, Zhu Y, Ding S, He F, Beier RC, Li J, Jiang H, Feng C, Wan Y, Zhang S, Kai Z,**

- Yang X, Shen J.** Development of a monoclonal antibody-based broad-specificity ELISA for fluoroquinolone antibiotics in foods and molecular modeling studies of cross-reactive compounds *Anal Chem.* 2007; 79(12): 4471-4483.
- Wang Z, Mi T, Beier RC, Zhang H, Sheng Y, Shi W, Zhang S, Shen J.** Hapten synthesis, monoclonal antibody production and development of a competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for erythromycin in milk. *Food Chem.* 2015; 171: 98-107.
- Wise R, Hart T, Cars O, Streulens M, Helmuth R, Huovinen P, Sprenger M.** Antimicrobial resistance: Is a major threat to public health. *BMJ: British Med J.* 1998; 317(7159): 609-610.
- Yüksek N.** Etilerde antibiyotik kalıntılarının aranması üzerinde çalışmalar. *J Fac Vet Med.* 2001; 20: 85-90.
- Zheng N, Wang J, Han R, Xu X, Zhen Y, Qu X, Sun P, Li S, Yu Z.** Occurrence of several main antibiotic residues in raw milk in 10 provinces of China. *Food Addit Contam Part B.* 2013; 6(2): 84-89.

## Gıda Kaynaklı Helmintler

**Esmâ KOZAN**

*Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Afyonkarabısar/TÜRKİYE*

**Corresponding author e-mail:** esmakozan@aku.edu.tr

### ÖZ

Beslenme tüm canlıların canlılığını devam ettirebilmesi için en temel ihtiyacıdır. Sağlıklı bir yaşam için yeterli, dengeli, kalitelive sağlıklı beslenme son derece önemlidir. Ancak gıdaların, üretiminden tüketimine kadar her aşamada sanitasyon ve hijyen kurallarına yeteri kadar önem verilmemesi durumunda parazitler, bakteriyel, viral ve fungal pek çok ajanla bulaşması kaçınılmaz olmaktadır. Bu makalede halk sağlığını tehdit eden ve gıdalarla insanlara bulaşması söz konusu olan helmint parazitler hakkında bilgi verilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Gıda, Helmint, Kontaminasyon

### Foodborne Helminths

#### ABSTRACT

Nutrition is the most fundamental need of all living things to maintain the vitality. For healthy life sufficient, balanced, quality and healthy nutrition is a crucially important entity. However food contamination by several agents i.e. parasitic, bacterial, viral and fungal is inevitable because sufficient attention is not given to food processing from production to consumption at every stages. This paper deals with helminth parasites that threatens public health and transmitted to human by food.

**Key Words:** Food, Helminth, Contamination

To cite this article: **Kozan E.** Gıda Kaynaklı Helmintler. *Kocatepe Vet J. 2016; 9(2):127-134.*

## GİRİŞ

Tüm dünyada helmint enfeksiyonları iki milyardan fazla insanı etkilemektedir. Az gelişmiş ve tropikal iklime sahip bölgelerde helmint enfeksiyonlarına daha sıklıkla rastlanmaktadır. Ancak gelişen teknolojiye bağlı olarak ulaşım imkanlarının artması, toplu göçler, iltica, turizm ve savaş gibi nedenler helmint enfeksiyonlarının görülmediği bölgelere de yayılışını kolaylaştırmaktadır (Crompton 1999).

Hızla değişen dünyada insanların gıda tüketim alışkanlıkları da değişmektedir. Zahmetsiz ve kısa sürede hazırlanan gıdaların tercih edildiği günümüzde suşi gibi çiğ balık tüketiminin giderek artması, yeşil yapraklı sebzeler başta olmak üzere birçok gıdanın hijyenik kurallara uyulmadan hazırlanması veya yeteri kadar ısıtılma tabii tutulmadan tüketilmesi halinde bu gıdalar insanlar için paratazitler, bakteriyel viral ya da fungal birçok hastalığın kaynağını oluşturabilmektedir. İnsanlarda gıda ve su kaynaklı enfeksiyona neden olan helmint parazitler trematoda, cestoda ve nematoda sınıfında yer almaktadır.

### Trematodlar

#### **Fasciola spp.**

Başta koyun, keçi, sığır, manda gibi ruminatlar olmak üzere insan dahil pekçok memeli hayvanın safra kanallarına yerleşirler (Tınar 2006). Enfekte bireylerin dışkıları ile dışarı atılan yumurtalarda gelişen miracidium sulu ortamda yumurtayı tek eder. Uygun salyangoza girerek sporocyst ve redi safhasını geçirerek serkerler gelişir. Bu serkerler salyangozu tek ederek su içerisinde yüzerken suda ya da bitkilere yapışarak kuyruğu kopar ve kistlenerek metaserker haline gelir (Haseeb ve ark 2002, Tınar 2006). İnsanlar genellikle metaserker taşıyan tere gibi sucul bitkileri iyi yıkamadan yemek suretiyle, kontamine suları içerek ya da kontamine sularla yıkadıkları sebzeleri çiğ olarak tüketerek enfeksiyona yakalanırlar (Mas-Coma ve ark 1999, Mas-Coma ve ark 2005). Metaserker alınımını takiben kist açılır ve genç parazit bağırsak duvarını delerek periton boşluğuna düşer ve karaciğer kapsülüne göç eder. Akut enfeksiyonlarda ateş karın ağrısı en yaygın görülen belirtilerdir. Bir kaç ay sonra genç parazitler safra kanallarına yerleşerek olgun hale gelir ve yumurta üretirler (el-Shabrawi ve ark 1997). Ağır ve kronik enfeksiyonların karaciğer tümörlerine bile neden olabileceği bildirilmektedir (Haseeb ve ark 2002).

Son zamanlarda yapılan araştırmalar dünyada 60'tan fazla ülkede yaklaşık 2.4 milyon insanın *Fasciola sp.* ile enfekte olduğunu (Nithiuthai 2004), 180 milyon üzerinde yaşamın da risk altında bulunduğunu (Mas-Coma 1999) göstermektedir. Türkiye'de de Yılmaz ve Gödekmerdan (2004) tere tüketiminin yoğun olduğu Van yöresinde yaptıkları araştırmada incelemeye aldıkları 500 kişinin 9'unun (%1.8) *Fasciola sp.* ile enfekte olduğunu tespit etmişlerdir.

#### ***Fasciolopsis buski***

Tayvan, Bangladeş, Hindistan ve Tayland gibi Güney-Doğu Asya ülkelerinde görülen bu parazit insan ve domuzların incebağırsaklarında yerleşir (Bhattacharjee ve ark 2009). Enfekte bireylerin dışkıları ile dışarı atılan yumurtada gelişen mirasidyum sulu ortamda su salyangozlarına girer. Sporokist, redi ve serker dönemlerini geçirir. İnsan ve domuzlar metaserker taşıyan suları içerek ya da metaserkerli sebzeleri çiğ olarak tüketerek enfeksiyona yakalanırlar (Graczyk ve ark 2001, Tınar 2006).

Orta dereceli enfeksiyonlarda anemi, baş ağrısı ve mide problemleri gözlenirken daha ağır enfeksiyonlar şiddetli karın ağrısı, beslenme bozukluğu, ödem ve zaman zaman bağırsak tıkanmalarına sebep olur (Doyle 2003).

#### ***Paragonimus spp.***

İnsan, domuz, kedi, köpek ve pek çok yabancı karnivorun akciğerinde ve arasına beyin, omurilik vb. diğer organlarına yerleşirler (Soulsby 1982). Akciğerde yaşayan parazitlerin yumurtaları bir fistülle bronşiolere buradan soluk borusu ve yutak vasıtasıyla bağırsaklara ulaşarak dışkıyla dışarı atılır. Yumurtalarda gelişen mirasidyumlar su salyangozlarında sporokist, redi ve serker safhalarını geçirir. Salyangozu terk eden serkerler yengeç ve kerevitler tarafından alınır ve bunlarda metaserker haline gelir. İnsanlar metaserker taşıyan yengeç ve kerevitleri yiyerek enfeksiyona yakalanırlar (Soulsby 1982, Tınar 2006). Yaban domuzu gibi diğer memeliler enfekte yengeçleri yediklerinde etken erişkin hale gelemmez ve kaslarda kistlenir. İnsanlar böyle enfekte yaban domuzlarının kaslarını tüketerek de enfeksiyona yakalanır (Doyle 2003). Enfeksiyonun ilk döneminde ishal, karın ağrısı ve ateş gözlenirken ilerleyen dönemlerde parazitin akciğere yerleşmesi ile birlikte öksürük ve göğüs ağrısı dikkati çeker (Nakamura-Uchiyama ve ark 2002).

#### ***Clonorchis sp.* ve *Opistorchis sp.***

*Clonorchis sinensis* insan, domuz, kedi, köpek ve vizonların safra kanalında, *Opistorchis felineus* kedi, köpek, domuz ve insanların safra ve pankreas kanallarında, *Opistorchis viverrini* ise kedi, köpek ve insanların safra ve pankreas kanallarında yerleşir. İki arakonak kullanarak gelişen bu parazitler için birinci arakonak tatlı su sümüklüleri, ikinci arakonak ise tatlı su balıklarıdır (Tınar 2006). Enfekte bireylerin dışkıları ile atılan yumurtalar birinci arakonak olan sümüklüler tarafından alınır, mirasidyum serbest kalarak sporokist, redi ve serkerler oluşur. Sümüklüyü terk ederek su içinde serbest kalan serkerler uygun ikinci arakonak vücuduna penetre olarak metaserker halini alırlar. Metaserker taşıyan balıkları çiğ ya da az pişmiş olarak tüketen son konaklar enfeksiyona yakalanırlar (Taylor ve ark 2007). Safra kanallarında tıkanma ve hiperplaziye neden olan etkenler hafif enfeksiyonlarda karaciğer fonksiyon bozukluğu ile karakterize semptomlar oluştururken ağır enfeksiyonlarda hepatit ve sindirim bozukluklarına sebep olmaktadır (Watanapa ve Watanapa 2002).

İnsanlarda akut enfeksiyonlarda hafif ateş, mide bulantısı, sarılık ve hepatomegali gözlenirken kronik enfeksiyonlar genellikle semptomsuz seyretmektedir (Woolf ve ark 1984).

Ütük (2013) değişik yazarlara atfen Tayland, Kore Vietnam, Almanya ve İtalya'da, Türkiye'de ise Elazığ, Ankara ve İstanbul'da kedi ve köpeklerde etkenlere rastlandığını bildirmektedir. Buna karşın Türkiye'de insanlarda hastalığın varlığına ilişkin bir bilgi bulunmamaktadır.

### **Cestodlar**

#### **Diphyllobothrium spp.**

Diphyllobothriosis insanlarda, balık şeridi olarak bilinen Diphyllobothrium cinsinde bulunan cestodların meydana getirdiği, balık kaynaklı en önemli zoonozdur (Scholz ve ark 2009). *Diphyllobothrium latum* kedi, köpek ve balık tüketen carnivorların ve insanların ince bağırsaklarına yerleşir. Gelişiminde 2 arakonak kullanır. Sonkonakların dışkı ile dışarı atılan yumurtada gelişen coracidium sudaki crustacealar tarafından alınır. Birinci larva formu olan proceroidler tatlı sularda yaşayan crustacealarda, ikinci larva formu olan pleuroceroidler ise tatlı su balıklarının kaslarında gelişir (Doyle 2003, Ayaz ve Tınar 2006). İnsanlar enfeksiyona çiğ ya da az pişmiş balıkları yiyerek yakalanırlar. Son zamanlarda suşi gibi çiğ balık tüketiminin artmış olması gelişmiş ülkelerde bile bu parazitle karşılaşma şansını önemli ölçüde artırmaktadır (Scholz ve ark 2009). Finlandiya, İskandinavya, Alaska, Kanada, Japonya ve Peru'da insanlarda enfeksiyona oldukça sık rastlanmaktadır (Dick ve ark 2001).

Genellikle tek bir parazitle enfeksiyonlarda klinik belirtiyeye rastlanmazken, çok sayıda parazit varlığında karın ağrısı, ishal ve anemi dikkati çeker (Doyle 2003, Scholz ve ark 2009).

#### ***Taenia saginata* ve *Taenia solium***

*Taenia saginata* erişkinleri sadece insanların incebağırsağında yerleşirken, larvası olan *Cysticercus bovis* sığırların kalp, dil, boyun, bacak ve omuz kaslarında bulunur (Soulsby 1982). Bazı kaynaklarda 20 m uzunluğa ulaşabildiği bildirilmekle birlikte *T.saginata* yaklaşık 3-5m uzunlukta olup, yaklaşık 2000 halkaya sahip olan en uzun insan cestodu olarak kabul edilir (Roberts ve Janovy 1996). Ön uçta rostellum olmadığı için silahsız şerit olarak da bilinir. Enfekte bireylerin dışkıları ile dışarı atılan ya da kendi aktif hareketleriyle anüsten dışarı çıkan gebe halkaların parçalanması sonucu açığa çıkan yumurtalar etrafa saçılır. Yumurtalar sığırlar tarafından otlarla alınır. Bağırsaklarda serbest kalan onkosfer incebağırsakları delerek kan yoluyla kaslara gelir ve 3-4 ayda *C.bovis* gelişir. İnsanlar *C.bovis* taşıyan etleri çiğ ya da az pişmiş olarak yemek suretiyle enfeksiyona yakalanırlar (Soulsby 1982, Crompton 1999). İnsanlarda enfeksiyon genellikle belirtisiz bir seyir gösterirken zaman zaman bulantı, kusma, kilo kaybı, ishal, karında şişlik, sinirlilik halleri

de gözlenebilir (Leventhal ve Cheadle 2002, Korkmaz 2006). Turgay ve Yolasığmaz (2007) çeşitli yazarlara atfen *T.saginata*'nın Türkiye'de farklı bölgelerde insanlarda % 0-34.2 arasında bir yayılışa sahip olduğunu bildirmişlerdir. Kuş ve ark. (2014)'da yaptıkları araştırmada çeşitli yazarlara atfen sığırlarda *C.bovis*'e % 0.3-30 arasında rastlandığını, gerek *T.saginata* gerekse *C.bovis* görülme sıklığının birbirine paralellik göstererek Güneydoğu Anadolu başta olmak üzere Doğu Anadolu ve İç Anadolu Bölgelerinde daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

*Taenia solium* erişkinleri insanların incebağırsaklarında, larvası olan *Cysticercus cellulosae* domuzlar başta olmak üzere nadiren insan, koyun, köpek ve kedilerin kaslarında yerleşir. Morfoloji olarak *T.saginata*'ya benzeyen *T.solium*'un ön ucunda rostellum adı verilen ve 2 sıra çengel taşıyan bir organel bulunur (Ayaz ve Tınar 2006). Dışkı ile dışarı atılan halkalardan açığa çıkan yumurtalar otlarla birlikte domuzlar tarafından alınarak onkosfer bağırsakta serbest kalır. Bağırsakları delerek kana karışan onkosfer dil, diyafram, masseter, kalp, boyun ve omuz kaslarına giderek *Cysticercus cellulosae* gelişir. İnsanlar kistli organ ya da kasları çiğ ya da az pişmiş olarak tükettiklerinde enfeksiyona yakalanır ve 2 ay sonra dışkıyla dışarı halka atmaya başlarlar. İnsanlar aynı zamanda arakonak olduklarından bu larvalar otoenfeksiyon sonucu deri altı, beyin, göz ve kalpte de bulunabilirler (Taylor ve ark 2007). Etkenin beyine yerleştiği, baş ağrısı, nöbetler ve diğer sinirsel semptomlarla karakterize neurocysticercosis vakaları en ciddi olanlardır (Garcia ve ark 2002).

*Cysticercus cellulosae* kaynaklı cysticercosis Afrika, Asya ve Latin Amerika'da yaygın bir halk sağlığı problemi olup önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Coral-Almeida ve ark 2015). Domuz cysticercosisi Afrika, Asya ve Latin Amerika'da domuz yetiştiriciliği yapılan kırsal alanlarda oldukça yaygın olarak görülürken sanayileşmiş ülkelerde hemen hemen hiç görülmemektedir (Murrel 2005).

#### ***Echinococcus granulosus* ve *Echinococcus multilocularis***

*Echinococcus granulosus* başta köpek, kurt ve çakallar olmak üzere karnivorların incebağırsaklarında, larvası olan kist hidatid (kistik echinococcosis) ise başta koyun, keçi, sığır ve domuzlar olmak üzere insan ve diğer pek çok memelinin karaciğer, akciğer ve diğer iç organlarında yerleşir (Ayaz ve Tınar 2006). Erişkinler 1cm'den daha küçük olup 5-6 haftada incebağırsaklarda cinsel olgunluğa ulaşırlar. İçinde yüzlerce yumurta bulunan gebe halkalar ya da bu halkaların parçalanması sonucu açığa çıkan yumurtalar sonkonakların dışkı ile dışarı atılırlar. Bu yumurtalar, arakonaklar tarafından alınmasını takiben açılarak onkosfer serbest kalır ve bağırsak cidarını delerek kana karışır. Karaciğer ve akciğere, daha az olarak da diğer organlara tutunan onkosferlerden hidatik kistler ve bu kistlerin fertil olanlarının içinde de protoscoleksler gelişir. Protoscoleks ihtiva eden

bu kistli organları tüketen son konakların incebağırsaklarında protoscolekslerin herbirinden yeni erişkin cestodmeydana gelir (Soulsby 1982; Ayaz ve Tınar 2006).

*Echinococcus multilocularis* ise öncelikle tilkilerin, yanısıra köpek ve nadiren kedilerin ince bağırsağında, larvası olan alveolar kist (alveolar echinococcosis) ise kemirici ve insanların başta karaciğer ve akciğer olmak üzere iç organlarında yerleşir (Soulsby 1982; Ayaz ve Tınar 2006).

Hidatik kistler oldukça yavaş gelişip konak tarafında iyi tolere edilir ve etrafındaki organlara baskı yapmadıkça veya yırtılmadığı sürece herhangi bir klinik belirtiyeye neden olmazlar. Evcil hayvanlarda genellikle semptomsuz seyrederken verim kayıplarına neden olabilirler (Brunetti ve ark 2010). Arakonaklarda çok ciddi doku ve organ hasarları gözlenebilmektedir (Gottstein ve Reichen 2002; Torgerson ve Budke 2003).

Gerek kistik echinococcosis gerekse alveolar echinococcosis Afrika, Asya, Avrupa, Çin, Rusya gibi tüm dünyada görülmekle birlikte insanlarda alveolar echinococcosis vakalarına daha az rastlanmaktadır (Brunetti ve ark 2010). Ayaz ve Tınar (2006) değişik yazarlara atfen Türkiye'de *E. granulosus* ve kistik echinococcosis vakalarının önceki yıllara göre azalmakla birlikte küçümsenmeyecek ölçüde yaygın olduğunu bildirmekteydiler.

İnsan enfeksiyonlarında, enfekte tilki veya köpek dışkıları ile bulaşık gıdalar en temel kaynaklardan birini oluşturmaktadır. Bu nedenle özellikle çiğ olarak tüketilen sebzelerin tüketim öncesi çok iyi yıkanması hastalıktan korunmada oldukça etkili bir faktördür. (Piarroux ve ark 2013).

## **Nematodlar**

### ***Ascaris lumbricoides***

Tüm dünyada özellikle tropikal ve subtropikal bölgelerde yaşayan yaklaşık 1.4 milyar insanı etkileyen *Ascaris lumbricoides* insanların incebağırsaklarında yerleşmektedir (Chan ve ark 1994). Enfekte insanların dışkıları ile yumurtalar dışarı atılır. Aynı veya başka bireyler bu yumurtalar ile kontamine olan suları içmek, sebzeleri çiğ olarak tüketmek veya kirli ellerle temas etmek suretiyle enfeksiyona yakalanırlar. Bağırsaklarda serbest kalan genç parazitler karaciğer-akciğer göçü geçirerek tekrar bağırsaklara ulaşır ve erişkin parazit haline gelirler (Robertson ve Gjerde 2000, Garcia 2001). Hafif enfeksiyonlar genellikle klinik belirti oluşturmazken bazen ağır enfeksiyonlarda solunum güçlüğü, öksürük, hırıltılı solunum, ateş, karaciğerde apse, akciğerde Loeffler sendromu ve peritonit gözlenebilir (Umur ve ark 2006, Okutan ve ark, 2007).

Ascariasis'e Türkiye'de hemen her bölgede rastlanmakla birlikte özellikle Güneydoğu ve Doğu Anadolu ile İç Anadolu bölgesinde daha fazla rastlandığı bildirilmektedir. Özellikle çocuklarda ve sebze yetiştiricileri ile çiftlikle uğraşan bireylerde görülen bu hastalığın önlenmesi için söz konusu

bireylerin konu ile ilgili bilgilendirilmeleri, içme ve kullanma sularının, çiğ olarak tüketilen sebzelerin insan dışkısı ile temasının önlenmesi oldukça önemlidir (Özcel 2007).

### **Anisakis, Pseudoterranova ve Contraecacum**

Anisakidae ailesinde yer alan bu nematodların erişkinleri deniz memelileri, enfektif larvaları ise diğer balıklarda bulunmaktadır. *Anisakis simplex*, *Pseudoterranova decipiens* ve *Contraecacum osculatum* türleri dünyada oldukça geniş bir yayılışa sahiptir (Umur ve ark 2006). Bu ailede bulunan bazı türler insanlarda visceral larva migransa neden olmalarından dolayı halk sağlığı yönünden önem taşımaktadır (Tiğin ve ark 1992). Etkenler çiğ, az pişmiş veya marine balık tüketimi ile insanlara bulaşmaktadır (Mol 2006). Tüm dünyada görülen anisakiasis vakalarının büyük çoğunluğu deniz ürünlerinin yaygın olarak tüketildiği Asya ülkelerinde olduğu bildirilmektedir (Sterling 2006, Lymbery ve Cheah 2007). Çiğ balığın da içinde bulunduğu Japon ve diğer etnik yemeklerin popüleritesinin giderek artması balık parazitleri konusunda daha fazla ilgilenilmesi gerektiğini doğurmaktadır (Schuster ve ark 2003).

Yunuslar ve balinalar Anisakis için, foklar ve denizaslanları da *Pseudoterranova* için sonkonaktır. Erişkin parazitler bu konakların dışkıları ile dışarı yumurta atarlar. Açılan yumurtadan serbest kalarak gelişen larva kabuklular tarafından alınır ve üçüncü dönem larvalar gelişir. Balık ya da kalamar, enfekte olan bu kabukluları yediğinde larva serbest kalır, karın duvarını deler ve karın boşluğuna düşer ya da yakındaki kaslara girer. Bu enfekte canlıların deniz memelileri tarafından yenmesiyle yaşam döngüsü tamamlanır (Sakanari ve Mckerrow 1989, McClelland 2002). Anisakis larvaları başta karaciğer ve mezenterler olmak üzere balıkların iç organlarında kapsülle çevrilmiş olarak bulunur (Anderson 1992). İnsanlar enfekte balıkları çiğ ya da az pişmiş olarak tükettiklerinde bu larvalar mide veya bağırsak duvarını delerek mide rahatsızlıkları veya allerjik reaksiyonlara neden olurlar (Audicanave ark 2002). Pişirme sırasında larvalar ölse dahi zaman zaman duyarlı bireylerde allerjik reaksiyonlara yol açabilmektedir (Audicanave ark 2002, Daschner ve ark 2002, Foti ve ark 2002).

Doğanay (1994) Türkiye'de Anisakidae ailesine bağlı olan *Contraecacum* sp.'nin alabalık ve hamsilerde, Selver ve Aydoğdu (2010) Bursa yöresi balıklarında, Aydoğdu ve ark (2011) Antalya yöresi balıklarında *Contraecacum* sp. bulunduğunu bildirirken, Özkan ve ark (2010) Erzurum'da yaptıkları araştırmada istavrit balıklarında *Anisakis simplex* ve *Contraecacum aduncum*, Akmirza (2013) Gökçeada'da avlanan balıklarda *Anisakis simplex*, *Contraecacum fabri*, *Contraecacum aduncum* varlığını rapor etmişlerdir.

### **Angiostrongylus sp.**

*Angiostrongylus cantonensis* sonkonak olan ratlar ve diğer kemiricilerin akciğerinde, *A. costaricensis* sekumun subserosal arterleri ve kranial mesenterik



arterde yerleşir. Bu parazitler için suda ve karada yaşayan sümüklüler arakonak, tatlı su karidesleri, yengeçler ve karada yaşayan planariyanlar paratenik konaklılar. *Angiostrongylus cantonensis* Avustralya, Pasifik adaları, Malezya, Tayvan ve diğer Uzakdoğu ülkeleri, Hindistan ve Mısır'da rat akciğerlerinde oldukça yaygın olarak görülmektedir (Soulsby 1982). Zaman zaman tatlı su balıkları, kurbağalar ve kerevitler taşıyıcı olabilirler. Çiğ ya da az pişmiş sümüklüleri ya da transport konakları tüketen insanlar bu parazitleri de alırlar (Tsai ve ark 2001). İnsanlar bu parazitler için sonkonak olmadığından *A.cantonensis* akciğere gitmez, beyin etrafına yerleşerek eozinofilik meningoencephalitise (Soulsby 1982, Prociş ve ark 2000), *A.costaricensis* ise karnın boşluğunda kalarak ciddi bağırsak problemlerine (Wu ve ark 1997) neden olur.

Çiğ olarak tüketilen yeşil yapraklı sebzelere yapışmış olan sümüklüler ince bir mukus tabakası içinde enfektif larvaları bu sebzeler üzerine bırakabilecekleri (Simpson 1995) gibi sümüklüler sebze yapraklarının kıvrımlarının arasına da gizlenebilir (Slom ve ark 2002). Bu nedenle insanlar bu tür sebzeleri dikkatsizce tüketmeleri neticesinde de enfeksiyona yakalanabilirler.

#### **Gnathostoma sp.**

Gnathostoma cinsine ait helmintlerin erişkinleri evcil ve yabani kedi ve köpeklerin midelerine yerleşir. Genellikle iki arakonak kullanırlar. Sonkonakların dışkıyla dışarı yumurta atılır. Gelişen larva tatlı sularda yumurtayı terk eder. Suda yüzmeye başlayan bu larvalar 1.arakonak olan küçük copepodlar tarafından alınır. Bu larvaların enfektif hale gelebilmesi için ikinci arakonak olan balıklar ve diğer omurgalılar tarafından alınması gerekir. Bu hayvanlarda larvalar bağırsağı delerek kaslarda kistlenirler. İnsanlar ve diğer hayvanlar, enfekte balık, kurbağa vb. hayvanları çiğ ya da az pişmiş olarak tüketerek enfeksiyona yakalanırlar (Rojekittikhun 2002, Umur ve ark 2006). Larvalar bağırsak duvarını delerek kana karışır ve insanlarda özellikle deriye ve diğer organlara göç ederler (Hale ve ark 2003). Ancak larvalar insanlarda erişkin hale gelemeyizler (Umur ve ark 2006). İnsanlarda giderek büyüyen kabarıklıklar, zaman zaman kızarıklık ve lokal ödemle karakterize deri lezyonlarına neden olurlar. Bazen larvalar göze ve diğer organlara da giderek menenjitve başka ciddi hastalıklara da neden olabilirler (Lo Re ve Gluckman 2002, Baquera-Heredia ve ark 2002).

#### **Trichinella sp.**

Tüm dünyada oldukça yaygın olarak görülen tricinellosis (trichinosis) *Trichinella* cinsine ait nematodların meydana getirdiğı zoonoz bir enfeksiyondur (Pozio 2007). İnsan ve diğer memeliler kistlenmiş larvaların bulunduğu et ve et ürünlerini çiğ ya da az pişmiş olarak tükettiklerinde enfeksiyona yakalanırlar. İnsanlar için en yaygın enfeksiyon kaynağı domuz eti olmakla birlikte diğer

evcil ve yabani hayvanlarda insanlara enfeksiyon bulaştırabilmektedir (Pozio ve Murrel 2006)

Yaşam döngüsü tek konakta tamamlanır. Bağırsak, damar ve kaslarda gerçekleşen bu döngüde dört gömlek değıştiren parazit kas evresinde enfektiftir (Doyle 2003, Gottstein ve ark 2009). Enfektif larva taşıyan etler tüketildiğinde bağırsaklarda kistler açılır, serbest kalan genç parazitler olgunlaşarak yeni enfektif larvalar üretirler. Yeni larvalar bağırsak dışına çıkarak tüm vücuda yayılır. Domuzlarda özellikle dil ve diyaframda, bunun yanı sıra çeşitli iskelet kaslarında çok sayıda larva bulunur. Kist veya kapsül içindeki bu larvalar yıllarca canlı kalabilirler. Ancak genellikle 6-12 ay içinde kireçlenerek ölürler. Larvaların erişkin hale gelebilmesi için bir başka karnivor tarafından kasların yenmesi gerekir (Doyle 2003).

Dünyada birçok ülkede (Pozio 2007) yaygın olarak görülen trichinosis, uzun yıllar sonra Türkiye'de İzmir'de 2004 yılının ocak ayında görülmüş ve dünyadaki en büyük epidemiler arasında gösterilmiş olup ve yaklaşık 1166 kişinin hastalıktan etkilendiğı belirtilmiştir. (Özkoç ve ark 2005).

## **SONUÇ**

Sonuç olarak et, balık ve sebzelerin çiğ ya da az pişmiş olarak tüketimi bu gıdalarla insanlara çeşitli helmint hastalıklarının bulaşma riskini doğurmaktadır. Bu nedenle tüketilmeden önce et ve balıkların iyice pişirilmesi, çiğ olarak tüketilen sebze ve meyvelerin çok iyi yıkanması helmint hastalıklarından korunmada oldukça etkilidir. Bunun yanı sıra—sebze ve meyve yetiştirilen alanlara kedi, köpek gibi hayvanların girmesinin önlenmesi, insan dışkılarının gübre olarak kullanılmasının ya da dışkıların karıştığı sularla meraların veya sebze meyve bahçelerinin sulanmasının engellenmesi, gıdalarla insanlara bulaşabilecek helmint hastalıklarından korunmada son derece önemlidir.

## **KAYNAKLAR**

- Akmirza A.** Monogeneans of fish near Gökçeada, Turkey. Turk J Zool. 2013; 37:441-448.
- Anderson RC.** Nematod parasites of vertebrates. Their development and transmission. C.A.B. International, Wallingford Oxon, UK.1992.
- Audicana MT, Ansotegui IJ, de Corres LF, Kennedy MW.** *Anisakis simplex*: dangerous dead and alive? Trends Parasitol. 2002;18:20–25.
- Ayaz E, Tınar R.** Cestoda. In: Helmintoloji. Ed: Tınar R, Nobel Basımevi.2006.
- Aydoğdu A, Emre Y, Emre N, Altunel FN.** The occurrence of helminth parasites (Nemathelminthes) in some freshwater fish from streams discharging into Antalya Bay in Antalya, Turkey: two new host records

- from Antalya. Turk J Zool.2011; 35(6): 859-864.
- Baquera-Heredia J, Cruz-Reyes A, Flores-Gaxiola A, Lopez-Pulido G, Diaz-Simental E, Valderrama-Valenzuela L.** Case report: Ocular gnathostomiasis in northwestern Mexico. Am J Trop Med Hyg. 2002;66:572–574.
- Bhattacharjee HK, Yadav D, Bagga D.** Fasciolopsiasis presenting as intestinal perforation: A case report. Trop Gastroenterol. 2009;30:40-41
- Brunetti E, Kern P, Vuitton DA, Writing Panel for the WHO-IWGE.** Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. Acta Trop.2010; 114 (1): 1-16.
- Chan MS, Medley GF, Jamison D, Bundy DA.** The evaluation of potential global morbidity attributable to intestinal nematode infections. Parasitology. 1994; 109: 373-387
- Coral-Almeida M, Gabriël S, Abatih EN, Praet N, Benitez W, Dorny P.** *Taenia solium* Human Cysticercosis: A Systematic Review of Sero-epidemiological Data from Endemic Zones around the World. PLOS Negl Trop Dis 9,2015; e0003919.
- Crompton DW.** How much human helminthiasis is there in the world? J Parasitol.1999; 85(3):397-403.
- Daschner A, Cuellar C, Sanchez-Pastor S, Pascual CY, Martin-Esteban M.** Gastro-allergic anisakiasis as a consequence of simultaneous primary and secondary immune response. Parasit Immunol. 2002;24:243–251.
- Dick TA, Nelson PA, Choudhury A.** Diphyllbothriasis: update on human cases, foci, patterns, and sources of human infections and future considerations. Southeast Asian J Trop Med Pub Health. 2001;32:59–76.
- Doğanay A.** Karadeniz’den avlanan mezgit balıklarında *Hysterothlacium aduncum* (Rudolphi, 1802) olgusu. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 1994; 41(2):208-217.
- Doyle E.** Foodborn Parasites. Food Research Institute, UW-Madison.2003;October, p:13.
- el-Shabrawi M, el-Karaksy H, Okasha S, el-Hennawy A.** Human fascioliasis: clinical features and diagnostic difficulties in Egyptian children. J Trop Pediatr. 1997; 43: 162-166.
- Foti C, Nettis E, Cassano N, Di Mundo I, Vena GA.** Acute allergic reactions to *Anisakis simplex* after ingestion of anchovies. Acta Dermato-Venereologica. 2002;82:121–123.
- Garcia LS.** Diagnostic Medical Parasitology, 4th ed. ASM Pres. 2001;p:1092
- Garcia HH, Evans CAW, Nash TE, Takayanagui OM, White AC, Botero D, Rajshekhar V, Tsang VCW, Schantz PM, Allan JC, Flisser A, Correa D, Sarti E, Friedland JS, Martinez SM, Gonzalez AE, Gilman RH, and Del Brutto OH.** Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. Clin Microbiol Rev. 2002;15:747–756.
- Graczyk TK, Gilman RH, Fried B.** Fasciolopsiasis: is it a controllable food-borne disease? Parasitol Res.2001; 87(1):80-83.
- Gottstein B, Reichen J.** Hydatid lung disease (echinococcosis/hydatidosis). Clin Chest Med. 2002;23:397–408.
- Gottstein B, Pozio E, Nöckler K.** Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. Clin Microbiol Rev. 2009; 22(1): 127-145.
- Hale DC, Blumberg L, Frean J.** Case report: Gnathostomiasis in two travelers to Zambia. Am J Trop Med Hyg. 2003;68:707-709.
- Haseeb AN, el-Shazly AM, Arafa MA, Morsy AT.** A review on fascioliasis in Egypt. J Egypt Soc Parasitol. 2002;32:317–354.
- Korkmaz M.** Barsak Helmintleri. ANKEM Derg. 2006;20(Ek 2):170-176.
- Kuş FS, Sevimli FK, Miman Ö.** Türkiye’de *Cysticercus bovis* ve Halk Sağlığı Yönünden Önemi. Türkiye Parazitol Derg.2014;38(1):41-47.
- Leventhal R, Cheadle RF.** Medical Parasitology, A self-Instructional Text. 5<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Fa Davis Company. 2002; p:245.
- Lo Re V, Gluckman SJ.** Eosinophilic meningitis due to *Gnathostoma spinigerum*. J Infect. 2002;45:117–120.
- Lymbery AJ, Cheah FY:** Anisakid nematodes and anisakiasis. In: Murrell KD, Fried B (Eds): Food-Borne Parasitic Zoonoses, Fish and Plant Borne Parasites. 1st ed., pp. 185-209, Springer Science Business Media, LLC, New York, USA, 2007.
- Mas-Coma MS, Esteban JG, Bargues MD.** Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. Bull World Health Organ. 1999;77: 340–346.
- Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA.** Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. Int. J. Parasitol. 2005;35: 1255–1278.
- McClelland G.** The trouble with sealworms (*Pseudoterranova decipiens* species complex, Nematoda): a review. Parasitology.2002;124: 183–203.
- Mol S.** Çiğ Balık (Sushi) ve Sağlığımız. Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med. 2006;25 (1-2): 23-28.

- Murrel KD.** Epidemiology of Taeniosis and cysticercosis. In: WHO/FAO/OIE Guidelines for Surveillance, Prevention and Control of taeniosis/Cysticercosis. OIE, Paris. 2005;pp: 27-44.
- Nakamura-Uchiyama F, Mukae H, Nawa Y.** Paragonimiasis: a Japanese perspective. Clin Chest Med. 2002;23:409-420.
- Nithiuthai S, Anantaphruti MT, Waikagul J, Gajadhar A.** Waterborne zoonotic helminthiasis. Vet Parasitol. 2004; 126: 167-193
- Okutan O, Ugan H, Kartaloğlu Z, Kunter E, Sezer O.** *Ascaris lumbricoides*'e Bağlı Basit Pulmoner Eozinofili (Loeffler's sendromu) Olgu Sunumu. Fırat Tıp Derg. 2007. 12: 300-302.
- Özcel MA.** Ascariosis (Solucan Hastalığı). In: Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. Ed; Özcel MA. , Meta Basım, İzmir. 2007; pp: 719-728.
- Özkan Y, Aksakal E, Oğuz MC.** İstavrit (*Trachurus trachurus*, L. 1758) Balığında Kaydedilen Nematod Larvalarının Balık Boy Gruplarına Göre Karşılaştırmalı Yaygınlık, Ortalama Yoğunluk ve Bolluk Parametrelerinin Belirlenmesi. BIBAD. 2010; 3 (1): 145-147.
- Özkoç S, Bayram Delibaş S, Akısü Ç.** Trichinellosis Tanısında Western Blot tekniğinin Uygulanması. Türkiye Parazit Derg. 2005;29(1): 26-30.
- Piarroux M, Piarroux R, Knapp J, Bardonnat K, Dumortier J, Watelet J, Gerard A, Beytout J, Abergel A, Bresson-Hadni S, Guart J, for the FranceEchino Surveillance Network.** Populations at Risk for Alveolar Echinococcosis, France. Emerg Infect Dis. 2013; 19(5): 721-728.
- Pozio E, Murrell KD.** Systematics and epidemiology of Trichinella. Adv Parasitol. 2006;63: 367-439.
- Pozio E.** World distribution of Trichinella spp. infections in animals and humans. Vet. Parasitol. 2007; 149: 3-21.
- Prociw P, Spratt DM, Carlisle MS.** Neuroangiostrongyliasis: Unresolved issues. Int J Parasitol. 2000; 30(12-13):1295-1303.
- Roberts LS, Janovy J.** Gerald D. Schmidt and Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology. 5<sup>th</sup> ed. Wm. C. Brown Publ. 1996.
- Robertson LJ, Gjerde B.** Isolation and enumeration of *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts, and *Ascaris* eggs from fruits and vegetables. J Food Prot. 2000;63:775-778.
- Rojekittikhun W.** On the biology of *Gnathostoma spinigerum*. J Trop Med Parasitol. 2002;25:91-98
- Sakanari JA, McKerrow JH.** Anisakiasis. Clin Microbiol Rev. 1989;2:278-284.
- Scholz T, Garcı'a HH, Kuchta R, Wicht B.** Update on the human broad tapeworm (genus *Diphyllobothrium*), including clinical relevance. Clin Microbiol Rev. 2009. 22: 146-160.
- Schuster R, Petrini JL, Choi R.** Anisakiasis of the colon presenting as bowel obstruction. Am Surgeon. 2003;69:350-352.
- Selver M, Aydoğdu A.** Kocadere deresi (Bursa)'ndeki Kızılkanat Balıkları (*Scardinius erythrophthalmus* L. 1758)'nda İlkbahar ve Sonbahar Aylarında Görülen Helmintler. Türkiye Parazit Derg. 2010; 34: 118-121.
- Simpson TW.** More on *Angiostrongylus cantonensis* infection. New Engl J Med. 1995; 333:882.
- Slom TJ, Cortese MM, Gerber SI, Jones RC, Holtz TH, Lopez AS, Zambrano CH, Sufit RL, Sakolvaree Y, Chaicumpa W, Herwaldt BL, Johnson S.** An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from the Caribbean. New Engl J Med. 2002;346:668-675.
- Soulsby EJJL.** Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. 7<sup>th</sup> Ed., Bailliere Tindal, Philadelphia. 1982.
- Sterling CR:** Food-borne nematod infection. In: Food-borne Parasites. Ed; Ortega YR . 1<sup>st</sup> Ed., Springer Science Business Media, LLC, New York, USA, 2006; pp. 135-153.
- Taylor MA, Coop RL, Wall RL.** Veterinary Parasitology. 3<sup>th</sup> Ed., Blackwell Publishing UK. 2007.
- Tiğın Y, Burgu A, Doğanay A, Öge H, Öge S.** Balık parazitleri. Türkiye Parazit Derg. 1992;1: 103-119.
- Tınar R.** Trematoda. In: Helminтологи. Ed; Tınar R. Nobel Basımevi. 2006.
- Torgerson PR, Budke CM.** Echinococcosis an international public health challenge. Res Vet Sci. 2003;74:191-202.
- Tsai TH, Liu YC, Wann SR, Lin WR, Lee SJ, Lin HH, Chen YS, Yen MY, Yen CM.** An outbreak of meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in Kaohsiung. J Microbiol Immunol Infect. 2001; 34(1):50-56.
- Turgay N, Yolasiğmaz A.** Taeniosis. In: Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. Ed; Özcel MA, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri. 2007;pp: 691-701.
- Umur Ş, Köroğlu E, Tınar R, Güçlü F.** Nematoda. In: Helminтологи. Ed; Tınar R. Nobel Basımevi. 2006.
- Ütük AE.** Clonorchiosis ve Opistorchiosis. In: Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları. Ed; Özcel MA. Meta Basım, Bornova İzmir. 2013; p: 1145-1149.

- Watanapa P, Watanapa WB.** Liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Brit J Surg.* 2002; 89: 962–970.
- Woolf A, Gren J, Levine JA.** A clinical study of leotian refugees infected with *Clonorchis sinensis* or *Opistorchis viverrini*. *Am J Trop Med Hyg.* 1984;33: 1279-1280.
- Wu SS, French SW, Turner JA.** Eosinophilic ileitis with perforation caused by *Angiostrongylus (Parastrongylus) costaricensis*. A case study and review. *Arch Pathol Lab Med.* 1997; 121:989–991.
- Yılmaz H, Gödekmerdan A.** Human fasciolosis in Van province, Turkey. *Acta Tropica.* 2004;9:2 161–162.

## Bir koyun sürüsünde imidokarb uygulamasına bağlı kalp kası hasarının biyobelirteçler ışığında değerlendirilmesi: 5 vaka<sup>#</sup>

Mehmet Ulsan<sup>1\*</sup>, Kemal Varol<sup>1</sup>, Gencay Ekinci<sup>1</sup>, Latife ÇAKIR BAYRAM<sup>2</sup>, İhsan Keleş<sup>1</sup>  
Ali Cesur Onmaz<sup>1</sup>, Vehbi GÜNEŞ<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Kayseri, TÜRKİYE

Corresponding author e-mail: mulusan@erciyes.edu.tr

#Bu vaka raporu 11. Ulusal Veteriner İç Hastalıkları Kongresinde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

### ÖZ

Vakalar kliniğe iştahsızlık, halsizlik, enjeksiyon bölgelerinden başlayan ve vücudun diğer kısımlarına yayılan tüy dökülmesi şikayetiyle getirilen toplam beş adet, bir yaşlı, koyunda değerlendirildi. Alınan anamnezde sürüye babesiozis tedavisi için ticari imozan isimli preparatın 1.2 ml (imidokarb dipropionate 120 mg/ml) dozunda koyunların arka bacağına kas içi enjekte ettikleri belirlendi. Enjekte edilen dozun normalden 2.5-3 katı oranında daha fazla olduğu ve enjeksiyonların usulüne uygun yapılmadığı anlaşılmıştır. Yapılan frotilerde babesiozise rastlanmaması nedeniyle; CK-MB, LDH ve cTnI düzeylerindeki yükselmenin imidokarb zehirlenmesine bağlı kardiyak toksisiteden kaynaklandığı, yine enjeksiyon bölgesinden başlayan ve vücudun diğer kısımlarına yayılan tüy dökülmesi, hiperemi, ödem, ısı artışı ve konjesyonun imidokarb toksikasyonuna ve hijyenik tedbirlerin uygulanmamasına bağlı lokal değişiklikler olduğu kanaatine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** İmidokarb, Koyun, Toksikasyon, Troponin

## Determining myocardial damage in the light of biomarkers in a sheep flock as a result of imidocarb application: 5 cases

### ABSTRACT

This study was conducted at our clinics on five sheep aged one years old that had anorexia, weakness and alopecia on injection sides later on this alopecia had spread to the other parts of body. According to anamnesis, animal owner injected 1.2 ml imozan (containing 120 mg/ml imidocarb dipropionate) onto hind limb muscles intra muscularly. The injection dose were 2.5 to 3 times higher than normal dose and injections were not also made duly. Blood smears did not also revealed babesiosis. Therefore, biochemical analysis results obtained for CK-MB, LDH and cTnI could be due to imidocarb related cardiac toxication. Furthermore, it was reached to conclusion that, alopecia, hyperaemia, oedema, heat increase and congestion seen on the injection site at the beginning and then spread to whole body could be due to imidocarb toxication and might be due to local changes as a result of not taken hygienic precautions.

**Keywords:** Imidocarb, Sheep, Toxication, Troponin,

To cite this article: Ulsan M, Varol K, Ekinci G, Çakır Bayram L, Keleş İ, Onmaz AC, Güneş V. Bir koyun sürüsünde imidokarb uygulamasına bağlı kalp kası hasarının biyobelirteçler ışığında değerlendirilmesi: 5 vaka. *Kocatepe Vet J.* 2016; 9(2): 135-139.

## GİRİŞ

İmidocarb dipropionat (İMD) babesiosis tedavisinde en çok tercih edilen ilaçtır. İMD diaminides üyesi bir carbanilide olup, hızla hastalığın klinik belirtilerini düzeltir (Ekici ve Işık 2011, Adams 1881, Belloli ve ark 2002). Koyunlarda babesiosisin tedavisi için intramüsküler yolla 1,2 mg / kg dozunda birkez uygulanması önerilir. Bununla birlikte ikinci doz 10 ila 14 gün sonra hastalık kontrolü için verilebilir. Koyunlarda hastalığın profilaksisi amacıyla 2.4 mg/kg dozunda kullanılabileceği belirtilmektedir (Ekici ve Işık 2011). Yan etkileri içerisinde; salivasyon, sulanma, karın ağrısı, kusma, ishal, kaslarda tremor, huzursuzluk, nefes darlığı ve taşikardi sayılabilir. Enjeksiyon yerinde ağrı, iltihap veya ülserleşme ile sistemik anafaktik reaksiyonlar da meydana gelebilir (Ekici ve Işık 2011, Şanlı 2003). Atlarda, sığırlarda, keçilerde ve koyunlarda imidokarbın toksikasyona yol açtığı daha önce bildirilmiştir (Frerichs 1973, Aliu 1977, Adams 1977, Adams ve ark 1980, Adams 1981), Köpeklerde yüksek dozlarda enjeksiyon sonrasında şiddetli depresyon, siyanoz, karaciğer nekrozu ve ölüm gözlenmektedir. Farmakokinetik çalışmada ise İMD bir köpekte; taşikardi, ishal ve ölüme neden olmuştur. Koyunlar üzerinde yapılan deneysel bir çalışmada İMD'nin kalp fonksiyonları üzerinde etkili olabileceği bildirilmiştir (Ekici ve Işık 2011).

Veteriner hekimlikte kalp kası hasarının göstergeleri olarak serum troponin I (TnI), miyogloblin konsantrasyonları, kreatinin kinaz-MB (CK-MB), laktat dehidrogenase (LDH) ve aspartat aminotransferaz (AST) aktivitelerinin teşhis amaçlı kullanımları bilinmektedir (Coudrey 1998, Collinson ve Gaze 2007, Lobetti ve ark 2002, Sugan ve Güneş 2008, Fartashvand 2013). Troponinler üç temel ünitelerden oluşan miyofibriller proteinlerdir. Bunlar; Troponin-I (Tn-I), Troponin-T (TnT) ve Troponin-C (TnC) olarak adlandırılırlar (Sharma ve ark 2004, Adin ve ark 2005, Fartashvand 2013). Bu üç protein, troponin kompleksini oluşturur. Kalp kası ve iskelet kasında aktin ve miyozin arasındaki kalsiyum aracılı etkileşimi düzenler (Adams ve ark 1993, Coudrey 1998, Babuin ve Jaffe 2005, Sugan ve Güneş 2008). Kardiyak troponin I sadece miyokard hasarının bir belirteci olarak ifade edilmiştir. Noninvaziv tanıda artan kardiyomiyosit geçirgenliğinin ve yüksek kan konsantrasyonlarının görülmesi, insan ve hayvanlarda miyokard hasarının derecesi ile ilişkilendirilmiştir. Özellikle cTnI (Cardiac TROPONIN I) son derece hassas ve spesifik biyobelirteç olarak kabul edilmiştir (Adams ve ark 1993, Adams ve ark 1994, Collinson ve Gaze 2007, Sugan ve Güneş 2008, Fartashvand 2013).

## OLGU ÖYKÜSÜ

Bu olgular iştahsızlık, halsizlik, sürünün gerisinde kalma, inkordinasyon, ayağa kalkamama, enjeksiyon bölgelerinden başlayan ve vücudun diğer kısımlarına yayılan tüy dökülmesi şikayeti ile getirilen toplam beş adet bir yaşlı, koyunda değerlendirildi. Alınan anamnezde yetiştiricinin 1 hafta önce sarılık şikâyeti ile veteriner hekime başvurduğu ve veteriner hekim tarafından hasta hayvanlara babesiosis tedavisi için ticari imozan (imidocarb dipropionate 120 mg/ml, Provet, Türkiye) isimli preparatın verildiği bildirildi. Tedavi uygulamasının hasta sahipleri tarafından ifade edilen "1 ml'yi çok az geçecek şekilde" yaklaşık 1.2 ml dozunda koyunların arka bacağına kas içi enjekte edildiği bildirildi. İki gün sonra sürüde yan etkilere benzer klinik bulguların şekillenmeye başladığı öğrenildi. İmidokarb uygulamalarını takiben 7-10 gün sonra sürüde 20 adet koyunun öldüğü bilgisi alındı. Hastaların yapılan klinik muayenesinde vücut ısıları, nabız frekansları belirlendi (Tablo 1). Ancak sarılık ve hemoglobüriye rastlanmadı. Solunum sisteminin muayenesinde akciğerin oskültasyonunda; sert veziküler seslerin alındığı, mukozaların muayenesinde; mukozaların solgun olduğu, enjeksiyon bölgelerinden başlayıp tüm vücuda yayılan hiperemi, ödem, ısı artışı ve konjesyon tespit edildi. Ayrıca bu bölgelerde morarma ve tüy dökülmesi şekillendiği de tespit edildi (Resim 1). Lezyonlu bölgelerden yapılan sitolojik incelemede; genellikle çok sayıda nötrofil ve birkaç eozinofil belirlendi. Kan frotilerinde ise babesia etkenleri görülmedi. Alınan kan örneklerinden hematoloji ve biyokimyasal analizler yapıldı (Tablo2, Tablo 3).

**Resim 1:** Enjeksiyon Bölgesinden Kuyruk Altına Uzanan Tüy Dökülmesi, Hiperemi, Ödem, Isı Artışı Ve Konjesyon.

**Figure 1:** Starting From The Injection Sites And Had Spread To Whole Body; Pale, Hyperaemia, Oedema.



**Tablo 1:** Klinik Bulgular  
**Table 1:** Clinical Findings

Parametre	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	Referans (Aiello 2015)
Solunum (/dk)	64	80	84	52	52	16-34
Nabız (/dk)	120	124	172	124	150	70-80
Vücut ısısı (°C)	39.7	41.4	40.3	41.3	41.1	38.3-39.9

K-1: koyun 1, K-2: koyun 2, K-3: koyun 1, K-4: koyun 4, K-5: koyun 5.

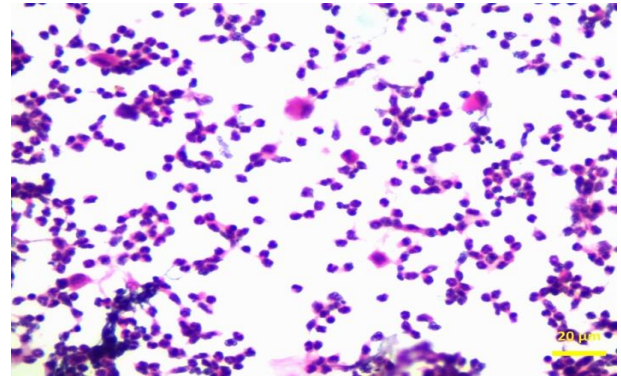
**Tablo 2:** Hematolojik Bulgular  
**Table 2:** Hematologic Findings

Parametre	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	Referans (Aiello 2015)
WBC (10 <sup>9</sup> /l)	4.93	4.98	14.14	2.75	4.11	4-12
RBC (10 <sup>9</sup> /l)	7.69	9.48	10.27	5.72	10.50	9-15
HGB (g/dl)	8.7	9.4	10.6	6.7	11.0	9-15
Hct (%)	27.6	33.0	35.3	22.1	36.0	27-45
MCV (fl)	35.9	34.8	34.3	38.7	34.3	28-40
MCH (pg)	11.4	9.9	10.3	11.8	10.5	8-12
MCHC (g/dl)	31.6	28.4	30.1	30.5	35.7	31-34
RDW (%)	12.3	12.8	8.4	18.4	11.6	18-24,6
PLT (10 <sup>9</sup> /l)	592	646	335	369	537	250-750
MPV (fL)	6.6	6.6	7.1	6.4	6.4	3,6-6,5
LYMPH (%)	34.3	32.3	7.3	35.9	45.6	50-75
MONO (%)	36.1	37.6	79.9	36.4	31.3	0-6
EOS (%)	0.2	0	0.2	0.2	0	0-8
BASO (%)	0.2	0	0.1	0.1	0.2	0,1-1
NEUT (10 <sup>9</sup> /l)	0.67	0.94	0.18	0.43	0.52	0,7-6
LYMP (10 <sup>9</sup> /l)	1.69	1.61	1.03	0.99	1.87	2-9
MON (10 <sup>9</sup> /l)	1.78	1.87	11.29	1.0	1.29	0-0,75
EOS (10 <sup>9</sup> /l)	0.01	0	0.04	0.01	0	0-1
BASO (10 <sup>9</sup> /l)	0.01	0	0.01	0	0.01	0-0,3

K-1: koyun 1, K-2: koyun 2, K-3: koyun 1, K-4: koyun 4, K-5: koyun 5.

**Resim 2:** Lezyonlu Bölgelerden Yapılan Sitolojik İncelemede; Çok Sayıda Nötrofil. Bar: x100.

**Figure 2:** Cytological Examination Made On The Region Which Lesions Occurred, Several Neutrophil Bar: x100.



**Tablo 3:** Serum Biyokimya Analiz Bulguları  
**Table 3:** Serum Biochemical Analysis Findings

Parametre	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	Referans (Kirbaş 2014, Aiello 2015)
GLU (mg/dl)	68	35	53	127	75	50-80
BUN (mg/dl)	18	24	16	47	28	8-20
CREA (mg/dl)	0.5	0.83	0.6	1.47	1.08	1.2-1.9
CA (mg/dl)	7.85	9.32	8.26	7.29	8.62	11.5-13.0
P (mg/dl)	2.09	3.12	2.93	5.79	1.88	5-7.3
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	149	145	141	150	145	139-152
K <sup>+</sup> (mmol/L)	2.92	4.58	4.12	3.46	3.25	3.9-5.4
Cl (mmol/L)	104	106	101	109	98	95-103
TBİL (mg/dl)	0.24	0.20	0.34	0.33	0.34	0.1-0.5
DBİL (mg/dl)	0.20	0.12	0.18	0.12	0,25	0.0-2.7
GGT (U/L)	35	145	58	28	60	50-22
AST (U/L)	129	211	260	653	108	60-280
ALT (U/L)	19	14	25	96	12	22-38
T P (g/dl)	25	33	6.26	51	6.33	6.0-7.9
ALP (U/L)	5.65	6.04	30	6.25	18	70-390
ALB (g/dl)	2.49	2.76	2.74	2.64	2.77	2.4-3.0
LDH (U/L)	335	480	756	358	498	240-440
CK-MB (ng/mL)	63	220	76	105	78	224.35±83.3
cTnI (ng/mL)	0.456	0.149	4.03	0.659	<0.100	0.035±0.015

K-1: koyun 1, K-2: koyun 2, K-3: koyun 1, K-4: koyun 4, K-5: koyun 5.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Babesiosisin tedavisinde ülkemizde bulunan ve kullanılmakta olan ilaçlardan biri İMD'dir. İmidokarb damardan verildiği zaman çok toksiktir. Bu nedenle genellikle kas içi ya da deri altı uygulama yöntemleri önerilir. İmidokarbin yan etkileri; öksürük, kas titremeleri, salivasyon, kolik ve yüksek dozlarda uygulanmasını takiben enjeksiyon yerinde lokal irritasyondur (Zintl 2003). Bu bilgilere paralel olarak bu çalışmadaki tüm vakalarda enjeksiyon bölgelerinden başlayıp tüm vücuda yayılan hiperemi, ödem, ısı artışı ve konjesyon olduğu, ayrıca bu bölgelerde morarma ve tüy dökülmesi de şekillendiği gözlenmiştir (Resim1). Yine enjeksiyon bölgesinden yapılan sitolojik incelemede; çok sayıda nötrofil olduğu belirlenmiştir. (Resim 2). Yine akciğerin oskültasyonunda; alınan sert veziküler sesler imidocarb toksikasyonu ile ilişkilendirilmiştir. McHardy ve ark (1986) sağlıklı koyunlara 1.2 mg/kg dozunda imidokarb enjeksiyonu yaptıklarında herhangi bir yan etkisinin görülmediğini rapor etmişlerdir. Aslani ve ark (2004) yaptıkları çalışmada ise 1.2 mg/kg dozunda imidokarb enjeksiyonundan 10-30 dakika sonra imidokarb toksikasyonuna bağlı salivasyon, inkordinasyon ve terleme gözlemlenmiştir. Bu toksikasyonun koyunların babesiosis enfeksiyonuna bağlı patolojik olarak gelişen zayıflık, yüksek ateş ve şiddetli anemiye sahip olmalarından kaynaklandığını bildirmişlerdir. Bu bulgulara paralel olarak bizim vakalarımızda da imidokarb toksikasyonuna bağlı vücut ısılarının ve solunum sayılarının yüksek olduğu (Tablo 1), halsizlik, sürünün gerisinde kalma, inkordinasyon bozukluğu, ayağa kalkamama görülmüştür.

Monositler *B. bovis* tarafından in vitro olarak istila edildiğinde konakçı hücreler tarafından stimule edilirler (Esmailnejad ve ark 2012) bu bilgilere paralel olarak bizim çalışmamızda koyunlarda hematolojik analizler sonucunda monosit sayısında ve yüzdesinde belirgin bir artış (Tablo 2) olduğu ve bu tedaviden önce gelişen babesiosis'ten kaynaklanabileceği kanısına varıldı. Ayrıca yine koyunlara yapılan hematolojik analizler sonucunda k-1 ve k-3'te eritrosit ve hemoglobin değerlerindeki azalma tespit edilmiştir (Tablo 2). Bu değişikliklerin babaesiozis enfeksiyonuna bağlı gelişen hemolizden (Esmailnejad ve ark 2012) kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Troponinler iskelet ve kardiyak kas dokusunun kontraktıl aparatın bir parçası olan düzenleyici proteinlerdir.. Özellikle cTnI kardiyak hasarda Miyogloblin, CK-MB, cTnI, AST ve LDH'a oranla kardiyak hasarın spesifik bir biyomarkerdir. Ayrıca cTnI miyokardiyal hasar için yüksek sensitivite ve spesiviteye sahiptir ve kardiyak hücrel hasarın tespiti için tercih edilen biyomarker olarak kabul edilir (Bleier ve ark 1998, Sugun ve Güneş 2008, Ekici ve Işık 2011). Ekici ve Işık (2011) deneysel

olarak imidokarb toksikasyonu oluşturdukları koyunlarda imidokarbin kardiyak toksisitesini araştırmışlar ve imidokarbin yüksek dozda uygulandığında CK-MB seviyesinde büyük bir artışa sebep olduğunu ve istatistiksel olarak anlamlı bulunduğunu, cTnI konsantrasyonlarında az bir artışa sebep olduğunu ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığını, bunlara ek olarak kardiyak toksisitenin diğer üç markeri; LDH, AST, Myoglobin değerlerinde önemli bir değişimin olmadığını bildirmişler ve bu sonuçların imidokarbin kalp fonksiyonlarını etkileyebileceğini fakat kalp için çok güçlü bir toksik bileşik olmadığını öne sürmüşlerdir. Bu bilgiler ışığında bizim çalışmamızda CK-MB ve AST seviyesinde önemli bir değişim olmadığı, LDH değerinde üç koyunda artış olduğunu ama kardiyak hasarın tespitinde daha hassas olan cTnI'de ciddi bir artışa sebep olduğu görülmüştür (Tablo 3).

Oruç Kılınç ve ark (2015) babesia ile doğal enfekte koyunlarda yaptıkları çalışmada cTnI konsantrasyonlarını hafif anemik koyunlarda ( $0.021 \pm 0.012$  ng/mL), orta derecede anemi olan koyunlarda ( $0.039 \pm 0.017$  ng/mL), ve ciddi derecede anemi olan koyunlarda ise ( $0.98 \pm 0.21$  ng/mL) olarak bulmuşlardır. Bizim bulgularımızda ise koyun 1'de 0.456 ng/mL, koyun 2'de 0.149 ng/mL, koyun 3'te 4,03 ng/mL, koyun 4'de 0.659 ng/mL, olarak bulunmuştur (Tablo 3). Bu bulgular ışığında ciddi oranda yüksek bulunan cTnI konsantrasyonunun geçirilen babesia enfeksiyonundan değil, imidokarb toksikasyonuna bağlı gelişen kardiyak hasardan kaynaklanacağı kanısına varılmıştır.

Sonuç olarak imidokarbin kalp toksisitesi üzerine daha kapsamlı çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu ve bu çalışmalarda özellikle imidokarbin kalp üzerindeki etkilerinin histolojik çalışmalarla değerlendirmeler yapılarak desteklenmesi önerildi.

## KAYNAKLAR

- Adams LG, Corrier DE, Williams JD.** A study of the toxicity of imidocarb dipropionate in cattle. *Res Vet Sci.* 1980; 28: 172-177.
- Adams JE, Bodor GS, Davila-Roman VG, Delmez JA, Apple FS, Ladenson JH, Jaffe AS.** Cardiac troponin I a marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation* 1993; 88: 101-106.
- Adams JE, Schechtman KB, Landt Y, Ladenson JH, Jaffe AS.** Comparable detection of acute myocardial infarction by creatine kinase MB isoenzyme and cardiac troponin I. *Clin Chem* 1994; 40: 1291-1295.
- Adams LG.** Clinicopathological aspects of imidocarb dipropionate toxicity in horses. *Research in Veterinary Science* 1981; 31: 54-61.



- Adin DB, Milner RJ, Berger KD, Engel C, Salute M.** Cardiac troponin I concentrations in normal dogs and cats using a bedside analyzer. *J Vet Cardiol* 2005; 7: 27–32.
- Aiello E.** [http://www.merckvetmanual.com/mvm/appendixes/reference\\_guides/hematologic\\_reference\\_ranges.html](http://www.merckvetmanual.com/mvm/appendixes/reference_guides/hematologic_reference_ranges.html) Erişim tarihi; 20.05.2015.
- Aliu YO, Davis RH, Camp BJ, Kuttler KL.** Ultrastructural renal lesions in goats given a lethal dose of imidocarb dipropionate. *Am J Vet Res* 1977; 38: 2001-2007.
- Aslani MR, Mohri M, Saljughhi H.** The Effects Of İmidocarb Dipropionate On Babesiosis İn Sheep. *Iranian Journal of Veterinary Research* 2004; 5(1): 1383.
- Babuin L, Jaffe AS.** Troponin: The biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *CMAJ* 2005; 173: 1191-1202.
- Belloli C, Crescenzo G, Lai O, Carofiglio V, Marang O, Ormas P.** Pharmacokinetics of imidocarb dipropionate in horses after intramuscular administration *Equine Veterinary Journal* *Equine vet. J.* 2002; 34(6): 625-629.
- Bleier J, Vorderwinkler KP, Falkensammer J, Mair P, Dapunt O, Puschendorf B, Mair J.** Different intracellular compartmentations of cardiac troponins and myosin heavy chains: a causal connection to their different early release after myocardial damage. *Clin Chem* 1998; 44: 1912-1918.
- Collinson PO, Gaze DC.** Biomarkers of cardiovascular damage and dysfunction an overview. *Heart Lung Circ* 2007; 16: 71-82.
- Coudrey L.** The troponins. *Arch Intern Med* 1998; 158: 1173–1180.
- Ekici OD, Işık N.** Investigation of the cardiotoxicity of imidocarb in lambs. *Revue Méd Vét* 2011; 162(1): 40-44.
- Esmailnejad B, Tavassoli M, Asri-Rezaei S.** Investigation of hematological and biochemical parameters in small ruminants naturally infected with *Babesia ovis* *Veterinary Research Forum*. 2012; 3 (1) 31-36.
- Fartashvand M, Nadalian MG, Sakha M, Safi S.** Elevated Serum Cardiac Troponin I in Cattle with Theileriosis *J Vet Intern Med* 2013; 27: 194-199.
- Frerichs WM, Allen PC, Holbrook AA.** Equine piroplasmiasis (*Babesia equi*): therapeutic trials of imidocarb dihydrochloride in horses and donkeys *Veterinary Record* 1973; 93: 73-75.
- Kırbaş A, Baydar E, Kandemir FM, Dorman E, Kızıl Ö, Yıldırım BA.** Evaluation of serum cardiac troponin I concentration in sheep with acute ruminal lactic acidosis. *VETERINARSKI ARHIV* 2014; 84(4): 355-364.
- Lobetti R, Dvir E, Pearson J.** Cardiac troponins in canine babesiosis. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 63.
- McHardy N, Woolen RM, Clampitt RB, James JA.** Efficacy, Toxicity and Metabolism of İmidocarb Dipropionate in the Treatment Of *Babesia ovis* İnfection in sheep. *Res Vet Sci* 1986; 41: 14-20.
- Oruç Kılıç Ö, Göz Y, Yüksek N, Başbuğan Y, Yılmaz AB, Ataş AD.** Determination of serum cardiac biomarkers and plasma D-dimer levels in anemic sheep with babesiosis *Turk J Vet Anim Sci* 2015; 39: 606-610.
- Sharma S, Jackson PG, Makan J.** Cardiac troponins. *J Clin Pathol* 2004; 57: 1025-1026.
- Sugen B, Güneş V.** Beyaz Kas Hastalıklı Kuzularda Kalp Kası Hasarının Teşhisinde Kardiyak Troponin Kit Analizleri ve Serum Enzim Aktivitelerinin Önemi *Sağlık Bilimleri Dergisi* 2008; 17(3): 144-149.
- Şanlı Y.** Veteriner İlaçları Rehberi ve Bilinçli İlaç Kullanımı El Kitabı. Özkan matbacılık LTD. ŞTİ. Ankara, 2003; sy. 72.
- Zintl A, Mulcahy G, Skerrett HE, Taylor SM, Gray JS.** *Babesia divergens*, a Bovine Blood Parasite of Veterinary and Zoonotic Importance 2003; 16(4): 622-636.

## Instruction for Authors

Kocatepe Veterinary Journal (KVJ) has the policy with One Medicine One Health. Research article, reviews, brief communication and case reports, letters to editor and book reviews are also welcome for consideration to publish articles of high scientific and ethical standards.

The journal is published four times a year. The publication of the text and figures is **free** of charge.

Acceptance of papers for the KVJ is undertaken by Editors. Editorial Board members adjudicate in the case of conflicting or adverse reports.

Manuscripts are accepted for consideration on the understanding that they are for publication solely in KVJ and that they neither have been published nor are under consideration for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher.

Authors accept ethical rules when article is sent for publication. If study has been approved by an Ethical Committee, Name of Ethical Committee and Number of approved study should be mentioned. Author(s) should send Copyright Transfer Agreement, after acceptance of article.

Each author accepts all ethical responsibility of the article and all authors agree with the content of the study.

**All articles sent to KVJ (Kocatepe Veterinary Journal) ONLINE submission only.**

**During submission documents which are listed below, have to install to the system;**

1. **Title Page:** Author and institution names
2. **Main text:** Author and institution names should NOT be. Tables(s), graphic(s) and figure(s) etc. Should be on the last page of article, also title of them both in Turkish and English.
3. **Article addition:** Table(s), graphic(s) and figure(s) should have been installed to the system separately.
4. **Author Approval Form (Cover Letter):** All authors need to sign it and install to the system. Signatures should be wet signatures and send to the Editorial Board of Kocatepe Veterinary Journal.
5. **Copyright:** All authors need to sign it and install to the system. Signatures should be wet signatures and send to the Editorial Board of Kocatepe Veterinary Journal.

**Article should be written using Garamond, font of 11 point, with 1.5 line spacing, margins of the A4 paper should be 2.5 cm from all edges (Word97-2010.doc). Abbreviations should be written in SI. Research article submitted to Kocatepe Veterinary Journal should be divided into the following sections:**

**Title page** (Abstract, Key words without authors name and address), **Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, Tables, Graphics, Figures.**

**Title page:** Papers should be headed with the full title, the initial letters of name and surnames of the authors, the name and address of the institution where the work is carried out. The telephone number, fax number and e-mail address of the corresponding author should also be provided. The title should be short, specific and informative.

**Abstract** Should be no more than 200 words, outlining in a single paragraph.

**Keywords,** 5 keywords that describe the crucial points of the paper should be provided. Keywords should be chosen from Turkey Science Term ([www.bilimterimleri.com](http://www.bilimterimleri.com))

**Introduction,** an updated literature related to paper and aim(s) of the study should be clearly given in this section.

**Materials and methods,** a clear account of materials used and methods employed should be given and it should be applicable/repeatable by other researchers.

**Results,** as concise as possible. Text, tables and figures illustrating the same data should be limited and succinctly outline the pertinent outcomes of the study.

**Discussion:** Results of the study should be discussed with directly relevant references. This section may also be divided into subsections.

**Conclusions:** This section should state clearly the main conclusions of the research. Results should not be repeated.

**Acknowledgements,** it is advised to acknowledge persons or institutions directly or indirectly involved in the study.

## References

References in the text should be made as follows: **Zemheri (2015)** described. / . was reported (**Zemheri 2015, Evcimen and Aslan 2005, Eryavuz et al. 2015**). List of references should be given alphabetically in the reference list. Different publications having the same author(s) of same year should be written as **2011a, 2011b**. Web address should be referenced as anonim for example **Anonim 2015**. Only official web pages should be used. Author name(s) and date should be written bold. The reference list at the end of the paper should be written as below.

### *Journal:*

**Aktop S, Gok V, Ozkan M, Kara R.** Applications of Cold Plasma in Meat and Meat Products. *Kocatepe Vet J.* 2015; 8(2):73-80.

### *Book section:*

**Juneja R, Koide SS.** Molecular Biology of Reproduction, In: *Reproduction in Farm Animals*, Ed; HafezB, Hafez ESE, 7<sup>th</sup> Ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA. 2000; pp. 354-361.

### *Web page:*

**Anonymous.** [http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb\\_id=46&ust\\_id=13](http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=46&ust_id=13); Access date: 02.01.2012.

### *Thesis:*

**Yeni D.** Some andrological parameters and biochemical properties in relation to season in rams. PhD thesis, Afyon Kocatepe University Health Science Institute, Afyonkarahisar, 2010.

**Tables:** Tables should be presented in a separate page at the end of manuscript.

**Graphics:** Figures should be presented in a separate page at the end of manuscript.

**Figures :** Figures should be presented in a separate page at the end of manuscript. Figures should be 80 or 160 mm, minimum 300 dpi.

**Titles of tables, graphics and figures should be both Turkish and English.**

**Brief Communications:** Brief communications should be concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later publication. They should not exceed 1600 words. They should bear no more than two tables or figures. An ABSTRACT should be given but no other sections. Typescripts should be clearly marked Brief Communication.

**Review Articles:** Review articles related to all medical topics are welcome for publication. They should give an update on recent advances in a particular field and be targeted at research veterinarians or clinicians who are not necessarily working in the same field. The length should not exceed 4500 words. It should have a precise abstract. Author of review should have at least two citations.

**Case Reports:** Reports of SINGLE or small numbers of cases will be considered for publication in KVJ if the case(s) are particularly unusual/rare or the report contributes materially to the literature. A case report should not exceed 1500 words and must comprise a Summary (maximum 150 words), Introduction, Case History and Discussion. The report should accomplish one of the followings:

To be a substantially novel presentation

To be a technique or treatment that would substantially alter management and prognosis of the described condition

The first clinical report or first case(s) of diseases in a particular location where epidemiology is an important factor

– To exemplify best practice in medical science.

**Letters to The Editor:** Letters describing case reports or original material may be published in the KVJ and will be peer-reviewed prior to publication. Letters making criticisms on recently published papers in the KVJ will also be considered and the corresponding authors of the original paper will be invited to respond accordingly.