

ISSN 1016-3573



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



ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ

JOURNAL OF ETLİK VETERINARY MICROBIOLOGY
ANKARA – TURKEY

Cilt/Volume 27 ♦ Sayı/Number 2 ♦ 2016

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi
Cilt/Volume 27 ♦ Sayı/Number 2 ♦ 2016
Journal of Etlik Veterinary Microbiology
Yılda iki kez yayımlanır / Published two times per year
ISSN 1016-3573

Sahibi

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

Yayın Kurulu / Publication Board

Sorumlu Yazı İşleri Müdürü / Managing Editor

Dr. A. Burak Güngör

Editör / Editor in Chief

Dr. Tahsin Onur Kevenk

Bilimsel Kurul / Editorial Board

Dr. Erhan Akçay

Dr. Asiye Dakman

Dr. Ali Erkurt

Dr. Elçin Günaydın

Dr. Filiz Şen

Adres / Address

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü

Ahmet Şefik Kolaylı Cad. No 21/21-A

06020 Etlik - Ankara / TÜRKİYE

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

Faks : +90 312 321 17 55

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

E-posta : etlikvetmikrobiyolderg@gmail.com

Hakem Listesi / Referee List*

Doç.Dr. Ramazan ADANIR	Mustafa Kemal Üniv. Veteriner Fak. Parazitoloji AD
Prof.Dr. Ferda AKAR	Adnan Menderes Üniv. Veteriner Fak. Farmakoloji Toksikoloji AD
Doç.Dr. Harun ALBAYRAK	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fak. Viroloji AD
Dr. Eray ATIL	Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü
Doç.Dr. Süleyman AYPAK	Adnan Menderes Üniv. Veteriner Fak. Parazitoloji AD
Dr. Aysel BACA	Pendik Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü
Doç.Dr. Alper ÇİFTÇİ	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fak. Mikrobiyoloji AD
Doç.Dr. Gülay ÇİFTÇİ	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fak. Biyokimya AD
Dr. Güzin İPLİKÇİOĞLU ÇİL	Ankara Üniv. Veteriner Fak. Besin Hijyeni ve Teknolojisi AD
Dr. Asiye DAKMAN	VKMAE Kanatlı Hayvan Hastalıkları Bölümü
Doç.Dr. Behire Işıl DİDİNEN	Süleyman Demirel Üniv. Eğirdir Su Ürünleri Fak. Su Ürünleri Yetiştiriciliği AD
Doç.Dr. Önder DÜZLÜ	Erciyes Üniv. Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD
Doç.Dr. Sevil ERDENLİĞ	Harran Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD
Prof.Dr. Ayhan FİLAZİ	Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Farmakoloji Toksikoloji AD
Doç.Dr. Göknuş TERZİ GÜLEL	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi AD
Doç.Dr. Timur GÜLHAN	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD
Prof.Dr. Semra GÜMÜŞOVA	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD
Dr. Elçin GÜNAYDIN	VKMAE Yetiştirme Hastalıkları Bölümü
Doç.Dr. Veli GÜLYAZ	Şap Enstitüsü Müdürlüğü
Prof.Dr. Ziya İLHAN	Balıkesir Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD
Yrd.Doç. Dr. Gökhan İNAT	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi AD
Doç.Dr. Tolga KAHRAMAN	İstanbul Üniv. Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi AD
Prof.Dr. Sezai KAYA	Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Farmakoloji Toksikoloji AD
Yrd.Doç.Dr. Erhan KEYVAN	Mustafa Kemal Üniv. Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni AD
Doç.Dr. Görkem KISMALI	Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Biyokimya AD
Doç.Dr. Ertan Emek ONUK	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fak. Su Ürünleri Hastalıklar AD
Doç.Dr. Serap SAVAŞAN	Adnan Menderes Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD
Prof.Dr. Kezban ŞAHNA	Fırat Üniv. Sağlık Bilimleri Fakültesi
Prof.Dr. Ufuk Tansel ŞİRELİ	Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni AD
Doç.Dr. Armağan Erdem ÜTÜK	Çukurova Üniv. Ceyhan Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD

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

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

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

Basım Tarihi / Publishing Date: Aralık / December 2016, Baskı adedi / Circulation: 500

Tasarım ve Baskı / Printing



Medisan Yayinevi Ltd.Şti.

Çankırı Cad. 45 / 347 Ulus - Ankara, Türkiye

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

İçindekiler / Contents

Olgu Sunumu / Case Report	Sayfa
<hr/>	
Köpeklerde Hidrosefalus Olgusuna Genel Bir Bakış An Overview of Hydrocephalus Phenomenon in Dogs Burçak Özkan, Remzi Gönül	69
Ticari Bir Florfenikol Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) Test Kiti ile Florfenikolün Tespit Edilememesi Durumu Case of not Detecting Florfenicol by A Commercial Florfenicol Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) Test Kit Yasemin Coşkun, Özlem Kafa, Yasemin Koçyiğit, Ahmet Turan Erdoğan.....	75
<hr/>	
Araştırma Makalesi / Research Article	
Şanlıurfa’da Satışa Sunulan Yoğurtlarda <i>Lactobacillus</i> spp.’lerin qPCR Miktarlarının Belirlenmesi Quantification of <i>Lactobacillus</i> spp in Yoghurt Marketing by Quantitative Real-time PCR in Şanlıurfa Province Akın Yiğın, Mehmet Demirci, Serap Kılıç Altun, Atila Yoldaş.....	82
Burdur Halk Pazarlarından Toplanan Beyaz Peynirlerde Patojen <i>Candida</i> spp. Varlığının Belirlenmesi Determination of Pathogen <i>Candida</i> spp. in White Cheese Collected from Burdur’s Public Bazaars Özen Yurdakul, Erhan Keyvan, Tuğba Ersoy	88
Piliç Boyun Derilerinden İzole Edilen <i>C. perfringens</i>’lerin Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi Antibacterial Resistance of <i>C. perfringens</i> Isolated From Chicken Neck Samples Güzin İplikçioğlu Çil, F. Seda Bilir Ormancı	93
The Determination of Virulence Factors among Fish Originated Enterococci Balık Kökenli Enterokoklarda Bazı Virülens Faktörlerinin Belirlenmesi Serap Savaşan, Şükrü Kırcan, Göksel Erbaş, Uğur Parın, Alper Çiftci.....	98
Molecular Survey of <i>Hepatozoon canis</i> in Dogs from Samsun Province of Northern Part of Turkey Türkiye’nin Samsun İlindeki Köpeklerde <i>Hepatozoon canis</i> ’in Moleküler İncelenmesi Cenk Soner Bölükbaş, Didem Pekmezci, Ali Tümay Gürler, Gökmen Zafer Pekmezci, Murat Güzel, Mustafa Açıci, Şinasi Umur.....	104

The Antioxidant Effects of *Ziziphus Jujuba* on NeurodegenerationNörodejenerasyonda *Ziziphus Jujuba*'in Antioksidan Etkileri

Altuğ Küçükgül.....108

Veteriner Mikrobiyolojide *Salmonella*'nın Tanısında PCR ve Bakteriyolojik Yöntemlerin Meta-Analize Uygunluğunun BelirlenmesiEvaluation of Usage Meta-analysis for Diagnosis of *Salmonella* spp. Using PCR and Bacteriological Methods in Veterinary Microbiology

M. Uğur Nuraloğlu, Hakan Yardımcı.....113

Derleme / Review Article**Probiyotikler: Genel Özellikleri ve Güvenilirlikleri**

Probiotics: General Features and Safety

Yağmur Koçak, Arzu Fındık, Alper Çiftci118

Balıkların Başlıca Bakteriye Zoonozları

Main Bacterial Zoonoses of Fish

İlker Hancı, Ertan Emek Onuk.....123

Canine Adenovirus Enfeksiyonları

Canine Adenovirus Infections

Fahriye Saraç131

Batı Nil Virüs Enfeksiyonu

West Nile Virus Infection

Eda Dinç, Yakup Yıldırım.....139

Toksoplazmozis Kedilerde Davranışsal Değişikliklere Neden Olabilir mi?

Can Toxoplasmosis Make Behavioural Alterations in Cats?

Didem Pekmezci, Gökmen Zafer Pekmezci149

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayın Koşulları

1. Dergi, T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün hakemli, bilimsel yayın organı olup, yılda iki defa yayımlanır. Derginin kısaltılmış adı "Etlik Vet Mikrobiyol Derg" dir.
 2. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'nde veteriner hekimlik alanında yapılan, başka bir yerde yayımlanmamış olan orijinal bilimsel araştırmalar, güncel derleme, gözlem, kısa bilimsel çalışmalar ve enstitüden haberler yayımlanır. Derleme şeklindeki yazılar; orijinal olması, en son yenilikleri içermesi, klasik bilgilerin tekrarı olmaması durumunda kabul edilir. Derlemeyi hazırlayan yazarın, o konuda ulusal ya da uluslararası düzeyde orijinal yayın ve araştırmalar yapmış olması koşulu aranır.
 3. Türkçe ve İngilizce olarak hazırlanacak metinler 12 punto Times New Roman yazı karakterinde, düz metin olarak, çift aralıklı ve kenarlarda 30 mm boşluk bırakılarak, A4 formundaki beyaz kağıda yazılmalıdır. Yazıların tamamı, şekil ve tablolar dahil olmak üzere orijinal bilimsel araştırmalarda 16, derlemelerde 10, gözlemlerde 6 ve kısa bilimsel çalışmalarda 4 sayfayı geçmemelidir.
 4. Microsoft Word formatındaki metin ile en az 300 dpi çözünürlükteki JPEG formatındaki resim/lerin tamamı etikvetmikrobiyolderg@gmail.com e-posta adresine gönderilmelidir.
 5. Türkçe orijinal çalışmalar konu başlığı, yazar/yazarların adları, adresleri, Türkçe özet ve anahtar sözcükler, İngilizce başlık, İngilizce özet ve anahtar sözcükler, giriş, materyal ve metot, bulgular, tartışma ve sonuç, teşekkür ve kaynaklar sırası ile hazırlanmalıdır. İngilizce orijinal çalışmalar konu başlığı, yazar/yazarların adları, adresleri, İngilizce özet ve anahtar sözcükler, Türkçe başlık, Türkçe özet ve anahtar sözcükler, giriş, materyal ve metot, bulgular, tartışma ve sonuç, teşekkür ve kaynaklar şeklinde hazırlanmalıdır. Kısa bilimsel çalışmaların ve derlemelerin başlık ve özet bölümleri orijinal çalışma formatında, bundan sonraki bölümleri ise, derlemelerde; giriş, metin ve kaynaklar şeklinde, kısa bilimsel çalışmalarda ise bölümlendirme yapılmadan hazırlanmalıdır.
 6. Orijinal çalışmalar ve gözlemler aşağıdaki sıraya göre düzenlenerek yazılmalıdır.
- Başlık**, kısa, konu hakkında bilgi verici olmalı ve küçük harflerle yazılmalıdır.
- Yazar(lar)ın**, ad(lar)ı küçük, soyad(lar)ı büyük harflerle yazılmalı ve unvan belirtilmemelidir.
- Özet**, Türkçe ve İngilizce olarak, tek paragraf halinde ve en fazla 500 sözcük olmalıdır.
- Anahtar kelimeler**, Türkiye Bilim Terimleri'nden seçilmeli, alfabetik sıraya göre yazılmalı ve 5 sözcüğü geçmemelidir.
- Giriş**, konu ile ilgili kısa literatür bilgisi içermeli, son paragrafında çalışmanın amacı vurgulanmalı ve iki sayfayı geçmemelidir.
- Materyal ve Metot**, ayrıntıya girmeden, anlaşılır biçimde yazılmalıdır. Başlıklar kalın, alt başlıklar italik yazı tipiyle belirtilmelidir.
- Bulgular** bölümünde veriler, tekrarlama yapmadan açık bir şekilde belirtilmelidir. Tablo başlıkları tablonun üstünde, şekil başlıkları ise şeklin altında belirtilmelidir.
- Tartışma ve Sonuç** bölümünde, araştırmanın sonucunda elde edilen bulgular, diğer araştırmacıların bulguları ile karşılaştırılmalı ve literatüre olan katkısı kısaca belirtilmelidir.
- Teşekkür** bölümü, gerekli görülüyorsa kaynaklardan hemen önce belirtilmelidir.
- Kaynaklar** bölümünde, kaynaklar listesi alfabetik ve kronolojik olarak sıralanmalı ve numaralanmalıdır. Metin içerisindeki kaynak, yazar soyadı yazılıp sıra numarası ile; cümle sonunda ise sadece sıra numarası ile **köşeli parantez** içerisinde yazılmalıdır. Cümle sonunda birden çok kaynak belirtilecek ise kaynak numaraları kü-

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

Sürelili Yayın:

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

Yazarlı Kitap:

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

Editörlü Kitap:

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

Editörlü Kitapta Bölüm:

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

Kongre Bildirileri:

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

Tezler:

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

Anonim:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

14. Dergiye gönderilen yazılar geliş tarihine göre yayımlanır.

15. Yayımlanmayan yazılar, yazarına iade edilmez.

Journal of Etlik Veterinary Microbiology Publication Conditions

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgements must be indicated before references if necessary.

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

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

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

For articles:

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

For books:

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

For edited books:

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

For chapter in edited books:

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

For congress papers:

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

For dissertations:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15. Unpublished papers are not returned to their author.

Köpeklerde Hidrosefalus Olgusuna Genel Bir Bakış

Burçak Özkan¹, Remzi Gönül²

¹ International Pet Hospital, Tiran, Arnavutluk

² İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul

Geliş Tarihi / Received: 08.02.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 09.04.2016

Özet: Yavru köpekler dahil olmak üzere, hayvanlarda en sık görülen sinir sistemi hastalıklarından biri olan hidrosefalusun doğmasal türüne daha sık rastlanmaktadır. Biz de derlememizde, günümüzde tanı ve sağaltım seçeneklerinin artış gösterdiği hastalığa detaylı bir bakış oluşturmayı amaçladık.

Anahtar Sözcükler: Köpek, Hidrosefalus

An Overview of Hydrocephalus Phenomenon in Dogs

Abstract: Congenital type of hydrocephalus which is one of the most common type of the nervous system diseases in dogs including puppies, is more frequent. With our review, we intended to create a detailed look at the disease, both diagnostic and therapeutic opportunities of which are increased.

Key Words: Hydrocephalus, dog

Giriş

Hidrosefalus genel olarak beyin-omurilik sıvısındaki (BOS) artış [15,33,42] veya serebral ventriküler yahut subaraknoid boşlukta serebrospinal sıvı toplanması şeklinde [18,20] tanımlanmaktadır.

Hastalık, BOS artışı, bu sıvının akışındaki bir tıkanma veya emilimindeki bir aksamadan kaynaklanabileceği gibi, kortikal atrofi nedeni ile de gelişebilmektedir [12,20,29]. BOS, pleksus koroideus tarafından salgılanıp ventriküler boyunca ilerleyerek absorpsiyon bölgelerine ulaşmaktadır. Obstrüksiyon birçok nedenle şekillenebilmekte ve fetal kortikal gelişimi aksatmaktadır [4,10,21,27,29]. Kortikal gelişim bozukluğu hidrosefalus hastalığındaki kortikal yetmezliklerin belirleyici unsurudur [4,10,21].

Etiyoloji

Hidrosefalus farklı kriterlere göre sınıflandırılabilir. Ventriküler sistemdeki yerleşimine göre internal ve eksternal hidrosefalus, altta yatan nedene göre kompanzasyon, obstrüktif, konjenital, idiyopatik veya edinsel hidrosefalus ve intrakranyal basınca göre ise normotansif ve hipertansif hidrosefalus türleri bulunmaktadır [13,33,35].

Doğmasal Türler

Otozomal resesif genlerden kaynaklanmakta [12,22,23,30], fakat köpeklerde nadiren bildirilmektedir [12].

Edinsel Türler

Serebral veya subaraknoid kanal obstrüksiyonu geliştiği ve normal sıvı akışı aksadığı zaman oluşmaktadır [20].

Nedenleri dört sınıfta incelenir;

Tümörler

Papillomlar, astrositomlar, ependimomalar, gangliogliomlar, oligodendrogliomlar, nöroektodermal tümörler, glioblastomalar, meningiomalar, lenfomalar ve adenomlar neden olarak gösterilmektedirler [23].

Enfeksiyon ve yangılar

Hastalığa yol açtığı bilinen ajanlar, adenovirus, myxoviruslar, lymphogranuloma venerum virus (LGV), choriomeningitis virusu, polyomavirus, mumpsvirus, parainfluenza virus Tip-3, paramyxovirus, parvovirus ve reovirus Tip-1'dir [30].

Bakteriyel yayılım genelde kulak, burun, göz ve sinüsler gibi çevre dokulardan başlamaktadır. En sık izole edilen etken streptococcus'tur [2].

Mycoplasma pulmonis ve M. pneumoniae'nin hastalığa yol açtığı gösterilmiştir [13].

Toxocara ve toxoplasma türleri insanlarda hastalığa neden olurken hayvanlarda T. gondii kaynaklı bir vaka bildirilmiştir [41].

Vasküler nedenler

Venöz ve arteriovenöz malformasyonlar, anevrizmalar, kavernomalar, travmatik hemoraji, hemostaz problemleri ve arteriel hipertansiyon nedenlerdir [37].

Zehirlenmeler

Çok sayıda toksinin, metalin ve kimyasalın fütüsü etkilediği bildirilmektedir [7].

Karyotip anomalileri ile bağlantılı özel türler

Genellikle otozomal aktarımla alakalı olan kromozomal anomaliler şeklinde ifade edilmektedir [7,30].

Predispozisyon

Küçük ve brahisefalik ırkların yatkın olduğu hastalıkta [5], en yüksek predispozisyonun Maltese, Yorkshire Terrier, English Bulldog, Chihuahua, Lhasa Apso, Boston Terrier, Mops, Chow chow, Beagle, Peckinese, Dachsund, Cocker ve Miniature Schnauzer ırklarında gözlemlendiği bildiriliyorken, erişkin yaşta cüssesi ufak olan köpeklerde hastalık gelişiminin daha sık olduğu düşünülmektedir [18,20].

Bulgular

Hastalığın klinik bulguları patogeneze bağlı olarak değişmektedir [28].

BOS Üretimindeki Artışa Bağlı Bulgular

Normal miktarın dört katına dek olan BOS üretimi kompanze edilebilirken, bu miktar aşıldığında klinik bulgular ortaya çıkmakta ve mekanik bir kompresyon ile seyretmektedir [20,26,36].

BOS Akışındaki Tıkanmaya Bağlı Bulgular

Köpeklerde en sık izlenen bulgulardır. Malformasyonlar, hemorajik ve neoplastik lezyonlara bağlı gelişmekte ve neden oldukları kompresyon sıvı akışını engellemektedir [17,20].

BOS Emilimi Azalmasına Bağlı Bulgular

Doğmasal veya edinsel meninges anomalilerinden kaynaklanmaktadır.

Kortikal Atrofiye Bağlı Bulgular

Hastalığın sekonder geliştiği tablodur.

Klinik Bulgular

Klinik bulgular, lezyona, nedene, hastanın yaşına ve Monroe,-Kellie yasasına belirlenen nöron kaybı ve kafatası iç basıncına bağlı olup, spesifik özellik taşımamaktadır [18,20,24,28].

Kafatası basıncı artışına bağlı olarak, hastalarda davranış bozuklukları (ataksi, titreme, agresivite, hipereksitasyon, letarji, koma), lokomotor sistem bozuklukları (daireler çizme, köşelere saklanma, duvara çarpma), duysal bozukluklar (görme kaybı, fotofobi, nistagmus, genişlemiş ve sabitlemiş pupillalar) ve diğer bulgular (sfinkter etkilenmesine bağlı üriner ve fekal sorunlar, kusma, konfüzyon) izlenmektedir [18,20,28].

Doğmasal form genel durum bozuklukları (büyüme geriliği, zayıflama, dehidrasyon, malnütrisyon, su alımında azalma) baş ve vücut deformasyonları, lokomotor sistem bozuklukları (denge kaybı, kaslarda katılık, depresyon, koma), oftalmik sorunlar (strabismus, eksorbitasyon) ve davranış bozuklukları ile karakterize olmakta, edinsel formdaki klinik bulgular da konjenital olana benzemektedir [20,24,40].

Araştırmacılar [24,31] yavrularda karakteristik büyük, kubbeleşmiş kafatası, kafanın üst-ortasında "açık-ayrık frontanel" denilen yumuşak bölge, öğrenme güçlüğü, ekstremitelerde zayıflık, inkoordinasyon, gıda alımında güçlük, tıknaz vücut yapısı, progresif körlük, epileptik nöbetler ile yürüyüş bozukluğu bulunduğunu bildirmişlerdir. Tek taraflı ventriküler dilatasyon varsa tek taraflı dairesel hareketler ve düşme de izlenebilmektedir [20].

Patolojik Bulgular

Hastalık için makroskobik ve mikroskobik bulgulardan söz edilmektedir [7,13,15,42]. Makroskobik bakıda beyin büyümüş, giruslar daha az belirgin izlenirken kesitte ventriküler sistemin dilate olduğu görülmektedir. Mikroskobik bakıda intersitisyel veya sitotoksik serebral ödem, sinir hücrelerinde yıkımlanma, nekroz ve kanama odakları izlenmektedir [20].

Teşhis

Hastalığın tanısı, klinik bulgularla beraber görüntüleme yöntemleri ve analizler kullanılarak yapılabilir [18,20]. Tanıda faydalanılan görüntüleme yöntemleri, radyografi (RG), ultrasonografi (USG), tomodensitometri (TDM), manyetik rezonans görüntüleme (MRI), elektroensefalografi (EEG), bilgisayarlı tomografi (BT)'dir [18,20]. Ancak brahisefalik ve ufak türlerde ventrikülerin boyutunun değişkenliği bu yöntemleri güçleştirmektedir [17,19].

RG muayenede spontan görüntüleme ve ventrikülografi uygulanmaktadır. Ancak hem hastalık hakkında az bilgi vermekte hem de yorumu güç bir teknik olduğu bilinmektedir [20].

TDM, kemik yapıları, ventrikülleri ve beynin üç boyutlu bir görünümünü sunduğundan etkin olmaktadır. Kemik yapı altında kalan yumuşak dokuyu yüksek çözünürlükle yansıttığından, sıvılar ve paraneoplastik oluşumların muayenesi açısından avantajlı, ventriküler dilatasyon ile hastalık arasında her zaman bağlantı bulunmaması nedeni ile de dezavantajlı olduğu ifade edilmektedir. [20].

USG, özellikle yeni doğanlar ve "ayrık-açık frontanel" bozukluğu olanlarda kullanılmakta ve karmaşık hidrosefalusun değerlendirilmesinde etkin olmaktadır [7,17,18]. Köpeklerde bu amaçla 7,5 veya 10 Mhz'lik prob kullanılması önerilmektedir [17]. Noninvaziv oluşu, bölünmemeyi göstermesi ve sedasyon gerektirmemesi tercih sebebi oluşturmaktadır [8,32]. Transkranyal doppler USG için veteriner hekimlikte az sayıda bildirim bulunmaktadır [32]. Bu tekniğin özellikle yeni doğanlarda kafatası iç basıncı ve serebral dolaşımın değerlendirilmesi için kullanışlı olduğu bildirilmektedir [14].

BT, bazı olgularda kullanılsa da, kistlerin BOS'dan ayrılmayıp, ilerlemiş hastalıkta beynin

anatomik yapılarının ayrımının zorlaşması ve kaviteleler arası bağlantı olup olmadığını göstermemesi dezavantajlarıdır [8]. Kontrast BT ventrikülografi, ventriküler ve hastalıkta oluşan kompartmanlar arasındaki bağlantının kontrolüne olanak tanımaktadır. Ventrikülerin kafatasına oranları, normal, sınırdaki ve anomali gösteren köpekler için tanımlanmıştır. Köpeklerde bir alanı kaplayan tümör yoksa beyin ventrikülerinin boyutları değişeceğinden ventriküler genişlemenin ölçümü güç olmaktadır [38].

MR anatomik yapılarla lezyonların ayırt edilebildiği detaylı bir görüntü oluşturmaktadır [19]. Bu yöntemle BOS akış ve hacmi kontrol edilebildiği gibi [34] kistik yapıların BOS'dan ayrılması da mümkün olmaktadır [8]. Köpeklerde tümör ve obstrüktif hastalık teşhisinde spesifik bulgular elde edilmiştir [12,16,40,42].

EEG, yorumlanması güç bir yöntem olduğu bilinmekle beraber, yangısal ve tümöral kökenli hastalığın ayırt edilmesini sağlamaktadır [17].

Serebrospinal sıvı analizi, makroskobik ve mikroskobik düzeyde gerçekleştirilmektedir [24]. Fulkerson, hidrosefalus bulunan köpeklerde serebrospinal sıvıya ilişkin anatomik, histolojik ve yapısal standartlar tanımlamıştır. Ancak bu tekniğin hipertansiyon hastalarında kontrendike olduğu bildirilmektedir [20].

Hastalık serebral ventrikülerde hipertansiyona neden olduğundan, ventriküler tansiyonun ölçülmesi tanıya yardımcı olabilmektedir. Fakat hem uygulaması hem de yorumu güç bir muayene şeklidir. Ayrıca hastalıkta tansiyon her zaman yükselmeyebilir. Bu nedenle nadiren tercih edilmektedir [29, 34]. Köpeklerde ortalama değeri $14,6 \pm 2,8$ cm H₂O gibi tanımlanan ventriküler basınç ölçümünün, akut hastalıkta 3 saat içinde %275 oranında arttığı izlenmiştir [38]. Newman ve ark., [25], optik USG ölçümünün hastalıkta akut intrakranyal basıncın değerlendirilmesi için güvenli, non invaziv bir metod olduğunu bildirmişlerdir.

Tedavi

Hastalığın kesin tedavisi cerrahi müdahale ile yapılabilir [6, 11, 35]. Medikal sağaltım, BOS üretimini azaltmak (proton pompası inhibitörleri, ozmotik diüretikler, kortikoidler), yangıyı hafifletmek (kortikoidler), hiperozmotik diürez sağlayarak

BOS emilimini artırmak veya fazla sıvının drenajı gibi semptomatik müdahaleleri kapsamaktadır [18,20,30].

Hastada akut bulgular gelişmişse, serebral ödemini azaltmak için mannitol (0,25-1,0 g/kg IV) ile başlanıp kortikosteroid uygulaması ile devam edilir. Mannitol 6-8 saat aralıklarla yinelenir. Ciddi durumlarda metilprednisolon sodyum suksinat (30 mg/kg IV) önerilmektedir. Durum stabilize olunca deksametazone (0,1 mg/kg/gün) veya prednizolon (0,25-1,0 mg/kg x2 PO veya IV) ile devam edilebilir. Bu uygulama BOS üretimini de azaltır.

Kronik veya yavaş ilerleyen semptomları olan hayvanlarda aynı tedavi önerilir. Kortikosteroidler BOS üretimini kısıtladığından, birkaç günde iyileşme gözlenir. Doz tedricen azaltılır ve semptomları kontrol etmeye yeterli miktarda devam edilir [18]. Kortikoidlerin uzun vadeli uygulamaları komplikasyon oluşmaksızın semptomların azaltılmasını sağlar. Ayrıca diuretiklerden daha etkili oldukları ifade edilmektedir [20]. BOS üretimi, 0.15mg/kg deksametazon IV uygulamasından hemen sonra azalmaya başlamakta ve uzun süreli kullanımda ilacın kesilmesini takiben belirgin intrakraniyal basınç artışı izlenmektedir [16].

BOS üretimini kısıtladığı belirtilen diğer ajanlar karbonik anhidraz enzimleri olup, hipertansiyonu olan hastalarda önerilmektedirler. Ancak bunların kortikoidlerle kullanımı aşırı potasyum kaybına neden olduğundan, hastanın sürekli takibi gerekmektedir [20].

Krizlerin kontrolü için antikonvülzanlar kullanılmaktadır. Acil durumlarda diazepam uygulaması, uzun süreli tedavi için fenobarbital (2,2 mg/kgx2 PO) tercih edilmektedir. Hastalık hepatik şant ile seyretmekte ise barbiturat metabolizması aksayacağından, propofol kullanımı önerilmektedir [18, 20].

Frontaller açık olduğunda az miktarda BOS (0,1-0,2 ml./kg) alınabilmektedir. Bunu takiben mannitol (%20'lik solüsyondan 1g/kg 30 dk), furosemid (2mg/kg SC) kortikosteroidler (deksametazon 2-4 mg/kg ya da metilprednisolon sodyum suksinat 30mg/kg IV) uygulanır ve bu tedaviye devam edilir [24].

Hastalığın posthemorajik gelişimini önlemek için intraventriküler fibrinolitik ve ürokinaz uygu-

lamaları üzerindeki çalışmalardan sonuç alındığı bildirilmiştir [39].

Beşeri hekimlikte tanımlanmış cerrahi tekniklerin bazıları veteriner hekimlikte de uygulanmaktadır [1,3,6,11,18,20,35]. Cerrahi müdahalede amaç, hidrosefalusu kontrol etmek ve karmaşık yapıyı basitleştirmektir [8, 26, 33]. Köpeklerde uygulanabilir cerrahi teknikler [6,18,24,35] ve olası komplikasyonları bildirilmektedir [1,6,18,35].

Sonuç

Hidrosefalus, köpeklerde en sık görülen doğmasal hastalıklardan birisi olup, hastalıkta erken müdahale yaşamsal önem taşımaktadır. Ayrıca karmaşık patolojisi nedeni ile detaylı inceleme ve yaklaşım gerektirmektedir. Biz de derlememizde oldukça sık karşılaşılan bu hastalığın teşhis ve sağaltım imkânlarının çoğalması nedeni ile konuya ilişkin detaylı bilgi vermeyi hedefledik.

Kaynaklar

1. Aihara Y, (2012). Novel method for controlling cerebrospinal fluid flow and intracranial pressure by use of a tandem shunt-valve system. Erişim adresi: http://cdn.intechopen.com/pdfs/29507/InTech-Nov1_method_for_controlling_cerebrospinal_fluid_flow_and_intracranial_pressure_by_use_of_a_tandem_shunt_valve_system.pdf, Erişim tarihi: 24. 02. 2012.
2. Baumgartner WK, Krakowka S, Koestner A, Evermann J, (1982). Ultrastructural evaluation of acute encephalitis and hydrocephalus in dogs caused by canine parainfluenza virus. Erişim adresi: <http://vet.sagepub.com/content/19/3/305>, Erişim tarihi: 13. 11. 2011.
3. Bayston R, Brant C, Dombrowski SM, Tuhoy M, Procop G, Luciano MG, (2008). An experimental in-vivo canine model for adult shunt infection. Erişim adresi: <http://www.cerebrospinalfluidresearch.com/content/5/1/17>, Erişim tarihi: 13. 11. 2011.
4. Cains S, Shepherd A, Bannister C, Owen-Lynch PJ, Miyan J, (2009). A study of the incidence of hydrocephalus and cortical development in HTx rats fetuses treated with folate supplements. Erişim adresi: <http://cerebrospinalfluidresearch.com/contents/6SI/S25>, Erişim tarihi: 13. 11. 2011.
5. Carvalho CF, Chammas MC, Neto JPA, Jimenez CD, Diniz SA, Cerri GG, (2010). Transcranial duplex doppler ultrasonography in dogs with hydrocephalus. Arq. Bras. Ed. Vet. Zootec. 62, 54-63.
6. Dewey CW, (2005). Surgical disorders of the brain. SCIVAC 56 th. International Congress, Erişim adresi; http://www.ivis.org/proceedings/scivac/2005/Dewey3_en.pdf?LA:1, Erişim tarihi: 13. 11. 2011.

7. Edwards JF, Gebhard-Henrik S, Fischer K, Hauzenberger A, Konar M, Steiger A, (2006). Hereditary hydrocephalus in laboratory-reared golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Vet Pathol*, 43, 523-529.
8. El-Ghandour NMF, (2012). Complex Hydrocephalus. Erişim adresi: <http://cdn.intechopen.com/pdfs/29500/InTech-Complex-hydrocephalus.pdf>, Erişim tarihi: 24. 03. 2012.
9. Fulkerson D, (2012). Interpretation of cerebrospinal parameters in children with hydrocephalus. Erişim adresi: http://cdn.intechopen.com/pdfs/29501/InTech-Interpretation_of_cerebrospinal_fluid_parameters_in_children_with_hydrocephalus.pdf, Erişim tarihi: 24. 03. 2012.
10. Gilmore EC, Herrup K, (2000). Cortical development receiving reelin. *Curr Biol*. 10, 162-166.
11. Karimzadeh P, (2012). Management of hydrocephalus. Erişim adresi: http://cdn.intechopen.com/pdfs/29502/InTech-Management_of_hydrocephalus.pdf, Erişim tarihi: 24.n 03. 2012.
12. Kim JH, Jeon HW, Woo EJ, Park HM, (2009). Dilation of the olfactory bulb cavity concurrent with hydrocephalus in four small breed dogs. *J.Vet. Sci*. 10, 173-175.
13. Kohn DF, Chinookosong N, Wang J, (1984). Mycoplasma pneumoniae-induced hydrocephalus in hamsters. *Infection and Immunity*. 46, 619-624.
14. Kolarovszki B, Zibolen M, (2012). Transcranial doppler ultrasonography in the management of neonatal hydrocephalus. Erişim adresi: http://cdn.intechopen.com/pdfs/29502/InTech-Management_of_hydrocephalus.pdf, Erişim tarihi: 24. 03. 2012.
15. Kutsal O, Hazıroğlu R, Güvenç T, Tunca R, (2002). Köpek yavrularında hidrosefalusla ilişkili preventriküler lezyonların değerlendirilmesi. *Turk J Vet Anim Sci*. 26, 1441-1446.
16. Lautersack O, Schimke E, (2003). Hydrozephelus bei hund und katze: Ätiologie, pathogenese, klinische formen und diagnostik. Teil I. Erişim adresi: http://www.kleintierpraxis-ettlingen.de/images/publikationen/drlautersack/hydrozephelus_teil_1.pdf, Erişim tarihi: 20. 12. 2011.
17. Lautersack O, Jödicke A, Tacke S, Bluhm J, Irnich B, Schimke E, (2003). Hydrozephelus bei hund und katze-therapeutische möglichkeiten und erste eigene ergebnisse. 48, 469-480. Erişim adresi: http://www.kleintierpraxis-ettlingen.de/images/publikationen/drlautersack/hydrozephelus_teil_2.pdf, Erişim tarihi: 20. 12. 2011.
18. Leib MS, Monroe EW, (1997). *Practical Small Animal Internal Medicine*. First Edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company. p. 499-501
19. Liu F, Lollis SS, Ji S, Paulsen KD, Hartov A, Roberts DW, (2009). Model-based estimation of ventricular deformation in the cat brain. *Med Image Comput Assist Interv*. 12, 308-315.
20. Maingaud SE, (2004). L'Hydrocephalie canine: etude retrospective sur 19 cas opérés à L'ENVA. These. Erişim adresi: theses.vet-alfort.fr/telecharger.php?id:690, Erişim tarihi: 20. 12. 2011
21. Mashayeki F, Draper CE, Bannister CM, Pourghasem M, Owen-Lynch PJ, Miyan JA, (2002). Deficient cortical development in the hydrocephalic texas (H-Tx) rat: a role for CSF. *Brain*. 125, 1859-1874.
22. McAllister JP, (1998). Neonatal hydrocephalus. Mechanisms and consequences. *Neurosurg Clin N Am*. 9, 73-79.
23. Mikaeloff Y, (2001). Diagnostique d'une macrocranie. *Medecine Therapeutique/Pediatrie*. 4,112-118. Erişim adresi: <http://www.jle.com/en/print/e-docs/00/03/0E/1A/article.phtml>, Erişim tarihi: 22. 11. 2011.
24. Nelson RW, Couto CG, (2003). *Small Animal Internal Medicine*. St. Louis: Mosby. p. 964-994
25. Newman WD, Hollman AS, Dutton GN, Carachi R, (2002). Measurement of optic nerve sheath diameter by ultrasound: a means of detecting acute raised intracranial pressure in hydrocephalus. *Br J Ophthalmol*. 86, 1109-1113.
26. Nicaise Séverine, (2012). Hydrocéphalie et drainage ventriculo-péritonéal. Erişim adresi: <http://www.erpicum.com/c3/hydroceph.pdf>, Erişim tarihi: 20. 03. 2012.
27. Owen-Lynch PJ, Draper CE, Mashayeki F, Bannister CM, Miyan JA, (2003). Defective cell cycle control underlies abnormal cortical development in the hydrocephalic texas rat. *Brain*. 126, 623-631.
28. Pant S, Cherian I, (2012). Clinical presentation of hydrocephalus. Erişim adresi: http://cdn.intechopen.com/pdfs/29500/InTech-Clinical_presentation_of_hydrocephalus.pdf, Erişim tarihi: 24. 03. 2012.
29. Park EH, Dombrowski SM, Luciano MG, Madsen JR, (2009). Induced canine hydrocephalus alters pulsation absorber characteristics. *Cerebrospinal Fluid Research*, Erişim adresi: <http://www.cerebrospinalfluidresearch.com/content/6/SI/S29>, Erişim tarihi: 22. 11. 2011.
30. Raith D, (2011). Hydrocephalus internus bei einem jungen steinmarder (*martes foina*)-fallbericht und retrospektive studie. Diplomarbeit. Der Veterinärmedizinischen Universität Wien. Erişim adresi: <http://www.vetmeduni.ac.at/hochschulschriften/diplomarbeiten/AC08702835.pdf>, Erişim tarihi: 14. 03. 2012.
31. Rammling M, Madan M, Paul L, Behnam B, Pattisapu JV, (2008). Evidence for reduced lymphatic BOS absorption in the H-Tx rat hydrocephalus model. Erişim adresi: <http://www.cerebrospinalfluidresearch.com/content/5/1/15>, Erişim tarihi: 13. 12. 2011.
32. Rivers WJ, Walter PA, (1992). Hydrocephalus in the dog: utility of ultrasonography as an alternate diagnostic imaging technique. *J. Am. Anim. Hospit. Assoc*. 28, 333-343.
33. Satow T, Saiki M, Kikuchi T, (2012). Complications associated with surgical treatment of hydrocephalus. Erişim adresi: http://cdn.intechopen.com/pdfs/29503/InTech-Complications_associated_with_surgical_treatment_of_hydrocephalus.pdf, Erişim tarihi: 24. 03. 2012.
34. Sivagnanam M, Jha NK, (2012). Hydrocephalus: an overview. Erişim adresi: http://cdn.intechopen.com/pdfs/29498/InTech-Hydrocephalus_an_overview.pdf, Erişim tarihi: 24. 03. 2012.
35. Stefani A, Risio L, Platt SR, Matiassek L, Lujan-Feliu-Pascual A, Garosi LS, (2011). Surgical technique, postoperative complications and outcome in 14 dogs treated for

- hydrocephalus by ventriculoperitoneal shunting. *Veterinary Surgery*. 40, 183-191.
36. Sweger EJ, Casper KB, Searce-Levie K, Conklin BR, McCarthy K, (2007). Development of hydrocephalus in mice expressing the Gi-coupled GPCR Ro1 RASSL receptor in astrocytes. *The Journal of Neuroscience*. 27, 2309-2317.
 37. Şanlı AM, Kertmen H, Güner B, (2012). Intraventricular cerebrovascular pathology of hydrocephalus and managements. Erişim adresi: http://cdn.intechopen.com/pdfs/29502/InTech-Management_of_hydrocephalus.pdf, Erişim tarihi: 24. 03. 2012.
 38. Vullo T, Manzo R, Gomez GD, Deck MDF, Cahill PT, (1998). A canine model of acute hydrocephalus with MR correlation. *Am J Neuroradiol*. 19, 1123-1125.
 39. Whitelaw A, Rivers RPA, Creighton L, Gaffney P, (1992). Low dose intraventricular fibrinolytic treatment to prevent posthaemorrhagic hydrocephalus. *Archives of Disease in Childhood*. 67, 12-14.
 40. Woo DC, Choi CB, Nam JW, Ryu KN, Jahng GH, Lee SH, Lee DW, Kim SY, Kim HY, Ahn JK, Choe BY, (2010). Quantitative analysis of hydrocephalic ventricular alterations in Yorkshire terriers using magnetic resonance imaging. *Veterinarni Medicin*. 55, 125-132.
 41. Woods LW, Anderson ML, (1992). Scoliosis and hydrocephalus in an ovine fetus infected with *Toxoplasma gondii*. *J Vet Diagn Invest*. 4, 220-222.
 42. Wünschmann A, Oglesbee M, (2001). Periventricular changes associated with spontaneous canine hydrocephalus. *Vet Pathol*. 38, 67-73.

Ticari Bir Florfenikol Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) Test Kiti ile Florfenikolün Tespit Edilememesi Durumu

Yasemin Coşkun, Özlem Kafa, Yasemin Koçyiğit, Ahmet Turan Erdoğan

İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, Toksikoloji Bölümü, İZMİR

Geliş Tarihi /Received:07.11.2014, Kabul Tarihi/Accepted: 03.03.2015

Özet: Gıda ve yemlerde bulunan antibiyotik kalıntıları tüketiciler için bazı sorunlara, antibiyotik direncinin ortaya çıkmasına ve gıda endüstrisinde kalite düşüklüğüne neden olmaktadır. Gıda kalitesini ve tüketici sağlığını korumak için Türkiye ve Avrupa Birliği ülkeleri hayvan kökenli gıdalarda azami kalıntı seviyesini belirleyen yönetmelikler hazırlamıştır. Hayvan kökenli gıdalarda ve yemlerde antibiyotik kalıntılarının izlenmesinde farklı tarama ve tarama sonrası doğrulama yöntemi sırası izlenmektedir. Bu çalışma, ticari bir florfenikol Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) test kitinin florfenikolü tespit edememesinin sebebini ortaya koymak amacıyla yapıldı. Kit muhteviyatında bulunan standartların florfenikol olmadığı kloramfenikol olduğu sıvı kromatografi sıralı kütle spektrometresi (LC-MS/MS) metodu ile tespit edildi. Kit muhteviyatının kloramfenikol ELISA metoduna göre yapılan analizinde anlamlı ışık yoğunluğu değeri ölçüldü. Yapılan analizler sonucunda ticari florfenikol ELISA test kitinin florfenikol test kiti olmadığı, kloramfenikol test kiti olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: ELISA, florfenikol, kloramfenikol, LC-MS/MS

Case of not Detecting Florfenicol by A Commercial Florfenicol Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) Test Kit

Abstract: The presence of antibiotic residues in food and feed can cause some problems for consumers or occurrence of antibiotic resistance and leads to low quality in the food industry. To protect the food quality and consumer health, Turkey and European Union implemented regulations governing maximum residue levels in certain animal origin food products. Various screening and post-screening for confirmation methods followed in monitoring the antibiotic residues in animal origin food and feed. This study was performed to determine the reason for a commercial florfenicol Enzyme Linked Immune Sorbent Assay (ELISA) test kit not detecting florfenicol. With the Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) method, the kit standards were found not to be florfenicol but chloramphenicol. Significant absorbance value was measured at the analysis of the kit content according to chloramphenicol ELISA method. As a result of the analysis, it has been concluded that the commercial florfenicol ELISA test kit was not a florfenicol test kit, but a chloramphenicol test kit.

Key words: Chloramphenicol, ELISA, florfenicol, LC-MS/MS

Giriş

Hızla artan dünya nüfusunun yeterli ve dengeli bir şekilde beslenebilmesi için gerekli hayvansal gıda maddelerinin ucuz ve bolca üretilebilmesi bütün ülkelerin gündeminde olan önemli konulardan biridir [14]. Hayvanlarda hastalıkların sağaltımı ve önlenmesi, gelişmenin hızlandırılması ve yemden yararlanmanın artırılması, paraziter hastalıkların kontrolü ve beslenmenin desteklenmesi amacıyla çok sayıda ilaç, hormon, vitamin ve mineral madde kullanılmaktadır [10]. Gıda değeri olan hayvanlarda, yasaklanmış veya tüketimine yasal olarak müsaade edilmiş antibakteriyel ilaçların, bilinçsizce ve suiistimal derecesinde kullanımı sonucunda halk

sağlığı açısından ciddi sakıncalar oluşturabileceği anlaşılmıştır. Özellikle gıda değeri olan hayvanlarda ilaç kullanımı söz konusu olduğu sürece et, süt, yumurta, bal gibi gıdalarda ilaç kalıntılarının bulunmasının önemi güncelliğini koruyacaktır [11].

Gıdalardaki ilaç ve kimyasal madde kalıntılarını ve düzeylerini ortaya koymak için son derece duyarlı, güvenilir ve tekrarlanabilir analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Birçok ülke veya Dünya Sağlık Örgütü, Gıda ve Tarım Örgütü, Avrupa Birliği, Amerika Besin ve İlaç İdaresi, ülkemizde Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ve Sağlık Bakanlığı gibi önemli kuruluşlar, tüketici sağlığını korumak amacıyla çok yönlü çalışmalar yapmaktadır. İlaç

kalıntılarının yol açabilecekleri ekonomik ve sosyal yönlü olumsuzlukların önlenmesi amacıyla, bir yandan veteriner ilaçların kullanımında etkin bir kontrol sağlanırken bir yandan da birçok ülkede aynı konularda sürdürülen çalışma ve uygulamalar arasında birlik ve uyumun düzenlenmesine çalışılmaktadır [11].

Hayvan kökenli gıdalarda antibiyotik kalıntılarının izlenmesinde sıklıkla yüksek verimli bir tarama ve tarama sonrası doğrulama yöntemi sırası izlenmektedir [9]. Tarama analizleri bir analit veya analit sınıfının varlığını 2002-657 sayılı Avrupa Birliği Kararında belirtilen seviyelere uygun olarak tespit etmek için kullanılan yöntemlerdir. Bu yöntemler çok numune akışının olduğu laboratuvarlarda olası uyumsuz sonucu olan numuneleri elemek için kullanılır. Bu seviyeler azami kalıntı limiti (Maximum Residue Limits, MRL) ya da minimum gerekli performans limiti (Minimum Required Performance Limit, MRPL) gibi düzenleme seviyeleri ya da uygulama seviyesidir. Tarama analiz metotları kalitatif ya da yarı kantitatif metotlardır. Tarama analizleri biyolojik, biyokimyasal ve fizikokimyasal yöntemlerle belirleme yapmaktadır [1,7]. Antibiyotik kalıntılarının belirlenmesinde farklı tarama ve doğrulama analiz metotları kullanılmaktadır. Kullanılan tarama metotları ile kısa zamanda çok sayıda numune antibiyotik kalıntısı yönünden analiz edilmektedir [8].

Antibiyotik kalıntılarının izlenmesinde en yaygın kullanılan yöntem mikrobiyolojik inhibisyon test yöntemidir. Bu metotları gerçekleştirmek kolay ve ucuz ancak özgüllüğü eksiktir. Herhangi bir antibiyotik olmasa bile inhibisyon oluşabilir. Tarama metotlarının diğer bir olumsuzluğu ise kullanılan antikor, bakteri veya reseptörün bir veya çok az bir antibiyotik grubunu algılayabilmesidir. Bu durum tüm antibiyotik gruplarının izlenebilmesi için farklı antibiyotik gruplarına cevap veren mikrobiyolojik inhibisyon testlerinin ya da farklı tarama testlerinin bir arada kullanılmasını gerektirmektedir. Ayrıca tarama testinden elde edilen pozitif sonuç hangi antibiyotik grubu olduğunu belirtmemektedir. Birçok durumda tarama sonrası yöntemlerinin kullanılması gerekmektedir [9].

Antijen antikor reaksiyonunu gerçekleştirmek için birçok yöntem olmasına rağmen son yıllarda en çok kullanılan yöntem ELISA testidir. Bu yöntemde, antijen ya da antikor bir enzimle işaretlenmekte

ve immunolojik reaksiyon, enzimatik bir aktivite sonucu ölçülmektedir. ELISA testinin direkt, indirekt ve sandviç ELISA gibi farklı şekilleri olmasına rağmen en sık kullanılanı sandviç ELISA yöntemi- dir [5].

Genel olarak çalışmalarda tek bir antibiyotik grubunu hedef alarak geliştirilmiş metotlar bulunmaktadır. Test materyalinde tek özütleme işlemi ile çok sayıda antibakteriyel maddenin tespit edilmesi maliyet açısından önemlidir. Bu nedenle farklı gıda maddelerinde geniş bir yelpazede antibakteriyel ilaç kalıntılarına ait tarama analizleri için genel numune hazırlama işlemleri MRL ya da MRPL altında bir seviyede yapılmalıdır. Öte yandan, materyalden gelen etkiler nedeniyle değerlendirme bazen çok zorlaşır ve sorunlar yaşanır. Sıvı kromatografi kütle spektrometresi yöntemlerinde materyalden gelen etkileri ortadan kaldırmak için aynı materyal türünden negatif olduğu bilinen materyal üzerine standart eklemesi yapılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılarak ya da aynı antibiyotik grubunda bulunan ancak ilaç olarak kullanılmayan bir türevi iç standart olarak kullanılarak değerlendirme yapılır [12]. Sıvı kromatografi sıralı kütle spektrometresi özgüllük ve duyarlılığı nedeniyle dünyada en çok kullanılan analitik cihazdır. Veteriner ilaç kalıntı analizlerinde bu tekniğin uygulanabilirliği ile ilgili kanıtlanmış birçok bilimsel makale bulunmaktadır [13].

Florfenikol, geniş spektrumlu sentetik bir antibakteriyel ilaçtır. Yapısal olarak kloramfenikole benzer ancak kloramfenikoldeki p-nitro grubu yerine metil sülfonil grubunun, hidroksil grubu yerine flor atomunun bulunması ile ondan ayrılır [2]. Florfenikol kalıntısı Ulusal Kalıntı İzleme Planı çerçevesinde kanatlı kas ve karaciğerinde, yetiştiricilik yoluyla elde edilen su ürünlerinde, yumurta ve kırmızı ette izlenmektedir [4]. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği'ne göre izinli antibiyotiklerdendir, ancak sütü ve yumurtası insan tüketimine sunulan hayvanlarda kullanılmamalıdır [3].

Bu çalışmada ticari bir florfenikol ELISA test kiti ile analizi yapılan florfenikol yönünden negatif olduğu bilinen numuneler ile negatif numunelerin üzerine analitik florfenikol standardı yüklemesi yapılarak hazırlanan yüklü numunelerin ELISA ile

analizi sonucu anlamlı ışık yoğunluğu değeri ölçülmemesi ve kit muhteviyatındaki standartlardan oluşturulan kalibrasyon eğrisinin kendi içerisinde anlamlı olmasından dolayı kit muhteviyatı standartlarının LC-MS/MS sisteminde analiz edilmesi sonucu standartların kloramfenikol olduğunun tespiti edildiği bir olgu bildirilmiştir.

Materyal ve Metot

Materyal

Çalışmamızda materyal olarak kanatlı kas ve karaciğer dokusu numuneleri ve ticari bir florfenikol ELISA test kiti muhteviyatı kullanılmıştır.

Metot

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Florfenikol (Dr.Ehrenstorfer, 00623, %99,5 saflıkta), kloramfenikol (Dr.Ehrenstorfer, 90424, %98,5 saflıkta), kloramfenikol D5 (Dr.Ehrenstorfer, 10307AC, %98,6 saflıkta), analitik saflıkta etilasetat (Sigma Aldrich), n-hekzan (Sigma Aldrich), metanol (Sigma Aldrich), amonyum asetat (Carloerba).

Kullanılan Malzemeler

Santrifüj tüpü (50 ml, polipropilen), balon joje (10 ml, 25 ml, 50 ml ve 100 ml) cam tüp (10 ml, vida kapaklı), otomatik örnekleyici vialı (1,5 ml, amber renkli cam), RC filtre (0,45 µm göz açıklığında), otomatik pipet (1 ve 5 ml, Eppendorf), mikropipet (100 ve 1000 µl, Eppendorf).

Kullanılan Ekipman

Blender (Waring, 8011 ES), hassas terazi (1 mg hassasiyette, Sartorius, CP 423 S), hassas terazi (0.1 mg hassasiyette, Sartorius, TE 214 S), vorteks (Heidolph, Reax Top), çoklu vorteks (Heidolph, Multi Reax), soğutmalı santrifüj (Hettich, Rotina 35 R), çoklu uçurucu (Caliper, Turbo Vap LV), ELISA okuyucu (Bio-Tek, EL808), 6460 serisi sıralı kütle spektrometresi (Agilent), 1260 serisi sıvı kromatografisi (Agilent), 1260 serisi pompa (Agilent), 1260 serisi degazer (Agilent), 1260 serisi otomatik örnekleyici (Agilent), 3,5µ, 100 mm x 4,6 mm ebadında kolon (Zorbax SB-C18).

Florfenikol kit muhteviyatında 96 kuyucuk, 6 standart çözeltisi (0, 0.5, 1.5, 4.5, 13.5 ve 40.5 µg/kg), enzim konjugat (enzim ile işaretli antikor), yo-

ğunlaştırılmış antikor çalışma çözeltisi, substrat A ve B çözeltileri, testi durdurma çözeltisi, yoğunlaştırılmış yıkama çözeltisi, yoğunlaştırılmış çözücü çözelti bulunmaktadır.

Testin belirleme seviyesi: 0.5 ppb

Geri Kazanım: Doku % 80±18, bal % 70±14

Çapraz Etkileşme Oranı: Florfenikol % 100, florfenikol amin % 11, tiamfenikol < % 0.1, kloramfenikol < % 0.1.

Test Numunesinden Florfenikolün Özütlenmesi: Numuneden 50 ml'lik santrifüj tüpüne 3,0 ± 0,1 g tartıldı. Üzerine 3ml saf su ardından 6 ml etil asetat eklenerek önce tekli vortekste kuvvetlice 10-15 saniye daha sonra 10 dakika çoklu vortekste karıştırıldı ve 10 dakika 20 °C de 4000 rpm'de santrifüj edildi. Üst fazdan 2 ml cam tüpe alındı ve evaporatörde 50 °C'de azot gazı ile kuruyana kadar buharlaştırıldı. Kurumuş olan özütün üzerine 3 ml n-hekzan eklenerek 10-15 saniye vorteks yardımı ile çözünmesi sağlandı. Üzerine 1 ml çözücü çözelti eklendi ve 10 dakika çoklu vortekste karıştırıldı. Ardından 10 dakika 20 °C de 4000 rpm'de santrifüj edildi. Alt fazdan 0,5 ml mikropipet ile alındı ve 0,45 nm göz açıklığındaki filtreden süzülerek 10 ml hacimli cam tüplere alındı.

Florfenikol Kontrol Kas ve Karaciğer Doku Numunelerinin Özütlenmesi: Daha önceden laboratuvarımızda analiz edilmiş ve içerisinde florfenikol bulunmayan kas ve karaciğer dokuları kontrol doku numunesi olarak kullanıldı. Homojenize edilmiş kontrol kas doku numunesinden bir santrifüj tüpüne numune ile aynı miktarda tartıldı. Özütleme işlemleri numuneye uygulandığı şekli ile aynen tekrarlandı.

Florfenikol Standardı Yüklenmiş Kas ve Karaciğer Doku Numunesinin Özütlenmesi: Homojenize edilmiş kontrol kas ve karaciğer doku numunesinden bir santrifüj tüpüne numune ile aynı miktarda tartıldı. İçerisinde 3 gram numune bulunan her tüpe, yoğunluğu 3 µg/ml derişiminde analitik florfenikol standardından 75 µl ilave edilerek 75 µg/kg florfenikol içeren yüklü numuneler hazırlandı. Özütleme işlemleri numuneye uygulandığı şekli ile aynen tekrarlandı.

Florfenikol ELISA Uygulaması: Kit içerisindeki kuyucuk ve tüm solüsyonlar analiz öncesinde, karanlık ortamda oda sıcaklığına gelinceye kadar

bekletildi. Kullanılacak standart ve numune sayıları düşünülerek gerekli sayıda kuyucuk başka bir kuyucuk taşıyıcıya alındı. Kuyucuk taşıyıcı yerleşim planı; standart çözeltileri, kontrol kas ve karaciğer doku numuneleri, standart yüklenmiş kas ve karaciğer doku numuneleri şeklinde hazırlandı. Günlük laboratuvar çalışmalarında standart 1 ve standart 6 kullanıldı. Kuyucuklara yerleşim planına uygun olarak standart ve numunelerden 50 ml eklendi. Kuyucuklara 50'şer ml seyreltilmiş antikor ilave edildi. Kuyucuk taşıyıcı el ile dairesel hareketler yaptırılarak karıştırıldı. Kuyucuk taşıyıcı, karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında 1 saat tepkimenin oluşması için bekletildi. Bekleme süresi biten kuyucuk taşıyıcı hızlıca ters çevrilerek içerik döküldü. Oda sıcaklığına gelmiş yıkama çözeltilisinden her bir kuyucuğa 250 ml olacak şekilde çoklu mikropipet yardımı ile eklendi, el ile dairesel hareketler yaptırılarak karıştırıldı ve kuyucuk taşıyıcı hızlıca ters çevrilerek içerik döküldü. Yıkama işlemi 5 kez tekrar edildi. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara 100'er ml enzim konjugat çözeltilisinden ilave edildi. Kuyucuk taşıyıcı el ile dairesel hareketler yaptırılarak karıştırıldı. Kuyucuk taşıyıcı, karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında 30 dakika tepkimenin oluşması için bekletildi. Bekleme süresi biten kuyucuk taşıyıcı hızlıca ters çevrilerek içerik döküldü. Yıkama işlemi 5 kez yapıldı. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara 50'şer ml substrat A ve 50'şer ml substrat B çözeltilerinden sırasıyla ilave edildi. El ile dairesel hareketler yaptırılarak karıştırıldı. Kuyucuk taşıyıcı, karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında 30 dakika tepkimenin oluşması için bekletildi.

Bekleme sonrası her kuyucuğa 50 ml testi durdurma çözeltilisi ilave edildi ve dikkatlice karıştırıldı. Kuyucuk taşıyıcı, 5 dakika içerisinde ELISA okuyucuya yerleştirildi ve 450 nm dalga boyunda ışık yoğunluğu değeri okutuldu. Işık yoğunluğu değeri ile numunede bulunan florfenikol miktarı arasında negatif bağıntı bulunmaktadır.

Florfenikol ve kloramfenikol bileşiklerinin LC-MS/MS cihazı ile tespit edilmesinde Coşkun ve ark. [8]'nin bildirdiği metot kullanılmıştır. Numunelerin özütlemesi su ve etil asetat ile gerçekleştirildi. Santrifüj ile kaba parçacıklar çöktürüldü, üst faz alınarak kuruyana kadar buharlaştırıldı. Kurumuş olan özüt su ve n-hekzan ile çözüldü, santrifüj edildi, alt faz filtreden geçirilerek LC-MS/MS sistemine enjekte edildi. Bu özütleme ile amfenikol türevi florfenikol, tiyamfenikol ve kloramfenikol bileşikleri tespit edildi.

Bulgular

Daha önceden laboratuvarımızda analiz edilerek içerisinde florfenikol bulunmayan kontrol kas ve karaciğer dokusu numuneleri ve üzerine analitik florfenikol standardı yüklenen numuneler ve florfenikol yönünden analiz edilmek üzere laboratuvara gelen numuneler kit içerisinde bildirilen yöntemle göre özütlendi, ELISA işlem sırası uygulanarak ışık yoğunluğu değeri ELISA okuyucuda ölçüldü. Üzerine analitik florfenikol standardı yüklenen numuneler ile kontrol kas ve karaciğer dokusu numuneleri arasında ışık yoğunluğu değeri farkı olmadığı, kitin kendi standartları arasında fark olduğu görüldü (Tablo 1).

Tablo 1. Florfenikol kitine göre özütlenen ve ELISA işlemi uygulanan standart, kontrol kas doku ve standart yüklenmiş kas dokularından elde edilen ışık yoğunluğu değerleri.

Numunenin cinsi	Uygulama sayısı	İçindeki standart miktarı, µg/kg	ELISA okuyucuda okunan ışık yoğunluğu değeri	
			Uygulama 1	Uygulama 2
Standart 1	2	0	2.924	2.930
Standart 6	2	40.5	0.246	0.259
Laboratuarda hazırlanan florfenikol analitik standardı	2	40.5	2.257	2.177
Negatif tavuk eti numunesi	2	-	2.853	2.979
Standart yüklemesi yapılan tavuk eti numunesi	2	75	2.934	2.822
Negatif kanatlı karaciğer numunesi	2	-	2.948	2.664
Standart yüklemesi yapılan kanatlı karaciğer numunesi	2	75	2.726	2.635

Florfenikol yönünden negatif olduğu bilinen kanatlı kas ve karaciğer dokusu numuneleri ve analitik florfenikol standardı yüklenerek hazırlanan

numuneler LC-MS/MS cihazına verildi ve cihazda yükleme yapılan miktarda florfenikol tespit edildi (Tablo 2).

Tablo 2. Kontrol doku ve standart yüklenerek hazırlanan doku numunelerinin LC-MS/MS cihazında çalışma sonuçları.

Numunenin cinsi	Uygulama sayısı	Negatif numune üzerine yüklenen analitik standart miktarı, µg/kg	Florfenikol	
			Alıkonulma zamanı, dakika	Miktarı, µg/kg
Negatif tavuk eti numunesi	1	-	-	-
Standart yüklemesi yapılan tavuk eti numunesi	2	50	3.358	50.7
Standart yüklemesi yapılan tavuk eti numunesi	1	100	3.363	99.7
Negatif kanatlı karaciğer numunesi	1	-	-	-
Standart yüklemesi yapılan kanatlı karaciğer numunesi	1	250	3.358	250.2
Standart yüklemesi yapılan kanatlı karaciğer numunesi	1	500	3.358	499.9

Kit içerisinde gelen ve florfenikol olduğu belirtilen standartlar LC-MS/MS cihazına verildi. Analitik florfenikol standartları ile kalibrasyon eğrisi oluşturularak kit standartları karşılaştırıldı. Florfenikol ile uyumlu sonuç bulunamadı; standartlar

tekrar cihaza verilerek amfenikol grubunda bulunan diğer bileşik olan kloramfenikol yönünden değerlendirildi ve standartların kloramfenikol olduğu tespit edildi (Tablo 3).

Tablo 3. Florfenikol kit içeriğinde bulunan standartların LC-MS/MS cihazında çalışma sonuçları.

Standart türü	İçerisindeki standart miktarı, µg/kg	Florfenikol alıkonulma zamanı, dakika	Kloramfenikol alıkonulma zamanı, dakika	Kit Standardı alıkonulma zamanı, dakika
Analitik standart		3.348	3.795	
Kit Standardı 1	0			-
Kit Standardı 2	0.5			3.795
Kit Standardı 3	1.5			3.800
Kit Standardı 4	4.5			3.795
Kit Standardı 5	13.5			3.795
Kit Standardı 6	40.5			3.795

Kloramfenikol yönünden negatif olan numuneler üzerine kloramfenikol standardı yüklemesi yapılarak negatif ve standart yüklü numuneler aynı firmanın kloramfenikol kitinin özütlemeye yöntemine göre özütlendi, ELISA işlem sırası izlenerek nu-

munelerin ELISA okuyucuda ışık yoğunluğu değeri ölçüldü. Negatif numune ile standart yüklemesi yapılan numuneler arasında anlamlı ışık yoğunluğu değeri farkı tespit edildi (Tablo 4).

Tablo 4. Kloramfenikol kitine göre özütlenen ve ELISA işlemi uygulanan standart, kontrol kas doku ve standart yüklenmiş kas dokularından elde edilen ışık yoğunluğu değerleri.

	Uygulama sayısı	İçindeki standart miktarı, µg/kg	ELISA okuyucuda okunan ışık yoğunluğu değeri	
			Uygulama 1	Uygulama 2
Standart 1	1		1.369	-
Standart 2	1		1.068	-
Standart 3	1		0.880	-
Standart 4	1		0.470	-
Standart 5	1		0.247	-
Standart 6	1		0.141	-
Kloramfenikol yönünden negatif tavuk eti numunesi	2	-	1.701	1.617
Kloramfenikol standardı yüklenen tavuk eti numunesi	2	0.3	0.572	0.554
Kloramfenikol standardı yüklenen tavuk eti numunesi	2	0.6	0.389	0.388

Tartışma ve Sonuç

Besinlerde bulunan ilaç kalıntıları insanlarda hafif bir alerjiden başlayarak, çeşitli doku ve organlarda hasara ve anafilaktik şoktan ölüme kadar gidebilecek derecede değişik şiddette zehirlenmelere, karsinojenik ve farmakolojik etkilere, cinsiyet özellikleri ve davranışlarda değişikliklere, üreme bozukluklarına, bakteri, protozoa, parazit türleri arasında dirençli suşların ortaya çıkması ve böylece ilaçların sağaltıcı ve koruyucu etkilerinin azalmasına, gıda endüstrisinde üretim hatalarının ortaya çıkmasına ve sindirim kanalındaki mikroflora topluluğunda değişikliklere sebep olmaktadır [11].

Besinlerdeki ilaç kalıntılarında karşı tüketici sağlığının etkin biçimde korunabilmesi için her çeşit hayvansal besinde bulunacak ilaç kalıntısı çeşitleriyle kirlenme düzeylerinin sınırlandırılması son derece önem taşır [10]. Bu nedenle, hayvansal dokularda ve biyolojik sıvılarda antibiyotik analizlerinin yapılması giderek önem kazanmıştır [14]. Hayvansal besinlerin antibiyotik kalıntılarında arındırılabilmesi için uygulanması gereken yasal bekletme süresi, ilaçla tedavinin durdurulması ve besinlerde bulunmasına izin verilen kalıntı miktarlarının sınırlarının belirlenmesi amacıyla yapılan analizler, gıda güvenliği ve toplum sağlığı yönünden yapılan çalışmalara katkı sağlar [6].

Bir tarama yöntemi için temel koşul farmakolojik aktif maddeyi güvenli bir şekilde hedef yoğunlukta tespit etmek ve negatif sonuçları elemektir. Tarama analizlerinde eleme yoğunluğu numunedeki herhangi bir pozitifliği göstermesi açısından MRL karşılayacak şekilde düşük olmalıdır. Tarama hedef yoğunluğu ve düzenleme limiti arasındaki farkın yeterli olması gerekmektedir [7].

Çalışmamızda kullanılan florfenikol kitinin florfenikole cevap vermediği kit standartları, kontrol numuneleri ile analitik standart yüklenen numuneler arasında anlamlı ışık yoğunluğu farkı oluşmaması sonucu tespit edilmiştir. Kitin florfenikole cevap vermemesinin olası nedenleri; kitin üretim yerinden laboratuvara getirilirken ve/veya laboratuvarında uygun şartlarda muhafaza edilmemesi, yükleme yapılan analitik standardın etkinliğini kaybetmesi, analizi yapan personelin ELISA işlemi sırasında uyması gereken kurallara uymaması, kitin veya kit muhteviyatında bulunan bir maddenin son kullanma tarihinin geçmiş olması, kitin üretimi veya etiketlenmesi sırasında hata yapılmış olması olasılığıdır. Analiz sonuçları florfenikol yerine kloramfenikol konulduğunu gösterdiğinden bu tahminleri destekler niteliktedir.

Çalışmamızda florfenikol kitinin florfenikol özütleme yöntemine göre yapılan analizinde negatif numune ile yüklü numune arasında ışık yoğunluğu

farkı olmaması kitin florfenikole duyarlı olmadığını göstermektedir. Kitin kendi standartları ile ölçülen ışık yoğunluğu farkı ise kitin başka bir etkin maddeye karşı duyarlı olduğunu standartların bu etkin maddenin standartları olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, bu olgu raporu veteriner ilaç kalıntılarının tespiti amacıyla kullanılan tarama analiz kitlerinin aranılan etkin maddeye duyarlılığının belirlenmesi için içerisinde aranılan ilaç etkin maddesini içermeyen numune ve bu numune üzerine aranılan etkin maddenin yüklemesi ile hazırlanan numunenin aynı şartlarda özütlenmesinin yapılarak kitin çalışıp çalışmadığının belirlenmesi çok önemlidir. Laboratuvarında kullanılan tarama analiz kitlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin bilinmesi ve sonuçların buna göre değerlendirilmesi, ülkemizde kullanılan kitlerin Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından değerlendirilerek onay alan kitlerin kullanılmasının gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından önemli olduğu ortaya konulmuştur.

Kaynaklar

1. Anonim, (2002). Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002: implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off J Eur Comm. L221:8-36.
2. Anonim, (2002). Florfenicol (Extension to all food producing species) Summary Report (6). Erişim adresi: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits-Report/2009/11/WC500014282.pdf, Erişim tarihi: 20.06.2014.
3. Anonim, (2012). Türk Gıda Kodeksi. Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitlerinin Yönetmeliği. T.C. Resmi Gazete, 04 Mayıs 2012, Sayı: 28282.
4. Anonim, (2014). Ulusal kalıntı izleme planı. Erişim adresi: <http://www.tarim.gov.tr/Konular/Gida-Ve-Yem-Hizmetleri/Gida-Hizmetleri/Kalinti-Izleme>, Erişim tarihi: 20.06.2014.
5. Aras Z, (2011). Mikrobiyolojide kullanılan hızlı tanı yöntemleri. Türk. Hij. Den. Biyol. Derg., 68 (2): 97-104.
6. Booth JM, Harding F, (1986). Testing for antibiotics residues in milk. Vet. Rec. Dec., 119 (23): 565-569.
7. Community Reference Laboratories Residues (CRLs) (2010). Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer). Erişim adresi: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/Guideline_Validation_Screening_en.pdf, Erişim tarihi: 24.02.2011.
8. Coşkun Y, Erdoğan AT, Özdemir G, Uysaler R, Uludağ R, (2012). Tavuk Etinde Antibiyotik Kalıntılarının Sıvı Kromatografi Sıralı Kütle Spektrometresi ile Çoklu Kalıntı Tarama Analizi İçin Metot Geliştirilmesi, Bornova Vet. Bil. Derg., 34 (48): 17-30, 2012.
9. Granelli K, Elgerud C, Lundström A, Ohlsson A, Sjöberg P, (2009). Rapid multi-residue analysis of antibiotics in muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal. Chim. Acta, 637: 87-91.
10. Kaya S, (1994). Besinlerdeki veteriner ilaç kalıntıları, bilimsel ve yasal denetim. Türkiye'de Veteriner İlaçları Üretimi, Pazarlanması, Güvenli Kullanımı ve Kalıntı Sorunları Sempozyumu, Ekim, 13-14, Ankara- Türkiye.
11. Kaya S, (2005). Gıdalarda Veteriner Hekimliği İlaçları ile İlgili Kalıntı Sorunu. Birinci Ulusal Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi, Eylül, 22-24, Ankara- Türkiye.
12. Marazuela MD, Bogianni S, (2009). A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods. Anal. Chim. Acta, 645: 5-17.
13. Muñoz P, Blanca J, Ramos R, Bartolomé M, García E, Méndez N, Gomez J, Pozuelo MM, (2004). A versatile liquid chromatography-tandem mass spectrometry system for the analysis of different groups of veterinary drugs. Anal. Chim. Acta, 529: 137-144.
14. Şanlı Y, (1994). Hayvan yetiştiriciliğinde antibakteriyel ilaç kullanımı ve çok yönlü sakıncaları. Türkiye'de Veteriner İlaçları Üretimi, Pazarlanması, Güvenli Kullanımı ve Kalıntı Sorunları Sempozyumu, Ekim, 13-14, Ankara- Türkiye.

Şanlıurfa'da Satışa Sunulan Yoğurtlarda *Lactobacillus* spp.'lerin qPCR Miktarlarının Belirlenmesi

Akın Yiğın¹, Mehmet Demirci², Serap Kılıç Altun³, Atila Yoldaş⁴

¹ Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı Şanlıurfa

² İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

³ Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni Anabilim Dalı Şanlıurfa

⁴ Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Kahramanmaraş

Geliş Tarihi / Received: 19.08.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 23.09.2016

Özet: Yoğurt; geleneksel süt fermentasyonunda büyük bir rol oynayan ve probiyotik etkinlikleri olan bakterileri içermesi nedeniyle hayatımıza sağlık katan en önemli besin maddelerinden biridir. Günümüzde oldukça fazla tüketilen probiyotiklerin; yoğurtlardaki miktarlarının artması veya azalması ve mikrobiyolojik kalitelerinin tespiti halk sağlığı açısından irdelenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, Şanlıurfa ili ve çevre ilçelerinde satışa sunulan yoğurtlarda; probiyotik olarak önemi sıkça bildirilen *Lactobacillus* spp.'lerin (LAB) qPCR metodu ile tanımlanarak, kantitatif olarak miktar analizinin yapılması amaçlanmıştır. Yoğurt örneklerinden direk izolasyon ile elde edilen DNA'lardan *Lactobacillus* spp.'nin qPCR ile tespiti için; *Lactobacillus* spp. 16S-23S ribosomal RNA Intergenic Spacer Region (ISR) gen bölgesine spesifik primerler kullanılmıştır. Real-time PCR ile yapılan analizler sonucunda, 14 ile 32 aralığında Ct saptanmıştır ve kantitatif analizin hassasiyetini korumak için, miktarları belli plazmid standart kullanarak 10^2 ile 10^8 CFU/g arasında standart eğri elde edildi ve real-time PCR analizlerinde kantitasyon bu eğri ile gerçekleştirilmiştir. Bu sayede alt limit olarak 10^2 CFU/g gibi hassas bir alt limit belirlenmiştir. Sonuçlar, *Lactobacillus* spp. insan sağlığı açısından değerli, probiyotik bakterilerin, bölgemizde satışa sunulan ev yapımı yoğurtlarda daha düşük düzeyde bulunduğunu, bölgemizdeki bu yoğurtların, tüketime olgunlaşma süreci tamamlanmadan sunuluyor olabileceğini, bu ürünlerin üretim sürecinde dikkat edilmesi gerektiği tespit edilmiştir. Ayrıca sonuçlar, ülkemizde ilk kez klasik mikrobiyolojik yöntemler yerine, real-time PCR yönteminin insan sağlığı açısından probiyotik önemleri olan *Lactobacillus* spp.'lerin miktar analizlerinde hızlı, hassas ve güvenilir olarak tespiti için kullanılabilir bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Kantitasyon, *Lactobacillus* spp., real-time PCR, yoğurt

Quantification of *Lactobacillus* spp in Yoghurt Marketing by Quantitative Real-time PCR in Şanlıurfa Province

Abstract: It has already known that the health and biological effects of yoghurt is based on the bacteria with probiotic efficacy which are responsible for the traditional milk fermentation. Thus, any possible increase or decrease on the amount of such bacteria is very critical in terms of human health. While the importance of the probiotics consumption is rising crucially, the microbiological quality detection of the yoghurt based on the probiotics should be considered carefully regarding the public health. We aimed to quantify the *Lactobacillus* spp. (LAB), recently reported as an important probiotic on the DNA molecules directly isolated from handmade yoghurt products marketing by local people in Şanlıurfa province and nearby cities with qPCR method. For the identification of the *Lactobacillus* spp. (LAB) from the DNA molecules isolated from the yoghurt products, specific primers for *Lactobacillus* spp. 16S-23S ribosomal RNA Intergenic Spacer Region (ISR) were utilized. The Ct range of qPCR analysis were detected between 14-32. In order to maintain the sensitivity of the quantitative analysis, a standard curve was plotted between 10^2 and 10^8 CFU/g by using a specific plasmid standard series. Thus we managed to determine a sensitive threshold of 10^2 CFU/g. Our results indicated that the amount of such important probiotic bacteria as *Lactobacillus* spp. was at lower levels in handmade yoghurt products offered in our region. The main reason of these levels can be caused from the maturation process of the product. The factors which are crucial for the production period and method should be considered vigilantly. Furthermore; instead of traditional microbiological methods, a novel real-time PCR method was used in *Lactobacillus* spp. quantification that have important probiotic role with regards to public health. Additionally it is confirmed that this rapid, sensitive and robust method can be employed for the identification.

Key words: *Lactobacillus* spp., quantitation, real-time PCR, yoghurt.

Giriş

Lactobacillus cinsi üyeleri, düşük G+C içeriğine sahip, Gram pozitif, spor oluşturmeyen, hareketsiz, aerotolerant, fakültatif anaerob ve homofermentatif

bakterilerdir [14]. Bu bakteriler insanlar ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinin doğal florasında bulunmaktadır [6]. Ayrıca süt, et, meyve, sebze ve hububatların doğal florasında da bulunan *Lactobacillus* spp.'ler yüzyıllar boyunca gıda fermentasyon

işlemlerinde kullanılmaktadır [21]. Bazı türleri, süt ürünlerinde, gıda fermantasyon sürecini kontrol eden başlatıcı ya da yardımcı kültürler olarak bilinmektedir [1]. Son yıllarda, bu bakterilerin probiyotik özellikleri olduğuna inanılmasından dolayı, ticari olarak ürünlerde çok yoğun düzeyde kullanılmaktadırlar [10]. Probiyotik amaçlı en sık kullanılan türler ise *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei subsp. paracasei*, *L. delbrueckii* ve *L. johnsonii*'dir [20]. *L. rhamnosus*'da özellikle yeni tip yoğurtlarda bulunmaktadır [4]. Oluşturulan ticari ürünlerde kalitenin kontrolü ve üreticilerin uymaları gereken yerel ve Avrupa Sağlık Talep Yönetmeliği [3] gibi genel kurallar nedeniyle gıdalarda *Lactobacillus* spp.'lerin identifiye ve kantite edilmesine yönelik tanı araçlarının oluşturulmasına ihtiyaç doğurmuştur [15]. Ayrıca tür düzeyinde bu bakterilerin, genomik özellikleri temelli, hızlı ve güvenilir tanı araçları gereklidir [13].

Bu çalışmada, Şanlıurfa ili ve çevre ilçelerinden satışa sunulan yoğurtlardan direkt izolasyonla elde edilen DNA'larda, son yıllarda insan sağlığı açısından probiyotik olarak önemi sıkça bildirilen *Lactobacillus* spp.'lerin (LAB) qPCR metodu ile tanımlanarak, kantitatif olarak miktar analizinin yapılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Çalışmamızda Şanlıurfa ili ve çevresinde pazar ve marketlerde satışa sunulan 64 adet yoğurt numunesi steril numune kaplarına alınmış, laboratuvara soğuk zincir altında getirilen örnekler DNA izolasyon işlemine kadar -20°C'da saklanmıştır.

Metot

Standart bakteriyel kökenin plazmid oluşturulması için mikrobiyolojik olarak üretimi

Plazmid standart oluşturulmasında kullanılacak olan *L. paracasei* ATCC 25598 kökeninin üretimi

için selektif *Lactobacillus* Rogosa SL agar (pH 5,2; Difco, Detroit, USA) ve de Mann Rogosa Sharpe (MRS) agar (Difco, Detroit, USA) besiyerleri kullanıldı. Besiyerleri %10 CO₂ ortamda 37°C'da 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası Rogosa SL ve MRS besiyerlerindeki kolonilerin *Lactobacillus* spp. olduğunu konfirme etmek için Gram boyama, çomak morfolojisi ve katalaz reaksiyonu kontrol edildi. Bergey's Manual şeker fermantasyon şemalarına göre kontrolleri yapıldı [11].

DNA izolasyonu

Yoğurt numunelerinden direkt DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. 10 gr yoğurt numunesi 90 ml steril ¼ Ringer (Sigma, St. Louis, NO, USA) çözeltilisinde karıştırılır. Karışımın 200 µl'si DNA izolasyonu için kullanıldı [7]. DNA ekstraksiyonu DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak üretici direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi. Elde edilen DNA'ların konsantrasyonları, NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) spektrofotometri ile ölçüldü. qPCR işlemlerine kadar -20°C'da saklanmıştır.

Lactobacillus spp. primer dizaynı ve seçimi

Yoğurt örneklerinden elde edilen DNA'lardan *Lactobacillus* spp.'nin qPCR ile tespiti için; *Lactobacillus* spp. 16S-23S ribosomal RNA Intergenic Spacer Region (ISR) gen bölgesine spesifik Tablo 1'deki primer seti kullanıldı [16]. 16S-23S ribosomal RNA Intergenic Spacer Region (ISR) gen bölgesinin *Lactobacillus* spp. için spesifikliği NCBI primer blast tool ile (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) kontrol edildikten sonra, primerler, Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, USA) firmasından tedarik edildi. Real-time PCR çalışmalarında, primerlerin final konsantrasyonu 0,5 µM olacak şekilde dilüsyonları yapıldı.

Tablo 1. *Lactobacillus* spp. qPCR çalışmalarında kullanılan oligonukleotid primer dizileri

Primer	Oligonukleotid dizi	Bağlanma ısısı (°C)	Amplicon uzunluğu (bp)	Ref.
LactF	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	58	341	[16]
LactR	CACCGCTACACATGGAG			

Klonlama ve Plazmid standartlarının oluşturulması

Lactobacillus spp. spesifik primerinin çoğaltılması için, *L. paracasei* ATCC 25598'den elde edilen DNA fragmanları çoğaltıldı. DNA fragmanlarının çoğaltılabilmesi için PCR protokolü olarak her bir PCR tüpüne; 6.0 µl 25 mM MgCl₂, 10.0 µl 10× reaksiyon buffer'ı (MgCl₂ ihtiva etmeyen), 2.0 µl PCR dNTP miks (her birinden 10 mM), her bir primer'den 2.5 µl (LactF ve LactR, herbirinden 20 µM), 0.5 µl Taq DNA polimeraz (5 U/µl), 2.0 µl kalıp DNA ve 24.5 µl nukleaz içermeyen steril su ilave edildi. 50 µl'lik bu karışım Tablo 2'deki PCR aşamaları ile GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California) PCR sisteminde çoğaltıldı.

Tablo 2. Plazmid standartın oluşturulmasında kullanılan PCR protokolü

Aşama	Siklus Sayısı	Isı ve Süre
Denatürasyon	1	95°C - 120 sn
Amplifikasyon	40	95°C - 60 sn
		55°C - 90 sn
		58°C - 90 sn
Soğuma	1	4°C - sonsuz

PCR sonrasında, PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde standart metotlarla [17] görüntülenip, ayrıldıktan sonra Wizard SV Gel ve PCR Clean Up kit (Promega, Madison, WI, USA) kullanılarak saflaştırıldı. Aradığımız bölgeyi ihtiva eden bu saf PCR ürünleri, pGEM-T vektör sistemi (pGEM-T vector System II; Promega, Madison, WI) kullanılarak, üretici direktifleri doğrultusunda klonlandı. Plazmid DNA'ları, MaxiPrep Plazmid DNA izolasyon kiti (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak üretici direktifleri doğrultusunda saflaştırıldı. Saflaştırılan plazmidlerin dilüsyonları NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) spektrofotometri ile ölçüldü. Kantitatif analiz için miktarları ölçülmüş plazmid standartlardan 10 katlık seri dilüsyonlar yapıldı. 10² ile 10⁸ kopya arasında plazmid içeren standart seri elde edildi.

qPCR ile *Lactobacillus spp.* çoğaltılması ve kantitasyonu

qPCR işlemleri, LightCycler 480 II real-time PCR sisteminde, LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kullanılarak üretici direktifleri doğrultusunda yapıldı. Çalışmalarda PCR total hacmi 20 µl olarak gerçekleştirildi. Her bir reaksiyona 50 ng kalıp DNA'dan 2 µl, 10 µl Sybr green master miks ve 2 µl primerlerden (final konsantrasyonu 0.5 µM) ilave edildi. Tablo 3'deki real-time PCR protokolü ile çalışma gerçekleştirildi.

Tablo 3. *Lactobacillus spp.* için kullanılan qPCR protokolü

Aşama	Siklus sayısı	Isı, süre ve okuma
Denatürasyon	1	95°C-300s - yok
Amplifikasyon	40	95°C-10s - yok
		58°C-15s - yok
		72°C-20s-tekli okuma
Melting	1 siklus	95°C-5 s - yok
		65°C-60s - yok
		97°C- sürekli okuma
Soğuma	1 siklus	40°C-30s - yok

Bulgular

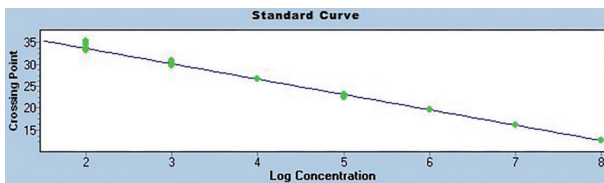
Çalışmamız sonucunda 64 yoğurt örneğinin tamamında *Lactobacillus spp.* qPCR ile tespit edilmiştir. Numunelerimizin ortalama log₁₀ CFU/gr konsantrasyonları ve standart sapmaları tablo 4 ve tablo 5'de görülmektedir. Şekil 1'de qPCR çalışmasında standartlarla oluşturulan eğrinin görüntüsü verilmiştir.

Tablo 4. qPCR ile yoğurt numunelerinde belirlenen *Lactobacillus spp.* ortalama miktarı (log₁₀CFU/gr)

<i>Lactobacillus spp.</i>	Ortalama	SD	Min.	Max.
log ₁₀ CFU/gr	6,38	0,44	5,68	7,10

Tablo 5. qPCR ile analiz edilen yoğurt numunelerinde belirlenen *Lactobacillus* spp. miktarı (CFU/gr ve log₁₀ CFU/gr)

Numune No	CFU/gr	Log ₁₀ CFU/gr	Numune No	CFU/gr	Log ₁₀ CFU/gr
1	8.016.400	6,90	33	494.000	5,69
2	12.450.000	7,10	34	503.000	5,70
3	1.320.000	6,12	35	718.000	5,86
4	4.038.900	6,61	36	623.000	5,79
5	1.018.000	6,01	37	499.000	5,70
6	7.800.000	6,89	38	696.000	5,84
7	9.960.000	7,00	39	1.201.000	6,08
8	9.420.000	6,97	40	582.000	5,76
9	5.370.000	6,73	41	8.016.400	6,90
10	7.280.000	6,86	42	12.450.000	7,10
11	2.300.000	6,36	43	1.320.000	6,12
12	3.620.000	6,56	44	4.038.900	6,61
13	7.170.000	6,86	45	1.018.000	6,01
14	3.200.000	6,51	46	7.800.000	6,89
15	5.120.000	6,71	47	9.960.000	7,00
16	1.150.000	6,06	48	9.420.000	6,97
17	2.460.000	6,39	49	5.370.000	6,73
18	490.000	5,69	50	7.280.000	6,86
19	484.000	5,68	51	2.300.000	6,36
20	2.490.000	6,40	52	3.620.000	6,56
21	7.450.000	6,87	53	7.170.000	6,86
22	1.820.000	6,26	54	3.200.000	6,51
23	1.540.000	6,19	55	5.120.000	6,71
24	2.480.000	6,39	56	1.150.000	6,06
25	990.000	6,00	57	2.460.000	6,39
26	985.000	5,99	58	490.000	5,69
27	3.200.000	6,51	59	484.000	5,68
28	984.000	5,99	60	2.490.000	6,40
29	982.000	5,99	61	7.450.000	6,87
30	10.590.000	7,02	62	1.820.000	6,26
31	1.074.000	6,03	63	1.540.000	6,19
32	961.000	5,98	64	2.480.000	6,39



Şekil 1. *Lactobacillus* spp. için plazmid standartlarla oluşturulan standart eğri

Tartışma ve Sonuç

Yoğurt; geleneksel süt fermentasyonunda büyük bir rol oynayan ve probiyotik etkinlikleri olan bakterileri içermesi nedeniyle hayatımıza sağlık katan en önemli besin maddelerinden biridir. Günümüzde oldukça fazla tüketilen probiyotiklerin; yoğurtlardaki miktarlarının artması veya azalması ve mikrobiyo-

lojik kalitelerinin tespiti halk sağlığı açısından zorunlu bir durum oluşturmuştur.

Yoğurdun hayatımıza kattığı sağlığın ve biyolojik etkilerin içerdiği geleneksel süt fermentasyonundan sorumlu canlı probiyotik etkinlikleri olan bakterilerden geldiği bilinmektedir. Bu yüzden, bu bakterilerin miktarlarının artması veya azalması insan sağlığı açısından çok önemlidir. Yoğurtların probiyotikler açısından mikrobiyolojik kalitesinin tespiti, özellikle probiyotiklerin tüketimlerinin ve insan sağlığı açısından öneminin gittikçe arttığı günümüzde halk sağlığı açısından irdelenmesi gerekmektedir.

Bu amaç doğrultusunda, ülkemizde yapılan çalışmalar incelendiğinde Keleş [12] yaptığı tez çalışmasında, Konya yöresinde ev yapımı yoğurtlarda LAB yükü ortalama $1,89 \times 10^8$ CFU/gr olarak tespit etmiştir. Demirkaya ve arkadaşları [2] yaptıkları çalışmada ise Bilecik ilinde tüketilen yoğurtlarda, LAB sayısını ortalama $5.08-7.98 \log_{10}$ CFU/gr olarak bildirmişlerdir. Sömer [19] yaptığı araştırmada, Afyon, Isparta, Aydın, Muğla ve Burdur illerinde satışa sunulan ev yapımı süzme yoğurtlarda LAB yükünün ortalama \pm standart hata (SH) değerini $7,11 (\log_{10}$ CFU/gr) minimum $5,25 (\log_{10}$ CFU/gr), maksimum $8,92 (\log_{10}$ CFU/gr) olarak belirlenmiştir. Ertaş ve ark.'nın [5] Kayseri ilinde satışa sunulan manda yoğurtları ile yaptıkları çalışmada *Lactobacillus spp.* (LAB) yükü ortalama \pm SH değerini $6,58 \pm 0,18 (\log_{10}$ CFU/gr) olarak bulmuşlardır. Minimum $4,30 (\log_{10}$ CFU/gr) maksimum $8,85 (\log_{10}$ CFU/gr)dir. Bu çalışmada Ertaş ve ark.'ı [5] LAB yükünün diğer çalışmalara göre daha düşük bulunmasını, ürünün satıştan önce uzun süre bekletildiği, taze olarak satışa sunulmadığı şeklinde yorumlamışlardır. Bizde çalışmamızda, LAB yükünü ortalama \pm SH değerini, $6,38 \pm 0,44 (\log_{10}$ CFU/gr), minimum $5,68 (\log_{10}$ CFU/gr), maksimum $7,10 (\log_{10}$ CFU/gr) olarak saptadık. Değerlerimiz, Ertaş ve ark [5] verilerine benzer görülürken, diğer çalışmalara göre verilerimizin daha düşük olduğu görülmektedir. Bunun nedenini, bölgemizde hazırlanan bu yoğurtların taze oluşu, bakteri yükü tam olgunlaşmadan ürünlerin çok hızlı tüketilme sunulması kaynaklı olabileceği, ayrıca yoğurt starter kültürlerinin hazırlanışı sırasında *Lactobacillus spp.* türleri yanında, *Streptococcus thermophilus* ağırlığının daha fazla olabileceğini ve geleneksel ev yapımı

yoğurt yapımında bu orana dikkat edilmiyor olabileceğini bize düşündürmüştür.

Uluslararası çalışmalar incelendiğinde, Furet ve ark. [6] real-time PCR ile yaptıkları kantitatif analizlerde ticari olarak fermente edilmiş süt ürünlerinde LAB yükünün ml'de 10^3 hücre olarak tespit etmişlerdir. Garcia ve ark [8] DGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis) ile ticari yoğurtlarda yaptıkları çalışmada LAB bakterilerini yüksek bir yoğunlukta tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada bu yoğurtlardaki mikrobiyota yoğunlukları incelendiğinde taze yoğurtlarda, ısıl işlem görmüş yoğurtlara göre LAB'lerin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Kwao ve ark. [13] probiyotik ürünlerde yaptıkları çalışmada real-time PCR ile daha hızlı ve basit şekilde *Lactobacillus spp.*'nin tespit edilebileceğini göstermişlerdir. Udo ve ark [18] yaptıkları çalışmada LAB, hem kantitatif real-time PCR, hem de FLOW-FISH metodunu kullanmışlar ve iki metodunda hassasiyet yönünden benzer olduğunu, kantitatif real-time PCR'ın bakteri kolonilerinin değişikliklerini iki katı yüksek çözünürlükte belirleyebildiğini tespit etmişlerdir. Bunun yanında aynı çalışmacılar %100, %50, %29,4, %19,6, %15,1, ve %13,7 seri DNA dilüsyon miktarlarında, 18 ile 30 arasında Ct değeri saptadıkları çoğalma eğrileri elde etmişlerdir. Bizde çalışmamızda kantitatif analiz için kantitatif analiz için miktarları belli, plazmid standartı kullandık. Hazırladığımız plasmid standartın, 10 katlık seri dilüsyonları yapılarak, 10^2 ile 10^8 CFU/g arasında değerleri olan standartlar ile eğri elde ettik. Bu kantitasyon standartlarımızdan 14 ile 32 aralığında Ct saptandı ve real-time PCR analizlerinde kantitasyon için elde edilen bu standart eğri kullanıldı. Bu sayede alt limit olarak 10^2 CFU/g gibi hassas bir alt limit belirlemeyi başardık. Real-time PCR ile yapılan optimizasyon çalışmalarında, bu yöntem ile bakterileri sırasıyla saf kültürde 10 CFU/ml, yapay olarak kontamine yoğurtlarda 10^3 CFU/ml ve pastörize meyve türevi ürünlerde ise 10^2 CFU/ml hassasiyette tespit edebildiklerini bildirilmiştir. Ayrıca bu metodun özgüllük ve hızının, güvenilirlik ve tekniğin duyarlılığının, gıda bakteri, mantar ve küf canlılığını değerlendirmekte rutin analiz olarak kullanılabileceğini vurgulamışlardır [9]. Herbel ve ark. [10] *Lactobacillus spp.*'lerin günlük kullanılan yoğurtlarda ki probiyotik etkilerini real-time PCR ile incelemişler ve heat shock protein 60 geni (hsp60)

ile sadece 5 *Lactobacillus* türünü tespit edebilecek bir dizayn yapmışlardır (*L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. reuteri*). Bu çalışmada direkt yoğurtlardan yaptıkları izolasyonla 10^5 CFU/ml'nin altında *Lactobacillus* spp.'leri tespit edilemeyi başarmışlardır. Bu çalışmalar bu yüzden bizim çalışmamız ile aslında benzerlik göstermektedir. Bu bakterilerin tespitinde real-time PCR yöntemi, hızlı, çok daha hassas ve güvenilir olması yanında, kültüre edilebilen *Lactobacillus* spp.'ler yanında, kültüre edilemeyen ve saptanamayan *Lactobacillus* spp.'lerinde saptanabilmesine imkan sağlaması nedeniyle önemli olduğu konusunda diğer çalışmalarını destekler bir tecrübe sağlanmıştı.

Sonuç olarak çalışmamızda elde ettiğimiz veriler; *Lactobacillus* spp. gibi insan sağlığı açısından değerli, probiyotik etkinlikleri bilinen bakterilerin, bölgemizde satışa sunulan ev yapımı yoğurtlarda daha düşük düzeyde olduğunu, bölgemizdeki bu yoğurtların, tüketime olgunlaşma süreci tamamlanmadan sunuluyor olabileceğini, veya üretim sürecinde dikkat edilmesi gereken hususların olabileceğini ve bunlara özen gösterilmesi gerektiğini bize düşündürmüştür. Ayrıca ülkemizde ilk kez klasik mikrobiyolojik yöntemler yerine, real-time PCR ile insan sağlığı açısından probiyotik önemleri olan *Lactobacillus* spp.'lerin miktar analizleri yapılarak, hızlı, hassas ve güvenilir olan bu yöntemin, tespit için kullanılabileceğini bize göstermiştir.

Kaynaklar

- Coeuret V, Dubernet S, Bernardeau, M, Gueguen M, Vernoux J.P, (2003). Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. Le Lait, INRA Editions. 83, 269-306.
- Demirkaya AK, Gökalp Z (2013). Bilecik'te Tüketime Sunulan Yoğurtların Kimyasal ve Mikrobiyolojik Kalitesinin Araştırılması. Atatürk Üniv Vet. Bil. Derg. 8(3), 202-209.
- EC (2007) Corrigendum to Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods (Official Journal of the European Union L 404 of 30 December 2006). Off J Eur Union L12, 3-18.
- Erdoğan Ö, Erbilir F, (2006). Isolation and Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from Various Foods. Turk J Biol. 30, 39-44.
- Ertas N, Serhat A, Karadal F, Gönülalan Z, (2014). Kayseri İlinde Satışa Sunulan Manda Yoğurtlarının Mikrobiyolojik Kalitesi. İstanbul Üniv Vet Fak Derg. 40 (1), 83-89.
- Furet JP, Quennee P, Tailliez PP, (2004). Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. Int J Food Microbiol. 97, 197-207.
- Galanis A, Kourkoutas Y, Tassou CC, Chorianopoulos N, (2015). Detection and Identification of Probiotic *Lactobacillus plantarum* Strains by Multiplex PCR Using RAPD-Derived Primers. Int J Mol Sci. 16(10), 25141-53.
- García-Albiach R, María J, Pozuelo D, Santiago A, María-Isabel M, Daniel B, Fernando B, Rosa C, (2008). Molecular analysis of yogurt containing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in human intestinal microbiota. Am J Clin Nutr 87-91-6.
- Gianluca B, Lucia R, Franco D, Sandra T, (2003). Development of Reverse Transcription (RT)-PCR and Real-Time RT-PCR Assays for Rapid Detection and Quantification of Viable Yeasts and Molds Contaminating Yogurts and Pasteurized Food Products. Appl Environ Microbiol. Jul;69(7):4116-22.
- Herbel SR, Lauzat B, Von Nickisch-Roseneck M, Kuhn M, Murugaiyan J, Wieler LH, Guenther S, (2013). Species-specific quantification of probiotic lactobacilli in yogurt by quantitative real-time PCR. J Appl Microbiol. 115, (6) 1402-1410.
- Kandler O, Weiss N, (1984). Genus *Lactobacillus*, in: Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt JG, (Eds.), Bergey's Manual of Systematics Bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore M.D., USA, pp. 1209-1234.
- Keleş F, (2003). Konya yöresi taze ev yapımı yoğurtların mikrobiyolojik özelliklerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, SÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Kwon HS, Yang EH, Yeon SW, Kang BH, Kim TY, (2004). Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. FEMS Microbiol Lett, 239, 267-275.
- Maier S, Olek A, (2002). Diabetes: a candidate disease for efficient DNA methylation profiling. J Nutr 132, 2440-2443.
- Margolles A, Mayo B, Ruas-Madiedo P, (2009). Screening, identification, and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. In Handbook of probiotics and prebiotics ed. Nomoto, K., Salminen, S. and Lee, Y.K. p. 15. Hoboken, NJ: John, Wiley & Sons, Inc.
- Rintilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, Palva A, (2004). Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. J Appl Microbiol. 97(6), 1166-77.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Udo F, Jan L, (2006). Improved Enumeration of Lactic Acid Bacteria in Mesophilic Dairy Starter Cultures by Using Multiplex Quantitative Real-Time PCR and Flow Cytometry-Fluorescence In Situ Hybridization. Appl Environ Microbiol., 72(6), 4163-4171
- Sömer VS, (2010). Dayanıklı Yoğurtların Mikrobiyolojik Fizikokimyasal Özelliklerinin ve Biyojen amin içeriklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, MAE Üniv. Fen bilimleri Enstitüsü, Burdur.
- Zamfir M, Vancanneyt M, Makras L, Vaningelgem F, Lefebvre K, Pot B, Swings J, De Vuyst L, (2006). Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. Syst Appl Microbiol, 29(6):487-95.
- Zhang ZG, Ye ZQ, Yu L, Shi P, (2011). Phylogenomic reconstruction of lactic acid bacteria: an update. BMC Evol B

Burdur Halk Pazarlarından Toplanan Beyaz Peynirlerde Patojen *Candida* spp. Varlığının Belirlenmesi

Özen Yurdakul¹, Erhan Keyvan¹, Tuğba Ersoy²

¹ Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Burdur

² Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Burdur

Geliş Tarihi / Received: 01.06.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 21.09.2016

Özet: Mayalar, gıdaların kalite ve güvenliğini etkileyen gıda endüstrisi için oldukça önemli mikroorganizmalar olup gıdalarda bozulmalara yol açabilirler. *Candida* türleri hastane enfeksiyonlarında önemli bir yere sahip iken son yıllarda gıdalar vasıtasıyla da insanlara bulaşabilmektedir. Bu çalışma ile halk pazarlarından toplanan peynirlerde patojen *Candida* türlerinin varlığının araştırılması amaçlandı. Analiz edilen 100 adet peynir örneğinin 84 (%84)'ünde patojen *Candida* spp. pozitif olarak bulundu ancak hiçbirinde *C. albicans* saptanamadı. Bu çalışmada API 20 C AUX Test Kit'i ile 103 adet izolatın tür ayrımı yapıldı. Elde edilen test kit sonuçlarına göre izolatların %14'ü *C. krusei*, %5'i *C. tropicalis* olarak tanımlandı. Gıda örneklerinin mikrobiyolojik incelemesinde toplam maya ve küf sayısı ile birlikte patojen mayaların varlığına yönelik analizlerin de yapılması toplum sağlığı açısından yararlı olacağı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Beyaz peynir, patojen *Candida* spp., mantar, maya.

Determination of Pathogen *Candida* spp. in White Cheese Collected from Burdur's Public Bazaars

Abstract: Yeasts are very important microorganisms for the food industry that affects food quality and safety and yeasts may lead to spoil of the foods. The goal of this study was to evaluate the incidence of pathogen *Candida* spp. collected from cheese samples in public bazaar. *Candida* species are important for hospital infections which have been able to infect humans by food in recent years. *Candida* spp. were positive 84% of 100 cheese samples. In this study we were isolated 103 isolate which were identified with API 20 C AUX Test Kit. According to test kit results, *C. albicans* wasn't isolated any cheese samples and 14% were identified as *C. krusei*, 5% were identified as *C. tropicalis* from *Candida* spp. positive cheese samples. As a result, microbiological analysis of food samples should be made not just for the total number of mold, the samples should also be tested for the presence of pathogenic yeast it would be beneficial for public health.

Keywords: Fungi, pathogen *Candida* spp., white cheese, yeast.

Giriş

Mayalar, gıdaların kalite ve güvenliğini çeşitli şekillerde etkileyen gıda endüstrisi için oldukça önemli mikroorganizmalardır. Geleneksel olarak ekmek, bira ve şarap üretiminde kullanılırlar. Ayrıca bazı mayalar peynirlerin olgunlaştırılması ve ürünlere özgü karakterler kazandırılması amacıyla starter kültür olarak da kullanılmaktadır [11,18].

Candida spp.'ler *Ascomycetes* grubuna ait kommensal ökaryotik maya türleridir. Mayalar çevre, insan ve diğer memelilerde bulunabilirler [20]. Özellikle memelilerde gastrointestinal ve genitoüriner sistem mukoza florasında bulunurlar [14]. Bazı maya türleri gıda güvenliğini olumsuz yönde etkileyerek fırsatçı patojen olarak enfeksiyonlara neden

olabilirler [1,9]. Patojen *Candida* türleri *C. albicans* ve *Candida non-albicans* türleri olarak da sınıflandırılmaktadır. Patojen *Candida* türleri içinde yer alan *C. albicans* insanlarda oral ve sistemik kandidiyasise neden olan en yaygın ve en patojen türdür [8,33,38]. *Candida non-albicans* türleri arasında *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondi*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis* ve *C. dubliniensis* yer almaktadır. Süt sektörü açısından yüksek prevalans ve patojeniteye sahip patojen *Candida* türleri arasında klinik öneme sahip olan türler *C. albicans*, *C. krusei* ve *C. tropicalis*'tir [22].

Peynir mikroflorası peynirin tat, lezzet, aroma ve tekstür gibi yapılarını etkileyen en önemli bileşenlerindedir [2]. Bu kompleks mikroflorida

bakteri, maya, küf gibi mikroorganizmalar bulunabilmektedir [5,32]. Peynirde bulunan mikroorganizmaların çeşitliliği ve sayısı; sütün mikrobiyal kalitesine, süte uygulanan işlemlere, peynirin olgunlaştırılması sırasındaki nem ve sıcaklığa bağlı olarak değişiklik gösterebilir [34].

Bazı *Candida* türleri gıdaların üretim sürecinde kullanılırken bazıları ise gıdanın bozulmasında etkili olmaktadır. Bunun yanında *Candida* türleri et ve süt ürünlerinde starter kültür olarak da kullanılabilir. Proteolitik, glikosidaz ve pektinolitik aktivite sonucu üretilen sekonder metabolitler ile lipolitik aktivite, üreaz aktivitesi, ozmotolerans, geniş üreme aralığı, etanole tolerans ve düşük su aktivitesi gibi özelliklerinden gıda işlemlerinde yararlanılmaktadır [12,29].

Patojen *Candida* spp. beşeri hekimlikte sorun yaratmakta ve *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*'ye bağlı enfeksiyonlarda bir artış gözlenmektedir. Veteriner hekimlikte de *Candida* spp. özellikle son yıllarda mastitis etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır [4]. Kontamine sütlerin ısı işlem uygulanmadan kullanılması ya da ürün haline getirilmesi, kötü koşullarda üretim, paketlenme ve satışa bağlı olarak insanlar gıdalar ile enfeksiyona yakalanmaktadır [20,21].

Patojen *Candida* türlerinin gıdalarda varlığı durumunda hastalık oluşturabileceği çoğu araştırmacı tarafından göz ardı edilen bir konudur. Bu çalışma ile pazarlardan toplanan beyaz peynirlerde patojen *Candida* türlerinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Burdur ili semt pazarlarından Ocak 2014-Aralık 2014 tarihleri arasında toplanan 100 adet beyaz peynir örneği soğuk zincir altında laboratuvara getirildi. Her bir gıda örneği aseptik koşullar altında steril plastik torbalara 10'ar g olacak şekilde tartıldı. Üzerine 90 ml steril peptonlu su (%0.1) ilave edildikten sonra 1-2 dakika süre ile homojenizatörde (iul, Spain) homojenize edildi. Homojenat 10⁻⁸ desimal sulandırmaya kadar hazırlanarak CHROMagar *Candida* (CHROMagar *Candida*, USA) besiyerine ekim yapıldı. Petriler 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda yeşil koloniler *Can-*

didia albicans, pembe zon ile çevrili mavi koloniler *Candida tropicalis*, pembe koloniler *Candida krusei*, beyazdan leylak rengine doğru değişen koloniler diğer türler olarak değerlendirildi [19].

Peynirlerde toplam aerob bakteri yükünü tespit etmek amacıyla Plate Counte Agar'a (PCA) (Merck, 1.05463) 30°C'de 22-24 saat, genel maya-küf sayılarının tespiti amacıyla Patato Dextrose Agar'a (PDA) (Merck 1.10130) 24°C'de 4-5 gün inkübasyona bırakıldı [13].

API testi ile doğrulama

Elde edilen *Candida* spp. şüpheli izolatlar API 20 C AUX Test Kit (bioMérieux, France) ile üretici direktiflerine göre doğrulandı [28].

Bulgular

Bu çalışmada, 100 adet beyaz peynir örneğinin 84 (%84)'ünde *Candida* spp. pozitif olarak bulundu. Peynir örneklerinin hiçbirinde *C. albicans* saptanamadı. Beyaz peynir örneklerinden elde edilen 103 adet şüpheli izolata tür ayrımı amacıyla API 20 C AUX Test Kit'i uygulandı. API 20 C AUX Test Kit'i sonuçlarına göre izolatların %14'ü *C. krusei*, %5'i *C. tropicalis* olarak doğrulandı. Analizlere ait mikrobiyolojik veriler incelendiğinde; PCA'da üreyen toplam aerob mezofil bakteri sayısının ortalama 8,42±0,13 log kob/g, PDA'da üreyen maya küf sayısının ortalama 7,56±0,14 log kob/g, CHROMagar *Candida*'da üreyen *Candida* spp. sayısının ise ortalama 4,60±0,25 log kob/g olduğu tespit edildi (Tablo 1).

Tablo 1. Peynir örneklerinde maya-küf, aerob mezofil genel canlı sayısı ve *Candida* spp. sayıları (log cfu g-1).

	Maya küf sayısı	<i>Candida</i> spp sayısı	Aerob mezofil genel canlı sayısı
	PDA	CHROMagar <i>Candida</i>	PCA
n	100	100	100
Min	2,20	0,00	3,20
Max	10,18	7,63	11,00
x±Sx	7,56±0,14	4,60±0,25	8,42±0,13

x: Ortalama, Sx: Standart hata, n: pozitif numune sayısı
PDA: Patato Dextrose Agar
PCA: Plate Count Agar

Tartışma ve Sonuç

Beyaz peynirde toplam aerob mezofil canlı bakteri sayısını etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır. Beyaz peynir yapımında kullanılan sütün pastörize edilmemesi, hijyenik kurallara uyulmaması ve peynirin olgunlaştırılmadan taze olarak tüketime sunulması gibi sebepler peynirin mikrobiyolojik kalitesini etkilemektedir. Yaptığımız çalışma sonuçlarına göre; toplam aerob mezofil bakteri sayısının ortalama $8,42 \pm 0,13$ log kob/g olarak saptanmıştır. Sert ve Kıvanç [30] Erzurum yöresinde yapılan bir çalışmada taze peynir örneklerindeki toplam aerob mezofil bakteri sayısının $9,3 \times 10^7$ - $9,5 \times 10^9$ kob/g olduğu belirtilmiştir. Kurşun ve ark. [15] Burdur İli'nde küçük ölçekli süt mandıralarından topladıkları 100 adet beyaz peynir örneğinde toplam aerob mezofil bakteri sayısını $4,6 \times 10^6$ ile $1,0 \times 10^9$ kob/g değerleri arasında olduğunu saptamıştır. Yalçın [37] tüketime sunulan 50 adet salamura beyaz peynirde ortalama $2,7 \times 10^8$ kob/g toplam aerob mezofil bakteri saptamıştır. Çelik ve ark.[6] salamura beyaz peynir örneklerinde ortalama toplam aerobik mezofilik bakteri sayısını $8,9 \times 10^7$ kob/g olarak bildirmiştir. Uğur [35] Muğla'da yaptığı çalışmada beyaz peynirlerdeki toplam aerob mezofil bakteri sayısını $1,8 \times 10^6$ - $6,0 \times 10^8$ kob/g değerleri arasında olduğunu saptamıştır. Çalışma sonuçları bulduğumuz sonuçlara benzerlik göstermektedir.

Beyaz peynirlerde toplam maya-küf sayısına bakıldığında yaptığımız çalışmada maya küf sayısının ortalama $7,56 \pm 0,14$ log kob/g olarak bulundu. Kurşun ve ark. [16] yaptıkları bir çalışmada küçük ölçekli süt mandıralarından temin ettikleri beyaz peynir örneklerinin % 20'sinde toplam maya-küf sayısını 10^4 - 10^5 kob/g düzeyinde olduğunu belirtmişlerdir. Uğur [35] incelediği peynir örneklerinde maya ve küf sayısı $3,7 \times 10^3$ - $3,9 \times 10^6$ kob/g arasında, ortalama $1,0 \times 10^6$ kob/g olarak tespit etmiştir. Dığrak ve ark. [7] peynir örneklerindeki maya ve küf sayısının $2,2 \times 10^2$ - $8,3 \times 10^6$ kob/g değerleri arasında değiştiği, ortalama sayının $1,0 \times 10^6$ kob/g olduğu belirtilmiştir. Sert ve Kıvanç [30] Erzurum'da satışa sunulan beyaz peynirlerdeki toplam maya ve küf sayısının ortalama olarak $2,6 \times 10^6$ kob/g olduğu belirtilmiştir. Çalışma sonuçlarımızın diğer sonuçlardan daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Çiğ süttten üretilen süt ürünleri, mayaları da içeren birçok patojen mikroorganizmanın taşınmasında ve potansiyel sağlık riski oluşturması bakımından gıda güvenliğini olumsuz etkilemektedir [17, 21, 25]. Hayvanlarda meme enfeksiyonlarındaki patojen *Candida* türlerinin varlığının artması süt ürünlerini de bu patojen bakımından riskli hale getirmektedir [4,26].

Bu çalışmada toplanan 100 adet peynir örneğinin 84 (%84)'ünde *Candida* spp. pozitif olarak tespit edilmiştir. Yapılan ekim sonuçları incelendiğinde ise toplanan örneklerin önemli bir kısmında maya ve küf varlığına rastlanmıştır (Tablo 1). Wanderley ve ark. [36] geleneksel olarak üretilen 45 artisanal peynirinin %2.4'ünde *C. albicans*, % 79.3'ünde *C. krusei* ve % 6.0'sında *C. tropicalis* olduğunu bildirmiştir. *Candida parapsilosis* bazı peynirlerden (İsveç tipi peynir, mavi peynir ve çedar peyniri) izole edilen ve invaziv kandidiyazis oluşturan önemli bir *Candida* türü olarak tespit edilmiştir. Ancak gıda kaynaklı bir risk belirtilmemiştir [23]. *C. parapsilosis* bitki, toprak, su gibi çevresel kaynaklardan da izole edilmiştir [24] "Manteca" adı verilen İtalyan tipi bir peynirin dominant florasında bulunmuştur [31]. Türkiye'de yapılan bir çalışmada; toplanan 100 adet peynir örneğinin %7.0'sinde *C. albicans*, %12'sinde *C. krusei* ve % 3.0'ünde *C. tropicalis* olduğu saptanmıştır [16].

Peynirlerde maya ve küfler ile kontaminasyon starter kültür, hava, ekipman, salamura suyu, personel gibi çeşitli yollar ile olabilir [3,25,27]. Bazı mayalar tat, lezzet ve görünüm gibi yararlı özellikleri ile etkili olurken bazıları da peynirlerde bozukluklar meydana getirebilir. Gıda kaynaklı enfeksiyonlara sebep olabilir. Medikal önemi olan ve peynirlerden izole edilen *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *C. krusei* ve *C. glabrata* gibi *Candida* türleri de bulunmaktadır [8,10,36].

Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan besiyerleri toplam maya ve küf sonucuna yönelik olup patojen maya ve küfleri ayırt edememektedir. Gıda örneklerinin mikrobiyolojik incelemesinde; toplam maya ve küf sayısı ile birlikte patojen mayaların varlığına yönelik incelemeler de toplum sağlığı açısından önemlidir. Bu verilere göre pazarlarda satılan peynirlerin *Candida* spp. yönünden büyük bir risk oluşturduğu ve toplumun bu risk bakımından

bilgilendirilmesi ve bu alana yönelik kapsamlı çalışmalar yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

- Banjara N, Suhr, MJ, Hallen Adams HE, (2014). Diversity of Yeast and Mold Species from a Variety of Cheese Types. *Curr Microbiol*, 70, 792-800.
- Beresford TP, Fitzsimons N, Brennan NL, Cogan TM, (2001). Recent advances in cheese microbiology. *Int Dairy J*, 11, 259-274.
- Borelli BM, Ferreira EG, Lacerda ICA, Franco GR, Rosa CA, (2006). Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. *World J Microbiol Biotechnol*, 22, 1115-1119.
- Crawshaw WM, Macdonald NR, Duncan G, (2005). Outbreak of *Candida rugosa* mastitis in a dairy herd after intramammary antibiotic treatment. *Vet Res*, 156, 812-813
- Creppy EE, (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett*, 127, 19-28.
- Çelik S, Özdemir C, Özdemir S, Sert S, (1998). Diyarbakır yöresinde tüketime sunulan salamura beyaz peynir örneklerinin mikrobiyolojik, fiziksel ve kimyasal özellikleri. V. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, Geleneksel Süt Ürünleri. Ankara: Milli Produktivite Yayınları, 621, 351-360.
- Diğrak M, Yılmaz Ö, Çelik S, Özçelik S, (1996). Elazığ'da satışa sunulan taze beyaz peynirlerin mikrobiyolojik kalitesi ve yağ asitleri analizi. *Turk J Biology*, 20, 221-230.
- El-Sharoud WM, Belloch C, Peris D, Querol A, (2009). Molecular identification of yeasts associated with traditional Egyptian dairy products. *J Food Sci*, 74, M1-M6.
- Fleet GH, (2007). Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Curr Opin Biotechnol*, 18, 170-5.
- Gadaga TH, Mutukumira AN, Narvhus JA, (2000). Enumeration and identification of yeasts isolated from Zimbabwean traditional fermented milk. *Int Dairy J*, 10, 459-466.
- Haasum I, Nielsen PV, (1998). Physiological characterization of common fungi associated with cheese. *J Food Sci*, 63, 157-161.
- Hommel RK, (2014). *Candida*. Batt CA, Tortorollo ML. eds. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press Inc, San Diego. p.367-374.
- Koburger JA, Marth EH, (1984). Yeasts and Moulds. Speck ML. eds. *Compendium of Methods for the Examination of Foods A.P.H.A.* Washington D.C. p.197-202
- Kumamoto CA, (2011). Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization. *Curr Opin Microbiol*, 14, 386-391.
- Kursun O, Kırdar SS, Keyvan E, Guner A, (2011). Microbiological quality of white pickled cheese produced in small plants in Burdur, Turkey. *J Food Agric and Environ*, 9(2), 110-112.
- Kurşun Ö, Kale SA, Kırdar SS, (2008). Türkiye'deki Peynirlerde *Candida albicans* Varlığı. VIII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). 07-09 Ekim, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van.
- Lavoie K, Touchette M, St-Gelais D, Labrie S, (2012). Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Sci Technol*, 92, 455-468.
- Loretan T, Viljoen BC, Mostert JF, Vogel AM, Jordaan HF, (1998). A preliminary study of the diversity and technological properties of indigenous traditional South African fermented milk. Jakobsen M, Narvhus J and Viljoen BC. eds. *Yeasts in the dairy industry: positive and negative aspects. Proceedings of the symposium organized by Group F47; 1996 Sept 2-3; Brussels, Belgium.* p.178-82.
- Mathavi S, Sasikala G, Kavitha A, Indra PR, (2016). CHROMagar as a primary isolation medium for rapid identification of *Candida* and its role in mixed *Candida* infection in sputum samples Indra Priyadarsini. *Indian J Microbiol Res*, 3(2), 141-144.
- McManus BA, Coleman DA, (2014). Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. *Infect Genet Evol*, 21, 166-168.
- Melville PA, Benites NR, Ruz-Peres M, Yokoya E, (2011). Proteinase and phospholipase activities and development at different temperatures of yeasts isolated from bovine milk. *J Dairy Res*, 78, 385-390.
- Miceli MH, Díaz JA, Lee SA, (2011). Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis*, 11, 142-151.
- Moran G, Coleman D, Sullivan D (2012). An introduction to the medically important *Candida* species. Calderone RA, Clancy CJ. eds. *Candida and candidiasis*, 2nd edn. ASM Press, New York, p.11-25.
- Moran G, Stokes C, Thewes S, Hube B, Coleman DC, Sullivan D, (2004). Comparative genomics using *Candida albicans* DNA microarrays reveals absence and divergence of virulence-associated genes in *Candida dubliniensis*. *Microbiol*, 150, 3363-3382.
- Mounier J, Goerges S, Gelsomino R, Vancanneyt M, Vandemeulebroecke K, Hoste B, et al, (2006). Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese. *J Appl Microbiol*, 101, 668-681.
- O'Brien NM, O'Connor TP, O'Callaghan JO, Dobson ADW, (2004). Toxins in cheese. Fox PE, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP. eds. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol 1, 3rd edn. Elsevier Academic Press, Amsterdam, p.562-571.
- Pereira-Dias S, Potes ME, Marinho A, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V, (2000). Characterisation of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese. *Int J Food Microbiol*, 60, 55-63.
- Pincus DH, Coleman DC, Pruitt WR, Padhye AA, Salkin IF, Geimer M, Bassel A, Sullivan DJ, Clarke M, Hearn V, (1999). Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. *J Clin Microbiol*, 37, 3533-3539.
- Sengun IY, Yaman DB, Gonul SA, (2008). Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. *World Mycotoxin J*, 1, 291-298.

30. Sert S, Kıvanç M, (1984). Erzurum piyasasında taze olarak tüketime sunulan beyaz peynirlerin kaliteleri üzerinde bir araştırma, Ankara Üniversitesi Ziraat Dergisi, 15, 79-89.
31. Suzzi G, Schirone M, Martuscelli M, Gatti M, Fornasari ME, Neviana E, (2003). Yeasts associated with Manteca. FEMS Yeast Res, 3, 159-166.
32. Swearingen PA, O'Sullivan DJ, Warthesen JJ, (2001). Isolation, characterization, and influence of native, non-starter lactic acid bacteria on cheddar cheese quality. J Dairy Sci, 84, 50-59.
33. Thompson GR, Patel PK, Kirkpatrick WR, Westbrook SD, Berg D, Erlandsen J, Redding SW, Patterson TF, (2010). Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 109, 488-495.
34. Torkar KG, Teger SG, (2006). The presence of some pathogen micro organisms, yeasts and moulds in cheese samples produced at small dairy-processing plants. Acta Agric Slov, 88, 37-51.
35. Uğur A, (2001). Muğla halk pazarında satışa sunulan ev yapımı peynirlerin mikrobiyolojik özellikleri. Çevre Koruma Dergisi, 40, 3-8.
36. Wanderley L, Bianchin A, Arruda Teo CRP, Meneghello Fuentefria A, (2013). Occurrence and pathogenicity of *Candida* spp. in unpasteurized cheese. Braz J Biosci, 11, 145-148.
37. Yalçın S, (1987). Ankara ve yöresinde tüketime sunulan salamura beyaz peynirlerinin mikrobiyal ve kimyasal içerikleri ile duyuşsal nitelikleri arasındaki ilişki. Doğa TU Vet Hay Dergisi, 2, 189-198.
38. Zomorodian K, Haghighi NN, Rajaei N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani M, Sedaghat F, Vosoghi M, (2011). Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. Med Mycol, 49, 208- 211.

Piliç Boyun Derilerinden İzole Edilen *C. perfringens*'lerin Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi

Güzin İplikçioğlu Çil¹, F. Seda Bilir Ormancı¹

¹ Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 23.06.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 12.07.2016

Özet: Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı geliştirdikleri direnç, halen tüm dünyada önemini koruyan bir halk sağlığı sorunudur. Antibiyotik direnç ile mücadelede patojen mikroorganizmaların, gıdalarda güvenilir metotlarla tespiti, identifikasyonu ve antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmanın amacı, üç farklı kanatlı kesimhanesinden alınan 180 piliç boyun derisi örneğinden izole edilen 35 *Clostridium perfringens* suşunun antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesidir. İzolatların antibiyotik direnç profillerinin tespitinde CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından bildirilen disk difüzyon metodu kullanılmıştır. İzolatların 35'inin de (%100) en az bir antibiyotiğe dirençli olduğu, ayrıca 31 (% 88,5) *C. perfringens* izolatının 1'den fazla antibiyotiğe direnç gösterdiği tespit edilmiştir. İzolatların tamamının (% 100) dirençli olduğu antibiyotik trimetoprim olarak belirlenmiş, bu antibiyotik yanında, % 65,7 ile tetrasiklin, % 62,8 oranında gentamisin direncin yüksek oranda tespit edildiği diğer antibiyotikler olmuştur. Elde edilen veriler izolatların hepsinin vankomisine duyarlı olduğunu da ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik direnç, *C. perfringens*, disk difüzyon, piliç eti.

Antibacterial Resistance of *C. perfringens* Isolated From Chicken Neck Samples

Abstract: Antibacterial resistance is still an important public health problem, worldwide. Identification and detection of antibacterial resistance of pathogen microorganisms from foods are essential for prevention. The aim of this study was to detect the antibiotic resistance of 35 *Clostridium perfringens*, which are isolated from 180 chicken neck samples obtained from three slaughterhouses. For this purpose disc diffusion method was used according to the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). As a result, all (100 %) of the isolates were found to be resistant to at least one of the 9 antibiotics also, 31 (88,5 %) of them were showed resistance to more than one antibiotic. 35 isolates was resistant to trimetoprim (100 %). In addition, high level of resistance was also determined against tetracycline (65,7 %) and gentamycin (62,8 %). All the isolates were found to be susceptible to vancomycin (100 %).

Keywords: Antibiotic resistance, chicken meat, *C. perfringens*, disc diffusion.

Giriş

Antibiyotikler; hayvan yetiştiriciliğinde, bakteriyel infeksiyonların tedavisinde, hastalıklar yönünden risk taşıyan hayvanlarda koruyucu olarak veya gelişimi ve verimi arttırmak amacıyla yem katkısı şeklinde kullanılmaktadır. Bu olumlu etkileri yanında antibiyotik kullanımının neden olduğu en büyük problem de mikroorganizmalarda şekillenen direnç gelişimidir [3]. Mikroorganizmalarda gelişen direnç nedeniyle bazı hastalıkların tedavisi zorlaşmakta, kullanılan antibiyotikler etkisiz kalmaktadır. Ayrıca dirençli türlerin oluşması ile yeni hastane infeksiyonları ortaya çıkmaktadır. Her yıl Avrupa'da yaklaşık 25 000 insanın antibiyotik dirençli bakteriyel infeksiyonlar yüzünden hayatını kaybettiği bildirilmektedir. Benzer şekilde Amerika'da yılda 2 milyon kişinin bu etkenler nedeniyle hastalandığı ve 23

000 kişinin de hayatını kaybettiği rapor edilmektedir. Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç gelişimi temelde iki şekilde olmaktadır, direnci oluşturan genlerin spontan ya da indüklenen mutasyonları veya direnç genlerinin başka bakterilerden transfer edilmesi. Özellikle genetik aktarım yolu, kazanılan direncin ileride farklı bakterilere geçmesi açısından önemlidir. Gelecekte korkulan bir diğer tabloda kullanılan antibiyotiklerin yararlı mikroorganizmalardaki etkilerinin tam olarak bilinmemesi, bunlarda şekillenmesi muhtemel bir direnç gelişiminin patojenlere aktarılmasıdır [4,12].

Bu olumsuz etkileri göz önüne alınarak Avrupa Birliği ilk olarak 1997'de avoparsinin gelişmeyi artırıcı amaçla kullanımını yasaklamıştır. 1999'da da insanlarda kullanılan antibiyotiklerle gösterdiği benzerlik nedeniyle basitrasın, spiramisin, tiylosin

ve virginiamisininin hayvanlarda tedavi dışında kullanımını yasaklanmıştır. Avrupa Birliği ile uyum sürecinde olan Türkiye'de de aynı politika izlenmektedir [5].

Gıda kaynaklı hastalıklara neden olan bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirdiği direnç önemli bir halk sağlığı sorunudur. Özellikle kanatlı yetiştiriciliğinde su ve yeme katılarak, hastalıktan korunmak ve gelişmeyi arttırmak amacıyla kullanılan antibiyotikler, birçok gıda patojeninde direnç gelişimine neden olmaktadır [8,14].

Clostridium perfringens, doğada, hayvanların ve insanların bağırsaklarında yaygın olarak bulunan bir bakteridir. Her yerde bulunabilme özelliği, sporlu olması ve çevresel şartlara direnç göstermesi, gıdaların etkenle kontaminasyon riskini arttırırken, korunma ve kontrolünü zorlaştırmaktadır [2]. *C. perfringens*, ürettiği çeşitli toksinler ile insanlarda gazlı gangrene ve birbirinden farklı iki tip gıda enfeksiyonuna neden olurken, birçok hayvan türünde enterotoksemi, nekrotik enteritis gibi değişik hastalıklar meydana getirmektedir [16]. Etken, gelişmek ve çoğalmak için ihtiyacı olan 13-14 aminoasit ile 5-6 vitamin ve mineral maddeyi kendi sentezleyemediği için dışarıdan almak zorundadır. Bu nedenle sıklıkla bu maddeleri yeterli oranda içeren, et veya et ürünlerinde bulunur [7]. *C. perfringens* oranı kanatlı eti ve ürünlerinde de, kanatlıların bağırsak kanalında olduğu gibi yüksektir [17].

C. perfringens'in florokinolonlar gibi genellikle anaerob mikroorganizmalara karşı kullanılan antibiyotiklere duyarlı olduğu bilinmektedir [6]. Rood ve ark. 1978 yılında ilk kez etkenin çoklu antibiyotik direncinin olduğunu (tetrasiklin, eritromisin, linkomisin, klindamisin) domuz dışkısından izole ettikleri örneklerde ortaya koymuştur [19]. Ancak *C. perfringens* için bilinen en tipik direnç tetrasiklene karşı geliştirdiğidir [23]. *C. perfringens*'in tetrasiklin direncinde etkili olan genetik determinantlar *tetP*, *tetM*, *tetK*, *tetL* olarak belirlenmiştir [13]. *C. perfringens*'in metronidazole dirençli olduğunu gösteren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunun yanında *catQ* ve *catP* genlerini taşıyan izolatlarda, kloramfenikol asetiltransferaz üretimi ile kloramfenikole, *ermQ* ve *ermP* geni tespit edilenlerinde klindamisine karşı direnç olduğu bildirilmektedir. Eritromisine direnç, klindamisin ve linkomisin direnci ile beraber görülmektedir [9]. Anaerob mikroorga-

nizmalarda en yaygın direncin aminoglikozidlere karşı olduğu bilinmektedir [18].

C. perfringens'in gıdalarda güvenilir metotlarla tespiti, identifikasyon ve antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi halk sağlığının korunması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu doğrultudan hareketle bu çalışmanın amacı, üç farklı kanatlı kesimhanesinden alınan 180 piliç boyun derisi örneğinden izole edilen 35 *Clostridium perfringens* suşunun antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesidir.

Materyal ve Metot

Materyal

Bu çalışmada, üç farklı kanatlı kesimhanesinden alınan 180 piliç boyun derisi örneğinden izole edilen 35 *C. perfringens* suşu materyal olarak kullanıldı. Boyun derilerinden klasik kültür yöntemi ile izole ve identifiye edilen *C. perfringens* 'ler, daha sonra *cpa* geni baz alınarak PCR ile doğrulandı.

Metot

İzolatların antibiyotik direnç profilleri CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından bildirilen disk difüzyon testine göre belirlendi [1]. Disk difüzyon yönteminde ampicillin (Oxoid CT0003B-10 µg), chloramphenicol (Oxoid CT0013B-30 µg), ciprofloxacin (Oxoid CT0425B-5 µg), gentamicin (Oxoid CT0794B-120 µg), nalidixic acid (CT0031B-30 µg), penicillin G (Oxoid CT0043B-10 U), tetracycline (Oxoid CT0054B-30 µg), trimethoprim (Oxoid CT0076B-5 µg), vancomycin (Oxoid CT0058B-30 µg) antibiyotikleri kullanıldı.

Bu amaçla izolatların Cooked Meat Medium'dan (Oxoid CM0081) alınan taze kültürleri, 5 ml'lik Tryptone Soya Brothda (TSB, Oxoid CM0129) 37°C'de, 0,5 McFarland (2 x 10⁸ kob/ml) türbidite oluşana kadar, inkübe edildi. Türbidite kontrolü NanoDrop spektrofotometrede (NanoDrop ND-100, Delaware, ABD) 625 nm dalga boyunda absorbanları 0,08-0,10 olacak şekilde yapıldı.

Zenginleştirilen suşlar steril svap yardımı ile 90 mm'lik petrilere 4 mm kalınlığında dökülen Mueller Hinton Agara (Oxoid CM 337) yayıldı. Svap ile ekimin ardından 3-5 dakika petrilere yüzeyindeki fazla sıvıyı çekmesi beklendikten sonra her petriye merkezden çevreye uzaklıkları 24 mm olacak şekil-

de antibiyotik diskleri yerleştirildi. Petriler 37°C'de anaerob ortamda 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda antibiyotik disklerinin etrafındaki inhibisyon zonlarının çapları ölçüldü. Elde edilen zon çapları, CLSI'daki standartlar ile karşılaştırılarak suşlar antibiyotiklere karşı duyarlı, orta dirençli veya dirençli olarak sınıflandırıldı (Şekil 1).



Şekil 1. *C. perfringens*'in Mueller Hinton agarda disk difüzyon testi görünümü

Bulgular

PCR ile doğrulanan 35 *C. perfringens* izolatının 9 farklı antibiyotiğe karşı direnç profillerinin araştırıldığı çalışma sonunda izolatların 35'inin de (%100) en az bir antibiyotiğe dirençli olduğu tespit edildi. Ayrıca 31 (% 88,5) *C. perfringens* izolatının 1'den fazla antibiyotiğe direnç gösterdiği belirlendi.

Çizelge 1. *C. perfringens* izolatlarının antibiyotik direnç profilleri

Antibiyotik	n (%)		
	Dirençli	Orta Dirençli	Duyarlı
Nalidiksik Asit	6 (17,1)	13 (37,1)	16 (45,7)
Penisilin	1 (2,8)	0	34 (97,1)
Gentamisin	22 (62,8)	4 (11,4)	9 (25,7)
Vankomisin	0	0	35 (100)
Kloramfenikol	0	4 (11,4)	31 (88,5)
Trimetoprim	35 (100)	0	0
Tetrasiklin	23 (65,7)	1 (2,8)	11 (31,4)
Ciprofloksasin	11 (31,4)	17 (48,5)	7 (20)
Ampisilin	1 (2,8)	0	34 (97,1)

n: izolat sayısı

İzolatların tamamının (% 100) dirençli olduğu antibiyotik trimetoprim olarak tespit edildi. Bu antibiyotik yanında, % 65,7 ile tetrasiklin, % 62,8 oranında gentamisin direncin yüksek oranda tespit edildiği diğer antibiyotikler olarak belirlendi. Elde edilen veriler izolatların hepsinin vankomisine duyarlı olduğunu da ortaya koydu (Çizelge 1).

Tartışma ve Sonuç

Kanatlı yetiştiriciliğinde antibakteriyel ilaçlar, hastalıkların tedavisi dışında koruyucu olarak ve verimi artırmak amacıyla da kullanılmaktadır. Bu amaçla düşük dozda, kısa süre uygulanan antibiyotikler, önemli bir halk sağlığı problemi olan antibiyotik direncine yol açmaktadır. Dirençli suşların hem kanatlılardan hem gıdalardan hem de insanlardan izole edildiği bildirilmektedir. *C. perfringens*'in de tetrasiklin başta olmak üzere kanatlı yetiştiriciliğinde kullanılan çeşitli antibiyotiklere karşı direnç gösterdiği bilinmektedir [15].

Silva ve ark. [20] yapmış oldukları çalışmada, kesimhanelerden alınan broyler bağırsaklarından izole edilmiş 55 *C. perfringens* izolatının antibiyotik direnç profilini belirlemiştir. İzolatların % 47,3'ü basitrasine, % 41,8'i tetrasikline dirençli bulunmuştur. Araştırılan antibiyotikler arasında en etkili olanlar ise penisilin, narasin ve monensin olarak saptanmıştır. Basitrasinin antikoksidial etkisinden dolayı, kanatlı yetiştiriciliğinde kullanımı yaygınlaşan bir antibiyotiktir. Bu nedenle direncin bu antibiyotikte yüksek olduğu düşünülmektedir.

Watkins ve ark. [24]'in araştırmasında da broyler kümeslerinden elde edilen *C. perfringens* izolatları antibiyotik direnç yönünden değerlendirilmiştir. Benzer şekilde en yüksek direncin basitrasinin ve linkomisininde tespit edildiği bildirilmiştir. Linkomisinin, kanatlılarda nekrotik enteritise bağlı ölümleri engellemek için koruyucu amaçla kullanıldığı bilinmektedir.

Johansson ve ark. [10] Danimarka, Norveç ve İsveç'te tavuklardan izole edilen 102 *C. perfringens* izolatının, yetiştiricilikte kullanılan 8 farklı antibakteriyel ve antikoksidiale karşı direncini araştırmıştır. Bu çalışmayla benzer olarak izolatların duyarlı olduğu antibiyotikler arasında eritromisin ve vankomisin yer almıştır. Antikoksidial ve anticlostridial etkilerinden dolayı bu ülkelerde sıklıkla kullanılan

narasine karşı henüz bir direnç tespit etmediklerini bildirmişlerdir. Tetrasiklin direnci ise İsveç'te % 76, Danimarka'da % 10 ve Norveç'te % 29 oranında tespit edilmiştir. Belçika'da Martel ve ark. [13]'ün yapmış olduğu benzer bir çalışmada da, 31 farklı çiftlikteki broylerlerden elde edilen izolatların, monensin ve narasin gibi antikoksidallere duyarlı olduğu, oksitetrasiklin ve klortetrasikline karşı % 66 oranında direnç gösterdiği bildirilmiştir.

Singh ve ark. [21]'nin çalışmasında bufalo, keçi ve tavuk etlerinden izole edilmiş *C. perfringens* suşlarının 16 farklı antibiyotiğe direnci araştırılmıştır. Diğer çalışmalardan farklı olarak bu izolatların en duyarlı olduğu antibiyotikler siprofloksasin (% 96,9) ve ofloksasin (% 87,8) olarak belirlenmiş ve bunları % 71 ile tetrasiklin izlemiştir. İncelenen bütün suşların streptomisin ve seftazidim'e karşı dirençli olduğu da ortaya konmuştur. Khan ve ark. [11]'nin yapmış olduğu benzer bir çalışmada da koyun, sığır ve tavuk etlerinden elde edilen *C. perfringens*'lerin antibiyotik dirençlilikleri araştırılmıştır. Toksin oluşturma yeteneğine sahip 6 izolatın hepsinin kloramfenikol, siprofloksasin, metranidazol ve ceftriaksona duyarlı olduğu, 5 tanesinin amoksisiline, 2'ser tanesinin amoksisilin ve vankomisine dirençli olduğu ortaya konmuştur. Her iki çalışmada da antibiyotik dirençlilik hayvan türleri arasında ayrılmadan belirtilmiştir, direnç profilinin farklılığının bundan ve ülkeler arası antibiyotik seçiminden ileri geldiği düşünülmektedir.

Tansuphasiri ve ark. [22] çalışmalarında insanlardan, hayvanlardan ve gıdalardan izole ettikleri *C. perfringens* suşlarının direnç profillerini karşılaştırmıştır. İnsanlardan izole edilen suşlarda en yüksek direnç % 44,9 ile tetrasiklinde görülmüştür. Buna paralel bir şekilde gıda örneklerindeki izolatlar içerisinde en yüksek direnç % 28 ile tetrasikline karşı tespit edilmiştir.

Çalışmada elde edilen izolatların, antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesiyle, büyük bir kısmının bir veya birden fazla antibiyotiğe direnç gösterdiği saptanmıştır. Bu durum, antibiyotik kullanımını sonucu mikroorganizmalarda gelişen direncin takip edilmesi ve dirençli suşların gelişmesinin önlenmesi amacıyla gıda üretiminde kullanılan hayvanlarda profilaktik ve büyütme faktörü olarak antibiyotik kullanımına ilişkin yasal düzenlemelere bağlı kalınmasının ve resmi otorite tarafından ulusal

kalıntı izleme programının etkin olarak yürütülmesinin ne kadar önemli olduğunu ortaya koymuştur.

Kaynaklar

1. Anonim, (2003). CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, Volume 24 Number 2 ISSN 0273-3099 Approved Standard-Sixth Edition. M11-A6 Pennsylvania. USA.
2. Bhunia AK, (2008). Foodborne Microbial Pathogens. Mechanisms and Pathogenesis. New York: Springer Publishing, p. 158.
3. Bogaard AE, Stobberingh EE, (1999). Antibiotic usage in animals impact on bacterial resistance and public health. *Drugs*. 58(4), 589-607.
4. Capita R, Alonso-Calleja C, (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Rev Food Sci Nut*. 53(1), 11-48.
5. Casewell M, Friis C, Marco E, McMullin P, Phillips I, (2003). The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J Antimicrob Chemother*. 52, 159-161.
6. Ellie JC, Goldstein MD, Diane M, (2011). Resistance trends in antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria, part 1. *Clin Microbiol Newsl*. 33(1), 1-8.
7. Erol İ, (2007). Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Ankara: Pozitif Matbaacılık, p.154.
8. Gaskins HR, Collier CT, Anderson DB, (2002). Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Anim Biotechnol*. 13(1), 29-42.
9. Hecht DW, Vedantam G, Osmolski JR, (1999). Antibiotic resistance among anaerobes: what does it mean?. *Anaerobe*. 5, 421-429.
10. Johansson A, Greko C, Engström BE, Karlsson M, (2004). Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. *Vet Microbiol*. 99, 251-257.
11. Khan M, Nazir J, Anjum AA, Nawaz M, Shabbir MZ, (2015). Toxinotyping and antimicrobial susceptibility of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates from mutton, beef and chicken meat. *J Food Sci Tech*. 52(8), 5323-5328.
12. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Greko C, (2013). Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*, 13(12), 1057-1098.
13. Martel A, Devriese La, Cauwerts K, De Gussem K, Decostere A, Haesebrouck F, (2004). Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathol*. 33(1), 3-7.
14. McDermott PF, Zhao S, Wagner DD, Simjee S, Walker RD, White DG, (2002). The food safety perspective of antibiotic resistance. *Anim Biotech*. 13(1), 71-84.

15. McEwen SA, Fedorka-Cray PJ, (2002). Antimicrobial use and resistance in animals. Clin Infect Dis. 34(3), 93-106.
16. Novak JS, Juneja VK, (2002). *Clostridium perfringens*: hazards in new generation foods. Innov Food Sci Emerg. 3(2), 127-132.
17. Nowell VJ, Poppe C, Parreira VR, Jiang Y, Reid-Smith R, Prescott JF, (2010). *Clostridium perfringens* in retail chicken. Anaerobe. 16, 314-315.
18. Rasmussen BA, Bush K, Tally FP, (1997). Antimicrobial resistance in anaerobes. Clin Infect Dis. 24(1), 110-120.
19. Rood JI, Maher EA, Somers EB, Campos E, Duncan CL, (1978). Isolation and characterization of multiply antibiotic-resistant *Clostridium perfringens* strains from porcine feces. Antimicrob Agents Chemother. 13(5), 871-880.
20. Silva ROS, Salvarani FM, Assis RA, Martins NRS, Pires PS, Lobato FCF, (2009). Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* strains isolated from broiler chickens. Braz. J Microbiol. 40(2), 262-264.
21. Singh RV, Bhilegaonkar KN, Agarwal RK, (2005). Studies on occurrence and characterization of *Clostridium perfringens* from select meats. J Food Safety. 25, 146-156.
22. Tansuphasiri U, Matra W, Sangsuk L, (2005). Antimicrobial resistance among *Clostridium perfringens* isolated from various sources in Thailand Southeast Asian. J Trop Med Public Health. 36(4), 954-961.
23. Teuber M, (1999). Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. Cell Mol Life Sci. 56, 755-763.
24. Watkins KL, Shryock TR, Dearth, RN, Saif, YM, (1997). In-vitro antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. Vet Microbiol. 54, 195-200.

The Determination of Virulence Factors among Fish Originated Enterococci

Serap Savaşan¹, Şükrü Kırkan¹, Göksel Erbaş¹, Uğur Parın¹, Alper Çiftçi²

¹ Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Aydın, Turkey;

² Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Samsun, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 22.08.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 03.10.2016

Abstract: Enterococci are commensal organisms of human and animals, and may cause diseases in particular conditions. Several virulence factors are responsible in the production of diseases. The aim of this study was to isolate enterococci from fish and to determine virulence factors of the isolates. A total of 26 (13%) *Enterococcus faecalis* strains were isolated from live, moribund and dead fish collected from fish farms in Aegean Region. Cytolysin and gelatinase activities and aggregation substance production of these strains were examined. Cytolysin production was not detected in any of *E. faecalis* strains. Of 26 strains tested, 27% was found to produce aggregation substance. Gelatinase activity was found in 11.5% of strains. The presence of strains with important virulence factors in enterococci from fish was established. It was suggested that these strains have the potential of producing disease in human and animals.

Key words: Enterococcus, Fish, Virulence factors

Balık Kökenli Enterokoklarda Bazı Virülens Faktörlerinin Belirlenmesi

Özet: Enterokoklar insan ve hayvanlarda kommensal olarak bulunan ve özel koşullarda hastalığa neden olan bakterilerdir. Hastalığın oluşumunda birçok virülens faktörü rol oynamaktadır. Bu çalışmada balıklardan enterokok izolasyonu ve izole edilen enterokoklarda virülens faktörlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında Ege bölgesinde bulunan balık işletmelerinden toplanan balıklardan 26 (%13) adet *Enterococcus faecalis* izole edilmiştir. İzolatlarda sitolizin ve jelatinaz aktivitesi ile birlikte agregasyon substans üretimi incelenmiştir. İzolatların hiçbirisinde sitolizin aktivitesi tespit edilememiştir. İzolatların %27'sinde agregasyon substans üretimi ve %11,5'inde ise jelatinaz aktivitesi saptanmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada; balık kökenli enterokoklarda önemli virülens faktörlerinin varlığı belirlenmiş ve bu suşların insan ve hayvanlarda hastalık oluşturma potansiyeli olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Balık, Enterococcus, Virülens faktörleri

Introduction

Gram positive enterococci are considered responsible for most of the diseases that seen in aquaculture around the world. In this time, it is possible to encounter with the enterococcal infections throughout the world. Observations of tardy development, anorexia, inactivation, loss of gloss and necrosis in muscles, septicemia and mortalities were reported in enterococci infected fishes [5,11,13]. Enterococci are mostly found in intestine and can reach the number of 10^7 bacteria/g [2]. Apart from living organism, enterococci were isolated from surface water, river, sewage, soil and several food stuffs [16,30].

Although enterococci are approved to be part of normal bacterial flora and qualified as lower virulence microorganisms, especially their role in certain human diseases and mortality rate is remarkable. With the understanding the importance

of enterococci in human diseases, enterococci were started to isolate from sporadic infections of some animals, particularly from nosocomial infections of small animals and pets [9,32]. A great majority of clinic infections are generated by *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* [4]. Among all the nosocomial infections, enterococci are second most frequent pathogens [27]. Because of occurring in 80-90% of these cases, *E. faecalis* was approved the most prevailing enterococcus. That is followed by *E. faecium* with the frequency rate of 5-15% [4].

Despite the admitted low virulence of enterococci, accession of their infections to the serious extent and existence of high mortality rate are increased the attention to them [35]. There are several opinions about diffusion and contagion of virulent enterococcus strains. According to one opinion contagion is happened by strain's itself from patient to patient or from environment to patient. Pursuant to

other opinion, spread of virulence and resistance genes -instead of strains- come into question [2, 29].

Aggregation substance (AS) is a surface protein that provides aggregation of donor and receiver enterococcus strains to get close contact during bacterial conjugation [7]. Most important characteristic of AS, except providing transfer of some virulence genes and antibiotic resistance genes with an efficient bacterial conjugation, is to supply binding enterococcus to eukaryotic cells and to play significant role in pathogenesis. AS also makes available the invasion of colon mucosa and the entry to intestinal epithelium cells by enterococci [20, 28].

Cytolysin is a toxin in protein structure and has a hemolytic characteristic that is found in *E. faecalis* strains. Enterococcal cytolysin is effective on some eukaryotic cells [26].

Experimental studies showed that cytolysin characteristic can be conveyed through strains by the way of conjugation [27].

As in other bacterial pathogens, proteolytic enzymes are presented among the virulence factors of enterococci [26]. Since for its identification gelatin is used, enterococcal protease -that is also known as gelatinase- is an extracellular enzyme that has metalloproteinase feature (zinc-endopeptidase) and 34,5 kDa in weight [22]. In the studies, its gelatinase feature was only determined in *E. faecalis* strains while it wasn't seen in *E. faecium* strains. Furthermore, gelatinase activity in *E. faecalis* strains was detected in a study that was carried out on animal and foodborne enterococci [10]. In an experiment that was conducted in strains isolated from bacteraemia cases, gelatinase was observed on 55% of

E. faecalis strains while it was not produced in *E. faecium* strains [12].

In this study it was aimed to obtain detailed information about enterococci that cause economic losses and health problems in culture fishing by isolating them and determining main virulence factors of isolated strains.

Materials and Methods

Sample collection, isolation and identification of enterococci

In this study, 200 fish samples that were collected from different commercial fish farms establishment in Aegean region from Turkey. For isolation, samples were inoculated to selective Enterococcus M broth medium. The medium was incubated for 18-24 h at 37°C. Color change of medium was evaluated as an indicator of enterococci growth in the medium. Positive broth cultures were transferred to BBL™ Enterococcosel Agar (EA) for isolation of enterococci. Plates were incubated overnight at 37°C. At the end of the incubation period, black and dark brown colonies were considered as being an enterococci [21].

For the identification at the level of the genus, Gram staining, catalase tests on slide, gas reproduction from mannitol and reproduction at 45°C were made to a presumptive positive colonies.

The strains that gave positive results in these tests and were denominated as *Enterococcus* sp. have been observed for their various phenotypic and biochemical properties to identify them at species level [25]. In addition, certain types of the standard strains were used for control purposes.

Table 1. The oligonucleotide primers used in the study.

Primer names		Oligonucleotide sequences	
DD13	Forward	5'-CACCTGAAGAAACAGGC-3'	<i>E. faecalis</i>
DD3-2	Reverse	5'-ATGGCTACTTCAATTTACAG-3'	
FAC1-1	Forward	5'-GAGTAAATCACTGAACG-3'	<i>E. faecium</i>
FAC2-1	Reverse	5'-CGCTGATGGTATCGATTCAT-3'	
ENT1	Forward	5'-TACTGACAAACCATTTCATGATG-3'	<i>Enterococcus</i> spp.
ENT2	Reverse	5'-AACTTCGTCACCAACGCGAAC-3'	

For genomic identification of enterococci by PCR, bacterial DNAs were extracted with boiling method and kept frozen at -20°C until used. The determination of enterococci at genus level was performed with using *Enterococcus* specific primer (Table 1) as described by Ke et al. [24]. For the identification of these enterococci either being *E. faecalis* or *E. faecium*, *ddl* gene targeted multiplex PCR was performed [8]. After amplification, the DNA fragments of 112-bp (*Enterococcus* spp.), 476-bp (*ddl* for *E. faecalis*) and 1091-bp (*ddl* for *E. faecium*) were separated by agarose gel electrophoresis and visualized under ultraviolet light.

Determination of virulence factors

Measurement of the AS of the enterococci was performed by clumping assay, as described by Chow et al. [6]. GelE activity of enterococci was tested in gelatine medium, as described by Su et al. [34]. And, the method described by Elsner et al. [12] was used for the detection of cytolysin activity.

For the GelE, *E. faecalis* OG1RF was used as a positive control, The plasmidless reference *E. faecalis* OG1X strain was used as a negative control, whereas 2 variants of *E. faecalis* OG1X containing either plasmid pAD1 or pCF10 were used as positive controls for the AS and *E. faecalis* OG1X (pAM944) was used as a positive control for the Detection of cytolysin production [15].

Reference strains

The reference strains of enterococci were kindly provided by Dr. D.B. Clewell (Department of Biologic and Materials Sciences, School of Dentistry, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, USA) (Table 2).

Table 2. Standard *E. faecalis* derivatives and contents of isogenic strains, plasmid/transposon, and virulence factors.

Strain/Isogen	Plasmid	Transposon	Virulence Factors
OG1X	None	None	None
OG1RF	None	None	GelE
OG1X(pAM9058)	pAD1	Tn917	AS
OG1X(pAM944)	pAD1	Tn917	Cytolysin
OG1X(pAM714)	pAD1	Tn917	Cytolysin + AS
OG1SSP	PCF10	Tn915	GelE + AS

Results

Isolation and identification

In this study, 26 (13 %) *Enterococcus* sp. were isolated from 200 fish samples and all of them were identified as *E. faecalis* according to the biochemical features. Also, identifications were confirmed by PCR and all of the isolates gave positive bands for *Enterococcus* spp. and *E. faecalis*. None of them gave a band for *E. faecium*. According to these results, all the strains were identified as *E. faecalis*.

Virulence factors

Aggregation substance (AS): *Enterococcus* strains isolated from fish were determined whether they produce aggregation substance against the stimulation of *E. faecalis* OG1X pheromone. In consequence of cluster test, 7 of inspected 26 *Enterococcus* strains (27%) were found to produce aggregation substance. OG1X (pAM714), OG1X (pAM9058) and OG1SS strains of *E. faecalis* that were used as control gave positive, and OG1X (pAM944) gave negative result to AS.

Cytolysin: As a result of hemolysis test that were performed in horse blood agar to determine cytolysin characteristic of fish originated enterococcus strains, none of the strains were observed to show cytolysin activity.

Gelatinase (GelE): In the gelatinase test, 3 of 26 (11.5%) inspected enterococcus strains were detected to produce gelatinase. OG1RF and OG1SS strains of *E. faecalis* that were used as control gave positive; OG1X(pAM714), OG1X(pAM944), OG1X(pAM9058) and OG1X strains gave negative results (Table 3).

Table 3. The distribution of virulence factors of *E. faecalis*

Serotypes	Virulence factors					
	AS		Cytolysin		GelE	
	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
<i>E. faecalis</i> (n=26)	7	19	-	26	3	23

Pos: Positive,
Neg: Negative,
AS: Aggregation substance,
GelE: Gelatinase

According to results, only 1 of 26 (3.84%) *E. faecalis* strain was found as positive for both AS and GeE. AS and GeE showed different positive-ness results in other isolates, none of isolate was found positive to Cytolysin.

Discussion

Aquaculture has become an important sector nowadays. During the recent years it was seen that sporadic and epidemic cases in fish diseases have its source from Gram positive coccus. In taxonomic studies, different Gram positive coccus species causing fish diseases were indicated to be present such as *Streptococcus iniae*, *S. difficile*, *Lactococcus piscium*, *Vagococcus salmoninarum* and *Enterococcus seriolicida* [11]. Quite high level phenotypic heterogeneity was found between Gram positive coccus which show fish originated enterococcus or streptococcus properties. Eldar et al. [11] isolated *Enterococcus* species from trout pursuant to their phenologic and serologic properties.

In this study 26 *Enterococcus* sp. isolated from 200 fish samples and they were confirmed as *E. faecalis* based on all biochemical characteristics. Araujo et al. [1] reported that 42.2% of 64 *Enterococcus* strains isolated from rainbow trout were *E. faecium* while 35.9% of them were *E. hirae*.

Enterococci long time was assumed non-pathogenic since they were normally existed in humans and animal flora. Nevertheless, causing severe diseases and high lethality under certain conditions was revealed that they have notable virulence factors. In the studies conducted for this aim concluded that some properties of *Enterococci* might be related to virulency [26]. Aggregation substance is one of the most accentuated among these factors. Importance of AS were demonstrated either epidemiologic [12] or experimental studies [28,33]. According to determination of the studies; AS provides binding to mucosal epithelium cells and endocardium as well as invasion [20], increases the vitality in neutrophil [31,36] and inhibits the fusion of lysosomal vesicle and phagosome [17].

In this study, AS production of *E. faecalis* strains isolated from fishes were examined by cluster test that based on aggregate generation of tested organisms after pheromone stimulation. AS was determined in 27% of inspected *E. faecalis* strains.

There is a general opinion in literature that AS production is a property peculiar to *E. faecalis* and *E. faecium* species [22,26].

Parallelism between AS property and other virulence factors wasn't determined. Mundy et al. [26] reported that genes encoding the AS are independent or are located in plasmids carrying Cytolysin. Having cytolysin negative and AS positive phenotypes in this study indicated there might be only one plasmid in isolated strains.

Cytolysin is viewed as the most remarkable feature of virulence factors of *Enterococci* according to epidemiologic and experimental data [23,26]. In the epidemiological studies which shows the importance of AS; cytolysin characteristic were found at the higher rate in clinical isolates than in normal population isolates [18,19]. Playing significant role in pathogenicity by organ toxicity of cytolysin was also determined in the experimental endocarditis, endophthalmitis and peritonitis models [6,14]. Moreover, it was reported that cytolysin with its bacteriosin effect have a role in colonization by suppressing other bacteria [6].

In this study, cytolysin production of *E. faecalis* strains isolated from fishes was investigated by hemolysis test based on lysis of horse erythrocyte. Cytolysin activity was observed in none of the *Enterococci* strains. This result didn't change even the hemolysis tests repeated several times with control strains under different conditions. Although it wasn't found any study in literature supporting this result, cytolysin was accepted as atypical variants without denying existence of strains. Furthermore, the possibility of existence of this characteristic in subsequently observed *Enterococci* should not be forgotten by considering the previous AS sample. Because AS production was accepted long time as a characteristic that only belongs to *E. faecalis*; recently, it has been understood that *E. faecium* has that characteristic too.

Elsner et al. [12] determined cytolysin production in 16% of *E. faecalis* strains isolated from bacteraemic humans. Eaton and Gasson [11] found cytolysin phenotype in 33% and 44% of *E. faecalis* strains that are clinically originated from humans and animals, respectively. But they stated the cytolysin frequency rate in human strains as 56%. This data indicates cytolysin production rate can change

from studies to studies and certain conditions need to be exist for gene expression.

As in other bacterial pathogens, proteolytic enzymes are introduced among the virulence factors of *Enterococci*. Relation between virulency and gelatinase property representing the protease was determined in the experimental animal models and epidemiological studies that show their higher existence in clinical isolates. In our study, proteolytic activity of *Enterococcus* strains was examined by a test that determine gelatinase which hydrolyzing gelatin. Gelatinase feature was observed in 11.5% of *E. faecalis* strains. Since the results didn't change in repeated tests with control, these strains were accepted as atypical gelatinase variants. Moreover, a relation between gelatinase characteristic and other virulence factors was not detected. Protease characteristic was found 54% of *Enterococcus* isolated from endocarditis cases and nosocomial infections, while this rate was 12% in healthy sources [22]. Eaton and Gasson [10] determined 56% gelatinase frequency in *E. faecalis* strains originated from foods and humans. These studies showed gelatinase activity is found at high rate in clinical strains and might also be exist in animal food originated strains. Carnerio et al. [3] investigated virulence factors in 87 *E. faecalis* strains isolated from fish and sea products. They reported 97% of these strains carry *gelE* gene, only 77% of them show gelatinase activity, beside 5% of these strains demonstrated cytolytic activity with hemolysis test.

In this study gelatinase activity was encountered relatively low in inspected strains. Nevertheless, existence of this factor was shown in fish originated strains. These virulence factors even if they are not related to deaths might contribute to pathogeny by providing the colonization of agent, binding to host cells and resistance to immune system. Consequently, existence of important virulence factors in fish originated *Enterococci* and occurrence of the strains' infection potential in human and animals were determined.

Acknowledgement

This research project supported by the Adnan Menderes University Scientific Research Projects Unit (Project code: VTF-03005).

References

1. Araujo C, Munoz-Atienza E, Hernandez PE, Herranz C, Cintas LM, Igrejas G, Poeta P, (2015). Evaluation of *Enterococcus* spp. from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), Feed, and Rearing Environment Against Fish Pathogens. *Foodborne Pathog Dis.* 12(4), 311-322.
2. Bensoussan R, Weiss R, Laverdiere M, (1998). Vancomycin-resistant enterococcus. *Scand J Gastroenterol.* 33, 1233-1238.
3. Carneiro CS, Evangelista-Barreto NS, da Silveira-Oliveira CS, Silva IP, de Oliveira TAS, Saraiva MAF, (2015). Antagonistic Activity, Antimicrobial Susceptibility and Potential Virulence Factors of *Enterococcus faecalis*. *J Life Sci.* 9, 318-326.
4. Çetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG, (2000). Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 13, 686-707.
5. Cheng W, Chen JC, (1998). Isolation and characterization of an *Enterococcus*-like bacterium causing muscle necrosis and mortality in *Makrobranchium rosenbergii* in Taiwan. *Dis Aquat Organ.* 34(2), 93-101.
6. Chow JW, Thal LA, Perri MB, Vazquez JA, Donabedian SM, Clewell, DB, Zervos MJ, (1993). Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agent Chemother.* 37, 2474-2477.
7. Clewell DB, (1993). Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell* 73, 9-12.
8. Depardieu F, Perichon B, Courvalin P, (2004). Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 42, 5857-5860.
9. Devriese LA, Hommez J, Leavens H, Pot B, Vandamme P, Haesebrouck F, (1999). Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Vet Microbiol.* 70, 87-94.
10. Eaton TJ, Gasson MJ, (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol.* 67, 1628-1635.
11. Eldar A, Gorla M, Ghittino C, Zlotkin A, Bercovier H, (1999). Biodiversity of *Lactococcus garviae* strains isolated from fish in Europe, Asia, and Australia. *Appl Environ Microbiol.* 65(3), 1005-1008.
12. Elsner HA, Sootka I, Mack D, Claussen M, Lauf R, Wirth R, (2000). Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 19, 39-42.
13. Frick IM, Morgelin M, Bjorck L, (2000). Virulent aggregates of *Streptococcus pyogenes* are generated by homophilic protein-protein interactions. *Mol Microbiol.* 37, 1232-1247.
14. Gentry-Weeks CR, Karkhoff-Schweizer R, Pikis A, Estay M, Keith JM, (1999). Survival of *Enterococcus faecalis* in mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun.* 57, 2160-2165.

15. Gülhan T, Aksakal A, Ekin İH, Savaşan S, Boynukara B, (2006). Virulence Factors of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from humans and pets. *Turk J Vet Anim Sci.* 30, 477-482.
16. Harwood VJ, Brownell M, Perusek W, Whitlock JE, (2001). Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. isolated from wastewater and chicken feces in the United States. *Appl Environ Microbiol.* 67, 4930-4933.
17. Hirt H, Erlandsen SL, Dunny GM, (2000). Heterologous inducible expression of *Enterococcus faecalis* pCF10 aggregation substance asc10 in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus gordonii* contributes to cell hydrophobicity and adhesion to fibrin. *J Bacteriol.* 182, 2299-2306.
18. Huycke MM, Spiegel CA, Gilmore MS, (1991). Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agent Chemother.* 35, 1626-1634.
19. Ike Y, Hashimoto H, Clewell DB, (1987). High incidence of hemolysin production by *Enterococcus faecalis* strains associated with human parenteral infections. *J Clin Microbiol.* 25, 1524-1528.
20. Isenmann R, Schwarz M, Rozdzinski E, Marre R, Beger HG, (2000). Aggregation substance promotes colonic mucosal invasion of *Enterococcus faecalis* in an ex vivo model. *J Surg Res.* 89, 132-138.
21. Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB, (2004). Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J Clin Microbiol.* 42, 3558-3565.
22. Jett B, Huycke M, Gilmore M, (1994). Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 7, 462-478.
23. Jett B, Jensen HG, Nordquist RE, Gilmore MS, (1992). Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect Immun.* 60, 2445-2452.
24. Ke D, Picard FJ, Martineau F, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG, (1999). Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol.* 37, 3497-3503.
25. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, (1997). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* Lippincott, New York, Fifth Edition, pp: 606.
26. Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M, (2000). Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 13, 513-522.
27. Murray BE, Weinstock GM, (1999). Enterococci: the new aspects of an old organism. *Proceed Assoc Am Physicians.* 111, 328-334.
28. Olmsted S, Dunny G, Erlandsen S, Wells C, (1994). A plasmid-encoded surface protein on *Enterococcus faecalis* augments its internalization by cultured intestinal epithelial cells. *J Infect Dis.* 170, 1549-1556.
29. Petts DN, Noble WC, Howell SA, (1997). Potential for gene transfer among enterococci from a single patient and the possibility of confounding typing results. *J Clin Microbiol.* 35, 1722-1727.
30. Pinto B, Pierotti R, Canale G, Reali D, (1999). Characterization of faecal streptococci as indicators of faecal pollution and distribution in the environment. *Lett Appl Microbiol.* 29, 258-263.
31. Rakita RM, Vanek NN, Jacques-Palaz K, (1999). *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. *Infect Immun.* 67, 6067-6075.
32. Romalde JL, Magarinos B, Nunez S, Barja JL, Toranzo AE, (1996). Host range susceptibility of *Enterococcus* sp. strains isolated from diseased turbot: possible routes of infection. *Appl Environ Microbiol.* 62, 607-611.
33. Schlievert PM, Gahr PJ, Assimacopoulos AP, Dinges MM, Stoehr JA, Harmala JW, Hirt H, Dunny GM, (1998). Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. *Infect Immun.* 66, 218-223.
34. Su YA, Sulavik MC, He P, Makinen KK, Makinen PL, Fiedler S, Wirth R, Clewell DB, (1991). Nucleotide sequence of the gelatinase gene (gelE) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect Immun.* 59, 415-420.
35. Thal LA, Chow JW, Mahayni R, Bonilla H, Perri MB, Donabedian SA, Silverman J, Taber S, Zervos MJ, (1995). Characterization of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *Antimicrob Agent Chemother.* 39, 2112-2115.
36. Vanek NN, Simon SI, Jacques-Palaz K, Mariscalco MM, Dunny GM, Rakita RM, (1999). *Enterococcus faecalis* aggregation substance promotes opsonin-independent binding to human neutrophils via a complement receptor type 3-mediated mechanism. *FEMS Immun Med Microbiol.* 26, 49-60.

Molecular Survey of *Hepatozoon canis* in Dogs from Samsun Province of Northern Part of Turkey

Cenk Soner Bölükbaş¹, Didem Pekmezci², Ali Tümay Gürler¹, Gökmen Zafer Pekmezci³, Murat Güzel², Mustafa Açıcı¹, Şinasi Umur¹

¹ Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ondokuz Mayıs, Samsun

² Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ondokuz Mayıs, Samsun

³ Preclinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ondokuz Mayıs, Samsun

Geliş Tarihi / Received: 06.10.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 15.11.2016

Abstract: We attempt to address new information of haematozoan infections in dogs from Samsun province of Turkey. The diagnostic techniques using genus specific polymerase chain reaction designed to amplify a fragment of ~666 bp located in 18S ribosomal RNA (rRNA) gene of *Hepatozoon* spp. include microscopic investigations. *H. canis* identities were confirmed by sequencing the 18S rRNA gene. Two hundred (170 stray and 30 owned dogs) blood samples from asymptomatic dogs treated for endo and ecto parasites were examined. There were no detected ticks on dogs in the clinical examinations. None of 200 thin blood smears were positive for the presence of *Hepatozoon* spp. gametocytes. Only one dog sample from 200 with a prevalence of 0.5% was found to be positive for the presence of *Hepatozoon* DNA demonstrates a chronic infection. Partial sequences of the 18S rRNA gene shared 99-100% similarity with the corresponding *H. canis* isolates. Contrary the other molecular surveys on *H. canis* among Turkey, this research revealed a very low prevalence of *H. canis* in dogs from Samsun province of Turkey, and it indicates that ectoparasite control programs have a great impact on decreasing the vector borne parasitic diseases especially in the stray and owned dogs.

Key Words: 18S rRNA gene, DNA sequencing, *Hepatozoon canis*, dogs, Samsun, Turkey

Türkiye'nin Samsun İlindeki Köpeklerde *Hepatozoon canis*'in Moleküler İncelenmesi

Özet: Bu çalışmada Samsun'da köpeklerde haematozoan enfeksiyonlar hakkında yeni bilgilerin verilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla mikroskopik inceleme ile birlikte *Hepatozoon* spp.'nin ~666 baz uzunluğundaki 18S ribosomal RNA (rRNA) gene bölgesini amplifiye eden cins spesifik polimeraz zincir reaksiyon metodu kullanıldı. 18S rRNA gene bölgesinin dizi analizi ile *H.canis* identifiye edildi. Endo ve ektoparazit tedavisi yapılmış asemptomatik köpeklerden 200 (170 sokak ve 30 sahipli) kan örneği toplandı. Köpeklerin klinik muayenelerinde keneler saptanmadı. Çalışmada 200 kan frotisinin mikroskopik bakışında *Hepatozoon* spp. gametositlerine rastlanmadı. Araştırmada % 0,5 enfeksiyon oranında 200 örnekten sadece 1 köpekte *Hepatozoon* DNA'sı pozitif bulunması kronik enfeksiyonu işaret etmektedir. Araştırmada pozitif bulunan örneğin 18S rRNA geninin kısmi DNA dizisi dünyadaki diğer *H. canis* izolatları ile % 99-100 oranında benzerlik gösterdi. Bu çalışmada Türkiye genelindeki *H. canis*'in moleküler incelemelerinin aksine Samsun yöresindeki köpeklerde çok düşük enfeksiyon oranı ile karşılaşıldı. Bu durum sokak ve sahipli köpeklerde vektör kaynaklı parazit hastalıkların azaltılması noktasında özellikle ektoparazit kontrol programlarının önemini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: 18S rRNA gen, DNA dizi analizi, *Hepatozoon canis*, köpek, Samsun, Türkiye

Introduction

Hepatozoon is a tick borne protozoan parasite, classified in the Phylum Apicomplexa and is closely related to *Plasmodium* spp. and Piroplasmids. Representatives of the genus infecting dogs occur both in the New and the Old World. The two species *H. canis* and *H. americanum*, with distinct clinical, pathological, genetic, antigenic aspects and vectors of transmission especially have importance on dogs. However, the distribution of *H. americanum* is re-

stricted to the United States; *H. canis* is geographically more widespread - including the America, the tropical and temperate zone of Europe, Africa, southwestern Asia, southern and Eastern Europe [5,7,12].

Chronically reports and surveys on hepatozoonosis in Turkey have been started with a first case report in Turkey in 1933 [15], thereafter another case report of this disease has been followed [16]. A parasitological, molecular and serological survey

of *H. canis* infection in dogs around the Aegean coast of Turkey including Central Aydın, Kusadası, Selçuk, Central Manisa, Bodrum and Marmaris was presented by Karagenc et al. [10]. Based on molecular investigations of *Hepatozoon* species in dogs reported the infection source as Diyarbakir an inner province of Turkey [2]. Later, Düzlü et al. [8] reported *H. canis* infection in dogs from Kayseri province by Real Time PCR. Moreover, Aktas et al. [1] also reported another molecular and serological survey of *H. canis* infection in domestic dogs from five coastal provinces (Sakarya, Kocaeli, Mersin, Giresun, and Izmir) and four inland provinces (Elazığ, Erzurum, Ankara, and Nevşehir) of Turkey. Finally, molecular detection and characterization of *Hepatozoon* spp. in dogs reported from different locations throughout Konya and Karaman provinces located in Central Anatolia Region of Turkey [4].

Showing different ecological and climate conditions the Middle Black Sea Region of Turkey has a great importance of the distribution of vector borne parasitic diseases. Therefore, a molecular study was attempted to determine the prevalence of *Hepatozoon* spp. infection in a coastal province, Samsun, from the Middle Black Sea Region of Turkey by using blood smear, and PCR amplification and DNA sequencing was conducted to identify *Hepatozoon* species.

Materials and Methods

Animals

A total of 200 domestic dog blood samples were collected from Samsun province of Turkey. The field work was undertaken in collaboration with Samsun Metropolitan Municipality's Incapacitated Orphaned Animal Care Center officers, and colleges in the Ondokuz Mayıs University Faculty of Veterinary Medicine's Teaching Animal Hospital. Of the total number of 200 dogs with different breeds and sexes, 170 were from municipal shelters, 30 from the Ondokuz Mayıs University Faculty of Veterinary Medicine's Teaching Animal Hospital. Because of the shelter management policy all dogs that were enrolled in the study were treated for endo and ecto parasites, same as all owned dogs were also treated for endo and ecto parasites. Based on their detailed clinically examinations dogs were determined as

asymptomatic. Venous blood was taken from the cephalic vein, with 2 ml evacuated into a plain additive tube with K3 EDTA (7.5 per cent 0.040 ml) for blood firm sampling and PCR. Sampling procedures was conducted between 2010 and 2013. The protocol for sampling had been reviewed and approved by the Ethical Review Committee of the Ondokuz Mayıs University (No: HAYDEK/109). Thin blood smears were taken from the cephalic vein, fixed with ethanol, stained with Giemsa, and screened for *Hepatozoon* gametocytes.

DNA isolation, amplification and sequencing

The genomic DNA was extracted from blood samples using a DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) according to manufacturer's instruction. Polymerase chain reaction (PCR) targeting the partial 18S rRNA gene sequences of *Hepatozoon* spp. were performed. PCR was carried out in a final volume of 50 µl, containing 10-50 ng of extracted DNA, 1X PCR Buffer with KCl (Thermo Scientific), 1.5 mM of MgCl₂ (Thermo Scientific), 0.2 mM each dNTPs (Thermo Scientific), 20 pmol of each primer and 2 U of Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific). Fragments of ~ 666 bp of the partial 18S rRNA gene were amplified using the primers HepF (5'-ATACATGAGCAAATCTCAAC-3') and HepR (5'-CTTATTATTCATGCTGCAG-3') [9]. The PCR was performed in a Thermo PxE 0.2 thermal cycler (Thermo Scientific) and the conditions were as follows: 5 min at 94°C, then 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 55°C and 1 min at 72°C followed by a final elongation of 5 min at 72°C. PCR products were electrophoresed in 1.5% agarose gel (Prona) in a TBE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.3) (Thermo Scientific), stained with ethidium bromide (Sigma) and visualized by UV transillumination (DNR, Bio-imaging system). The size of the amplified fragments was estimated by comparisons with the 1000 bp DNA Ladder (Thermo Scientific).

Hepatozoon canis identities were confirmed by sequencing the 18S rRNA gene. The 18S rRNA gene amplification product was sent to sequencing company (Macrogen, Korea) for purification and sequencing in both directions using same primers. Sequencing was carried out directly on purified fragments with ABI PRISM 310 genetic analyzer

(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using the ABI PRISIM® BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit. Sequence quality was assessed using Vector NTI Advance 11.5 (Invitrogen).

Phylogenetic analysis

The obtained sequences were verified by forward and reverse comparisons, assembled and edited with using Contig Express in Vector NTI Advance 11.5 (Invitrogen). The obtained consensus sequences were compared with previously published data for identification by using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) via GenBank database [3]. Sequences were aligned with previously characterized sequences of other known *H. canis* using ClustalW in Mega 5.0 (<http://www.megasoftware.net/>) multiple sequence alignments [14] and adjusted manually. Genetic distances were calculated using the Kimura two-parameter model with pairwise deletion in Mega 5.0 [13]. The nucleotide sequence was deposited in GenBank database under the accession numbers: KX588232.

Results

In the present study, information on ecto parasiticide treatment was available for all dogs. Therefore,

there were no detected ticks on dogs in the clinical examinations. None of 200 thin blood smears were positive for the presence of *Hepatozoon* spp. gametocytes. In contrast, results out of 200 samples, only 1 (0.5%) were found positive in terms of *Hepatozoon* spp. by PCR in the stray dog. The only PCR-positive sample was confirmed by 18S rRNA gene sequence comparisons in Genbank. The percent identities among *H. canis* isolates from Turkey (Samsun, KX588232) showed 99-100 % identity with various geographical isolates of *H. canis* from the Iran (KT736298), Hungary (KJ572976), Italy (GU371447; GU371448; GU371449; GU371450; KP644235), Malaysia (KT267961), Croatia (FJ497019; FJ497022; HM212626), Brazil (AY461375) and Spain (AY150067) from GenBank. Moreover, in Turkey, pairwise comparison between the 18S rRNA gene sequences of the *H. canis* isolates from Samsun (KX588232) and other *H. canis* isolates from different regions (strain H130, KF034776; Konya B172, KF439867; Aydın, DQ060328; Kusadasi, DQ060324; Selcuk, DQ060329; Bodrum, DQ060327; Marmaris, DQ060326; TrKysHcan1, KJ513198; isolate DD11, JQ867390; Konya B167, KF439866; Manisa, DQ060325) showed differences ranging from 0.0 to 0.9 % (Table 1).

Table 1. Pairwise comparison of nucleotide sequence differences (in percent) in the 18S rRNA among *H. canis* isolates in Turkey.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Samsun, KX588232	-											
2. strain H130, KF034776	0.000	-										
3. Konya B172, KF439867	0.002	0.002	-									
4. Aydın, DQ060328	0.005	0.005	0.007	-								
5. Kusadasi, DQ060324	0.005	0.005	0.007	0.000	-							
6. Selcuk, DQ060329	0.007	0.007	0.009	0.002	0.002	-						
7. Bodrum, DQ060327	0.007	0.007	0.009	0.002	0.002	0.000	-					
8. Marmaris, DQ060326	0.007	0.007	0.009	0.002	0.002	0.000	0.000	-				
9. TrKysHcan1, KJ513198	0.007	0.007	0.009	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	-			
10. isolate DD11, JQ867390	0.007	0.007	0.009	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	-		
11. Konya B167, KF439866	0.007	0.007	0.009	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-	
12. Manisa, DQ060325	0.009	0.009	0.011	0.005	0.005	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	-

Discussion

Hepatozoonosis as one of the other tick-borne diseases plays a major hazard to domestic and wild canids globally. Therefore, epidemiological studies are essential to describe the trends of infection with a particular pathogen and its vectors locally and regionally. Knowledge on vector-borne infections at the local level allows veterinary practitioners to recognize the pathogens that can affect their patients facilitating a prompt diagnosis and treatment [6]. To date no study about canine hepatozoonosis from Samsun province of Turkey has been reported. Although PCR is considered the most sensitive detection method for canine hepatozoonosis, microscopic examination of blood smears is a simple technique frequently used for the diagnosis of this infection. This technique may be used also as an epidemiological tool for studies in areas where canine hepatozoonosis is endemic or where it is suspected [11]. However, negative results may lead to misdiagnosis of the disease especially in tick free patients.

Previous studies even molecularly presented in different parts of Turkey represented higher infection rates [1,2,4,8,10,16] contrarily to our results. One of the explanations of this very low infection rate of our result may be depended to the successful ecto parasite treatment of the sampled dogs. While, all shelter samples same as all owned dogs were also treated for endo and ecto parasites. The only positive result of the study also demonstrates the chronic infection in the dogs, which only could be detected by PCR. Same as Otranto et al. [11], this study suggests that when no information is available on the date of potential infective tick exposure, PCR on either blood or buffy coat should be preferred to cytology for the diagnosis of *H. canis* infection. This detection of the chronic infection even in one sample shows the distribution of hepatozoonosis in Samsun province, and precautions should be taken for disease protection.

Therefore, we believe that this molecular survey has an importance for clarifying the canine hepatozoonosis, and guide the practitioners for continuing ecto parasite treatment who may suffer patients have with high fever and potential infective tick exposure in the northern part of Turkey.

Acknowledgement

This study was supported by The Scientific Research Council of Ondokuz Mayıs University in Samsun, Turkey (Project number PYO.VET.1901.13.003).

References

- Aktas M, Ozubek S, Altay K, Balkaya I, Utuk AE, Kırbas A, Simsek S, Dumanlı N, (2015). *A molecular and parasitological survey of Hepatozoon canis in domestic dogs in Turkey*. Vet Parasitol. 209(3), 264-267.
- Aktas M, Ozubek S, Ipek DNS, (2013). *Molecular investigations of Hepatozoon species in dogs and developmental stages of Rhipicephalus sanguineus*. Parasitol Res. 112(6), 2381-2385.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, (1990). *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol. 215(3), 403-410.
- Aydin MF, Sevinc F, Sevinc M, (2015). *Molecular detection and characterization of Hepatozoon spp. in dogs from the Central part of Turkey*. Ticks and Tick-borne Diseases. 6(3), 388-392.
- Baneth G, (2011). *Perspectives on canine and feline hepatozoonosis*. Vet Parasitol. 181(1), 3-11.
- Baneth G, Bourdeau P, Bourdoiseau G, Bowman D, Breitschwerdt E, Capelli G, Cardoso L, Dantas-Torres F, Day M, Dedet JP, Dobler G, Ferrer L, Irwin P, Kempf V, Kohn B, Lappin M, Little S, Maggi R, Miro G, Naucke T, Oliva G, Otranto D, Penzhorn B, Pfeiffer M, Roura X, Sainz A, Shaw S, Shin S, Solano-Gallego L, Straubinger R, Traub R, Trees A, Truyen U, Démonceau T, Fitzgerald R, Gatti D, Hostetler J, Kilmer B, Krieger K, Mencke N, Mendao C, Mottier L, Pachnicke S, Rees B, Siebert S, Stanneck D, Tarancon Mingote M, von Simson C, Weston S, (2012). *Vector-Borne Diseases-constant challenge for practicing veterinarians: recommendations from the CVBD World Forum*. Parasites & Vectors, 5, 55-58.
- Baneth G, Vincent-Johnson N, (2005). *Hepatozoonosis*. Shaw SE, Day MJ. eds. Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat. Manson Publishing, London. p. 78-89.
- Düzlü Ö, İnci A, Yıldırım A, Önder Z, Çiloğlu A, (2014). *Köpeklerde kene kaynaklı bazı protozoon ve rikettsial enfeksiyonların real time PCR ile araştırılması ve saptanan izolatların moleküler karakterizasyonları*. Ankara Univ Vet Fak Derg. 61, 275-282.
- Inokuma H, Okuda M, Ohno K, Shimoda K, Onishi T, (2002). *Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a Hepatozoon detected in two Japanese dogs*. Vet Parasitol, 106, 265-271.
- Karagenc TI, Pasa S, Kırılı G, Hosgor M, Bilgic HB, Ozon YH, Atasoy A, Eren H, (2006). *A parasitological, molecular and serological survey of Hepatozoon canis infection in dogs around the Aegean coast of Turkey*. Vet Parasitol. 135(2), 113-119.
- Otranto D, Dantas-Torres F, Weigl S, Latrofa MS, Stanneck D, Decapriaris D, Baneth G, (2011). *Diagnosis of Hepatozoon canis in young dogs by cytology and PCR*. Parasites & Vectors, 4(1), 55.
- Smith TG, (1996). *The genus Hepatozoon (Apicomplexa: Adeleina)*. J Parasitol. 82, 565-585.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, (2011). *MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods*. Mol Biol Evol. 28(10), 2731-2739.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, (1994). *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Res. 22(22), 4673-4680.
- Tuzdil AN, (1933). *Bizde ilk defa görülen bir Hepatozoon canis vakası*. Türk Bay Cem Mec. 13, 35.
- Voyvoda H, Pasa S, Uner A, (2004). *Clinical Hepatozoon canis infection in a dog in Turkey*. J Small Anim Pract. 45(12), 613-617.

The Antioxidant Effects of *Ziziphus Jujuba* on Neurodegeneration

Altuğ K c k g l

Mustafa Kemal University, Veterinary Faculty, Department of Biochemistry, Hatay

Geliş Tarihi / Received: 18.10.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 15.11.2016

Abstract: Oxidative stress has been known to play an important role in the pathogenesis of various neurodegenerative diseases. Dietary polyphenols and other natural antioxidants are the most popular compounds in clinical testing for the elimination of neurodegeneration. It has been demonstrated in recent studies that fruit of *Zizyphus jujuba* possesses several vital biological activities. This study intends to evaluate antioxidant activity of *Zizyphus jujuba* on human glioblastoma cells. Cell survival was quantified by colorimetric viability assay with dose response. Cells were pretreated with 100 μM *Zizyphus jujuba* essential oil for 1h, then 100 μM H_2O_2 was added to the cells for 12 hours. After that, the cell medium were taken after treatment period and replaced with fresh medium. Total oxidant capacity (TOS) and total antioxidant capacity (TAS) levels were estimated using specific colorimetric methods. Oxidative stress index (OSI) was calculated from the ratio of TOS and TAS values. Many researches have been reported that the essential oil from seeds helps to prevent the oxidative stress induced neuronal diseases. The antioxidant potential of *Zizyphus jujuba* may be attributed to the presence of flavonoids and the other constituents present therein. Our data suggested that *Zizyphus jujuba* is effective in preventing H_2O_2 -induced oxidative stress.

Key words: Oxidative stress, Neurodegeneration, *Zizyphus jujuba*

N rodejenerasyonda *Zizyphus Jujuba*'in Antioksidan Etkileri

 zet: Oksidatif stresin çeşitli nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Diyet polifenoller ve diğer doğal antioksidanlar nörodejenerasyonun giderilmesi amacıyla yapılan klinik testlerde en popüler bileşiklerdir. Yapılan güncel çalışmalarda, bir çeşit yemiş olan *Zizyphus jujuba*'nın birçok önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu alışma, insan glioblastoma hücreleri üzerinde *Zizyphus jujuba*'nın antioksidan etkinliğinin araştırılması amaçlamaktadır. Hücre canlılığı, doza bağlı kolorimetrik viyabilite testleri ile belirlenmiştir. Hücreler, 1 saat 100 μM *Zizyphus jujuba*'nın uçucu yağları ile ön-muamele edilip, daha sonra 100 μM H_2O_2 12 saat boyunca hücelere ilave edildi. Uygulamalar sonunda hücre homojenatları uzaklaştırılarak taze besiyeri ile değiştirildi. Total oksidan kapasite (TOS) ve total antioksidan kapasite (TAS) düzeyleri spesifik kolorimetrik yöntemler kullanılarak tayin edilmiştir. Oksidatif stress indeksi (OSI) TOS ve TAS değerlerinin oranlamasıyla elde edilmiştir. Birçok araştırmada doğal bitkilerden elde edilen uçucu yağların oksidatif stress uyarımlı nöronal hastalıkları önlemeye yardımcı oldukları rapor edilmiştir. *Zizyphus jujuba*'nın antioksidan etkinliğinin içerisinde bulunan flavonoidler ve diğer bileşenlere bağlı olduğu düşünülmektedir. Elde edilen veriler göre, *Zizyphus jujuba*'nın H_2O_2 kaynaklı oksidatif stresi önlemede etkili olduğu  ng r lmektedir.

Anahtar kelimeler: Oksidatif stres, N rodejenerasyon, *Zizyphus jujube*

Introduction

Cellular and molecular signaling failure is the main reason for many human disorders and signal transduction defects and the proteins involved in these processes are the mayor elements for neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) [3,23]. It is stated that many factors like environmental, genetic predisposition and abnormal metal metabolism plays a critical role in neurodegeneration [22]. Free radicals catalyzed by redox metals and oxidative stress are

the most important reasons for the development of neurodegeneration [7].

Oxidative stress occurs as a result of the release of reactive oxygen species (ROS) [26]. Free radicals can be produced from endogenous sources, such as from mitochondria, peroxisomes, and inflammatory cell activation and exogenous sources, including environmental agents, pharmaceuticals, and industrial chemicals [19]. Brain is particularly sensitive to free radicals because of having antioxidant enzymes in low concentration and the consumption about 20% of the body's total oxygen [9]. Recent studies have

indicated that ROS causes oxidative stress and programmed cell death in neuronal cells [27].

Herbs contain a wide variety of molecules including phenolic compounds (flavonoids, quinones, tannins etc.), nitrogen compounds (alkaloids, amines), vitamins and terpenoids. These compounds exert strong free radical scavenging and antioxidant properties [2,30]. The nutritional *Ziziphus jujuba* Mill., (ZJ) is a herbal plant used in traditional medicine, belongs to the *Rhamnaceae* family and it is one of the most important *Ziziphus* species [6,14]. Recent phytochemical studies of jujuba fruits have shed some light on their biological effects, such as the anticancer, anti-inflammatory, antiobesity, immunostimulating, antioxidant, hepatoprotective, and gastrointestinal protective activities and inhibition of foam cell formation in macrophages [10].

Herbal medicines are generally low in cost, plentiful, and show very little toxicity or side effects in clinical practice. Therefore, our main objective in this study is to investigate antioxidant effects of essential oil of *Ziziphus Jujuba* fruit on human glioblastoma cells.

Materials and Methods

Human glioblastoma (U87MG) was obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, at 37°C with 5% CO₂. Briefly, cells were plated in 24-well plates (0.4×10^5 cells) and pretreated with 100 µM *Ziziphus jujuba* essential oil for 1h then 100 µM H₂O₂ was added to each well for 12h. After the incubation, the supernatant was replaced by fresh medium.

The cell survival was quantified by the colorimetric MTT (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay [13]. Following incubation period, cell culture at 37°C, 1 ml/well of MTT (5 mg/ml-Sigma) was added to the wells, followed by incubation for an additional 2 h for each experiment time. The viable cells produced a dark blue formazan product, whereas no such staining was formed in the dead cells. The resulting formazan product was solubilized in 1 ml/well of acidic

isopropanol, and absorbance read at 570nm with ELISA reader (µQuant-USA).

The novel total antioxidant status (TAS) and total oxidant status (TOS) assays have been shown to be stable, reliable and sensitive to determine antioxidant and oxidant capacity of the biologic samples, respectively [8]. Total antioxidant level of the sample was calculated according to ABTS (dark blue colored radical) reducing capacity of antioxidants at 660 nm. Results were given as Trolox equivalent (mmol/l) which is a vitamin E analog. Additionally, oxidants in the sample oxidize ferrous-ion chelator complex to ferric ion. Briefly, total oxidant level was measured by colorimetric methods according to absorbance change of formed colored complex at 530 nm. Results were given as H₂O₂ equivalent (µmol/l). OSI was calculated as the ratio of TOS and TAS values.

Statistical analysis

The one-way analysis of variance (ANOVA) and post hoc Duncan tests were performed on the data to examine the differences among groups using the SPSS statistical software package. The results are presented as average ±SE. A value of p<0.05 was considered significant.

Results

We used H₂O₂ treatment in order to model oxidative stress in our cellular system. Effect of H₂O₂ on cell viability were performed by MTT analysis. Viability of U87 cells were decreased straightly in a concentration-dependent manner over the range of 5 to 250 µM following 12 h H₂O₂ treatment. The data showed that 100 µM H₂O₂ (0.190 ± 0.008) killed about 42% of cells at the end of the incubation according to the control group (0.329 ± 0.011) (p<0.05) (Fig. 1A). However, 10 µM ZJ (0.367 ± 0.026) increased the number viable cells by 17% as compared to control group (0.3142 ± 0.010). For this reason 10 µM ZJ was used as a cell protective concentration for further experiments. Treatments utilizing 50 µM and higher concentrations of ZJ decreased cell viability (Fig 1B). Moreover, 10 µM ZJ (0.240 ± 0.017) pre-treatment for 1h prevented 25 % of cell death caused by H₂O₂ (0.193 ± 0.044) (Fig 1C).

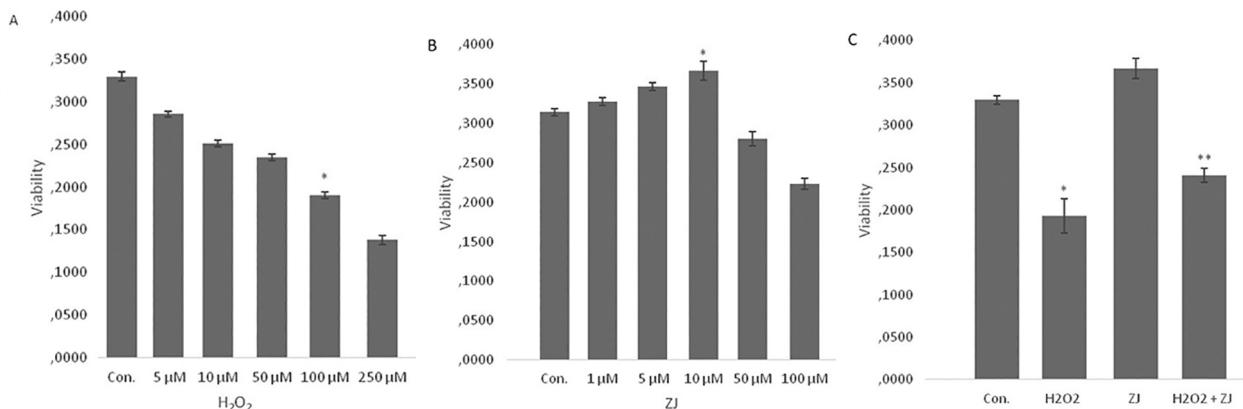


Figure 1. The effect of *Z. Jujuba* on cell viability in hydrogen peroxide induced oxidative stress. A. Dose dependent effect of H_2O_2 on U87 cell viability. B. Dose dependent effect of ZJ in viability. C. Dose dependent protective effect of ZJ on H_2O_2 -induced cytotoxicity in cells. The data is represented as mean \pm SD of five independent experiments. * $p < 0.05$ versus control group. ** $p < 0.05$ versus H_2O_2 group.

Hydrogen peroxide significantly enhanced total oxidant status (TOS) 3.88 times in human glioblastoma cell line U87 ($p < 0.05$). The addition of *Z. jujuba* essential oil pretreatment decreased TOS by 18.67% in only jujuba group and in 13.22% ZJ plus H_2O_2 group against control. The ZJ oil also has important effects (by 6.69%) on ZJ plus H_2O_2 group when compared only group (Table 1). Total antioxidant status levels significantly decreased by

H_2O_2 pretreatment but ZJ oil prevented the situation by 22.93% against control and by 68% against only H_2O_2 group. The antioxidant status of ZJ oil decreased ZJ plus H_2O_2 group. Hydrogen peroxide (3.0 ± 0.300) increased OSI as compared to control group (0.141 ± 0.014) (Table 1). However, ZJ pretreatment (0.142 ± 0.015) significantly recovered this increase in OSI according to only H_2O_2 added group.

Table 1. Effects of CAPE treatment on total oxidant (TOS) and antioxidant (TAS) status in cells exposed to H_2O_2 .

	Control	H_2O_2	ZJ	$H_2O_2 + ZJ$
TOS ($\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ equiv./lt}$)	2.570 ± 0.171	$9.990 \pm 0.267^*$	2.090 ± 0.114	$2.230 \pm 0.153^{**}$
TAS (mmol Trolox equiv./lt)	1.818 ± 0.083	$0.330 \pm 0.056^*$	2.235 ± 0.141	$1.563 \pm 0.182^{**}$
OSI ($\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ equiv./lt}$) / (mmol Trolox equiv./lt x 10)	0.141 ± 0.014	3.0 ± 0.300	0.093 ± 0.010	0.142 ± 0.015

The data are represented as mean \pm SE. * $p < 0.05$ compared to control group; ** $p < 0.05$ compared to H_2O_2 -treated group. The cells were preincubated for 1 h with 10 μM of ZJ then incubated for a further 12 h at 37 $^\circ\text{C}$ in the presence of 100 μM H_2O_2 ($n = 5$). OSI: Oxidative stress index.

Discussion

Hydrogen peroxide can swiftly penetrate the cell membrane, reacting with intracellular metal ions such as iron or copper to form highly toxic hydroxyl

radicals, which cause DNA alteration. Thus, even at lower concentration, H_2O_2 can cause heavy damage to the cultured cells. Some natural antioxidant products may be useful to protect neurons from oxidative injury. Clinically, malignant gliomas are among the least responsive of human tumors and for tumors of higher grades, complete remission and/or long term survival is rare [24]. Kitamura et al., [18] demonstrated that in human A172 cells, hydrogen peroxide (H_2O_2) caused cell death in a time- and concentration-dependent manner, accompanied by nucleosomal DNA fragmentation and chromatin

condensation. Similar to our data obtained from this study, Tavakkoli et al., [29] reported that 75µM H₂O₂ treatment applied to the PC12 neuronal like cells for 1h reduced cell viability significantly and triggered oxidative stress and apoptosis.

Herbal medicine in recent years gained a momentum in the treatment of many diseases, especially cancer and neurodegenerative diseases [4,15]. Phenolic compounds derived from jujuba in have been reported to show beneficial properties in neuronal tissue. Considering that treatment H₂O₂ with results in excess ROS, the present study suggests that oxidative stress may play a critical role in oxidative stress induced neuronal injury [17]. Our results indicated essential oil of jujuba prevented neuronal cell loss induced by H₂O₂. It has been reported in recent studies that although ZJ aqueous extract demonstrated proliferative effect on *in vitro* diabetic neuropathy model of on PC12 cells [15].

Medicinal plants have curative properties due to presence of various complex chemical substances of different composition which contain secondary metabolites such as alkaloids, flavonoids, terpenoids, saponin and phenolic compounds distributed in different parts of the plants. Studies demonstrated that, an indigenous plant possesses terrific medicinal properties, attributed by a diverse group of secondary metabolites. Also *Z. Jujuba* has photo-chemical, pharmacological, medicinal properties and biological activities [5,21]. Gao et al., [10] which studies five variations of *Z. jujuba*, demonstrated the antioxidative and free radical scavenging effect of the this plant. Taatil et al., [28] showed that *Z. jujuba* fruit extract improved spatial memory impairment induced by ethanol, due in part, by its antioxidant activities such as GSH level content. The possible antioxidant activities of extracts were due to the presence of tannins [1], carotenes [11] and flavonoids [25]. Additionally, Chen et al., [4] verified the bidirectional immune-modulatory roles of jujuba by regulating the expressions of pro-inflammatory cytokines in macrophages. Park et al., [24] suggested that *Zizyphus jujuba* Mill var. *Spinosa* prevents N-methyl-d-aspartate (NMDA)-induced neuronal cell damage *in vitro*. Studies also showed that it is used traditionally as tonic and aphrodisiac and sometimes as hypnotic-sedative and anxiolytic,

anticancer, antifungal, antibacterial, antiulcer, anti-inflammatory and wound healing properties [12,20].

In a recent study performed by Chen et al., [4] ZJ extract was found to increase anti-oxidant enzyme levels in cultured astrocytes. In another study of the carbon tetrachloride-induced hepatitis by Kandimalla et al., [16] ZJ was reported to exert antioxidant activity in particular by increasing activities of catalase and superoxide dismutase enzymes and also reducing TBARS level, an important biomarker of lipid peroxidation, significantly.

Conclusion

Ziziphus jujuba is a widely traditionally used and potent medicinal plant amongst all the thousands of medicinal plants. It is an important source of compounds with their chemical structures as well as pharmacological properties. This study may be useful for predicting other medicinal uses and potential drug or food interactions and may be beneficial for people living where the *jujuba* fruits are prevalent and health care resources are scarce.

References

- Adzu B, Amos S, Wambebe C, and Gamaniel K, (2001). *Antinociceptive activity of Ziziphus spina christi root bark extract*. Fitoterapia. 72, 344-350.
- Cai YZ, Sun M, Corke H, (2003). *Antioxidant activity of betalains from plants of the amaranthaceae*. J Agric Food Chem. 51(8), 2288-2294.
- Castellani RJ, Zhu X, Lee HG, Smith MA and Perry G, (2009). "Molecular pathogenesis of Alzheimer's disease: reductionist versus expansionist approaches," International Journal of Molecular Sciences. 10(3), 1386-1406.
- Chen J, Maiwulanjiang M, Lam KY, Zhang WL, Zhan JY, Lam CT, Xu SL, Zhu KY, Yao P, Lau DT, Dong TT, Tsim KW, (2014). *A standardized extract of the fruit of Ziziphus jujuba (Jujuba) induces neuronal differentiation of cultured PC12 cells: a signaling mediated by protein kinase*. A. J Agric Food Chem. 62, 1890-1897.
- Cheng G, Bai Y, Zzhao Y, Tao J, Liu Y, Tu G, Ma L, Liao N, Xu X, (2000). *Flavonoids from Ziziphus jujuba Mill var. Spinosa*. Tetrahedron, 56(45), 8915-8920.
- Choi SH, Ahn JB, Kozukue N, Levin CE, Friedman M, (2011). *Distribution of Free Amino Acids, Flavonoids, Total Phenolics, and Antioxidative Activities of Jujuba (Ziziphus jujuba) Fruits and Seeds Harvested from Plants Grown in Korea*. J Agric Food Chem. 59(12), 6594-6604.
- Emerit J, Edeas M, Bricaire F, (2004). *Neurodegenerative diseases and oxidative stress*. Biomed Pharmacother. 58, 39-46.

8. Erel OA, (2005). *New colorimetric method for measuring total oxidant status*. Clin Biochem. 38(12):1103-11.
9. Floyd RA, Hensley K, (2002). *Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases*. Neurobiol Aging. 23(5), 795-807.
10. Gao QH, Wu PT, Liu JR, Parry JW, Wang M, (2011). *Physico-chemical properties and antioxidant capacity of different jujuba (Ziziphus jujuba Mill.) cultivars grown in loess plateau of China*. Scientia Horticulturae. 130(1), 67-72.
11. Guil-Guerrero JL, Diaz Delgado A, Gonzalez MCM, and Torija Isasa ME, (2004). *Fatty acids and carotenenes in some ber (Ziziphus jujuba mill) varieties*. Plant Foods Hum Nutr, 59, 23-27.
12. Gupta RB, Sharma S, Sharma JR, and Goyal R, (2004). *Study on the physicochemical characters of fruits of some wild and cultivated forms/spp. (Ziziphus spp.)*. Haryana Journal of Horticultural Sciences. 33(3/4), 167-169.
13. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K, (1989). *Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill*. Journal of Immunology Methods. 119, 203-210.
14. Huang YL, Yen GC, Sheu F, Chau CF, (2008). *Effects of water-soluble carbohydrate concentrate from Chinese jujuba on different intestinal and fecal indices*. J Agric Food Chem. 56, 1734-9.
15. Kaeidi A, Taati M, Hajjalizadeh Z, Jahandari F, Rashidipour M, (2015). *Aqueous extract of Zizyphus jujuba fruit attenuates glucose induced neurotoxicity in an in vitro model of diabetic neuropathy*. Iran J Basic Med Sci. 18, 301-306.
16. Kandimalla R, Dash S, Kalita S, Choudhury B, Malampati S, Kalita K, Kalita B, Devi R, Kotoky J, (2016). *Protective Effect of Bioactivity Guided Fractions of Ziziphus jujuba Mill. Root Bark against Hepatic Injury and Chronic Inflammation via Inhibiting Inflammatory Markers and Oxidative Stress*. Front. Pharmacol. 7, 298.
17. Kim MC, Cui FJ, Kim Y, (2013). *Hydrogen Peroxide Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition and Stemness in Human Malignant Mesothelioma Cells*. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 14(6), 3625-3630.
18. Kitamura Y, Ota T, Matsuoka Y, Tooyama I, Kimura H, Shimohama S, Nomura Y, Gebicke-Haerter PJ, Taniguchi T, (1999). *Hydrogen peroxide-induced apoptosis mediated by p53 protein in glial cells*. Glia. 25(2), 154-164.
19. Klaunig JE, Kamendulis LM, (2004). *The role of oxidative stress in carcinogenesis*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 44, 239-67.
20. Kumar S, Ganachari MS, Banappa, V, Nagoor S, (2004). *Anti-inflammatory activity of Ziziphus jujuba Lam leaves extract in rats*. Journal of Natural Remedies, 4(2), 183-185.
21. Mahajan RT, Chopda MZ, (2009). *Phyto-Pharmacology of Ziziphus jujuba Mill-A plant review*. Phcog Rev. 3(6), 320-329.
22. Mark PM, (2004). *Metal-catalyzed disruption of membrane protein and lipid signaling in the pathogenesis of neurodegenerative Disorders*. Ann NY Acad Sci. 1012, 37-50.
23. Mitra A, and Dey B, (2013). *"Therapeutic interventions in Alzheimer disease," in Neurodegenerative Diseases*. InTech, Rijeka, chapter 12, 291-317.
24. Park JH, Lee HJ, Koh SB, Ban JY, (2004). *Protection of NMDA-induced neuronal cell damage by methanol extract of Zizyphi Spinosi Semen in cultured rat cerebellar granule cells*. Journal of Ethnopharmacology, 95 (1), 39-45.
25. Pawlowska AM, Camangi F, Bader A, and Braca A, (2009). *Flavonoids of Zizyphus jujuba L. and Zizyphus spina-christi (L.) wild (Rhamnaceae) fruits*. Food Chem. 112, 858-862.
26. Poon HF, Calabrese V, Scapagnini G, Butterfield DA, (2004). *Free radicals: key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 59(5), 478-93.
27. Salganik RI, (2001). *The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population*. J Am Coll Nutr. 20, 464-72.
28. Taatil M, Alirezaei M, Meshkatsadat MH, Rasouljan B, Moghadasi M, Sheikhzadeh F, Sokhtezari A, (2011). *Protective effects of Ziziphus jujuba fruit extract against ethanol-induced hippocampal oxidative stress and spatial memory impairment in rats*. Journal of Medicinal Plant Research. 5(6), 915-921.
29. Tavakkoli M, Miri R, Jassbi AR, Erfani N, Asadollahi M, Ghasemi M, Saso L, Firuzi O, (2014). *Salvia and Stachys species protect neuronal cells against oxidative stress-induced apoptosis*. Pharm Biol. 52(12), 1550-7.
30. Zheng W, Wang SY, (2001). *Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs*. J Agric Food Chem. 49 (11), 5165-70.

Veteriner Mikrobiyolojide *Salmonella*'nın Tanısında PCR ve Bakteriyolojik Yöntemlerin Meta-Analize Uygunluğunun Belirlenmesi

M. Uğur Nuraloęlu¹, Hakan Yardımcı²

¹Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Rehberlik ve Teftiş Başkanlığı, Ankara

²Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 13.10.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 09.12.2016

Özet: Bu çalışmada, veteriner mikrobiyolojide *Salmonella*'ların tanısında kullanılan bakteriyoloji ve PCR tekniklerine ait sonuçların, tutarlılık yönünden değerlendirilmesi için meta-analiz metodunun kullanılabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, belirlenen “*Salmonella*, veterinary, PCR, cattle, sheep, goat, pig, chicken, horse, poultry” anahtar kelimeleri ile yapılan taramada 1472 kaynağa ulaşıldı. Elektronik kütüphanenin duplikasyonları elemesinden sonra 698 literatür ayrıca mikrobiyoloji alanında iki uzman tarafından da bağımsız şekilde okunarak, hala duplikasyon olan ve İngilizce olmayan yayınlar ile kitap, kitapta bölüm ve derleme olarak yer alanların yanı sıra, *Salmonella* dışında çalışılmış olan makaleler ve deneysel çalışmalar elenerek kalan 601 makale, kabul ve ret kriterleri dikkate alınmak suretiyle okundu. Makaleler, çalışmaların yapıldığı hayvan türü, kullanılan numune türü, çalışmada uygulanan PCR tekniği, kültür, makalede araştırılan *Salmonella* türü ve istatistiki yöntem kullanılıp kullanılmaması açısından değerlendirilerek veriler çıkarıldı. Hayvan türünün, kullanılan numune türünün, kültür ve PCR yöntemlerinin çalışmalarda farklı olduğu saptandı. İncelenen ve veri çıkarılan hiçbir makalede de herhangi bir istatistiki yöntem kullanılmadığı belirlendi. Bundan dolayı, elde edilen verilerin herhangi bir tanımlayıcı istatistik yöntemiyle değerlendirilmesi mümkün olmadı. Sonuç olarak, çalışmada değerlendirilen makalelerde hayvan türünün, kullanılan numune türünün, kültür ve PCR yöntemlerinin birbirinden farklı bulunması nedeniyle, verilerin standart yapıda olmadığı saptandı. Bu heterojenlikten dolayı meta-analiz yönteminin, PCR ve bakteriyolojik yöntemlerle elde edilen sonuçların tutarlılığı yönünden karşılaştırılması amacıyla kullanılamayacağı kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Kültür, meta-analiz, PCR, *Salmonella*

Evaluation of Usage Meta-analysis for Diagnosis of *Salmonella* spp. Using PCR and Bacteriological Methods in Veterinary Microbiology

Abstract: In this study, the determination of usage meta-analysis was aimed in regard to consistency of results of bacteriological culture and PCR technics for *Salmonella* spp. diagnosis in veterinary microbiology. For this reason, a total of 1472 sources were reached through internet by using the key words “*Salmonella*, veterinary, PCR, cattle, sheep, goat, pig, chicken, horse, poultry”. Then, after the electronic library eliminated duplications, a total of 698 articles were obtained. The rest of the articles were reviewed again by the two experts from microbiology field independent from each other and any overlooked duplications, non-english articles, reviews, chapters in books were re-eliminated and finally a total of 601 articles were evaluated by the approval and refusal criteria to obtain utilizable data. Articles were evaluated according to the animal species, sample type, PCR technique, species of *Salmonella* and whether or not any given statistical methods used and related data were generated. There were differences in animal species, samples types and PCR and culture techniques. None of the articles that were examined included any relevant statistical method. Therefore, it was not possible to evaluate the obtained data by descriptive statistical methods. In conclusion, it was determined that the data were not standard because the evaluated articles in this study were different in related to animal species, sample types and materials and methods used in these articles. Because of the heterogeneity in these data, it was thought that meta-analysis could not be used for comparison PCR and bacteriological methods because of lack of consistency of the obtained results.

Key words: Culture, meta-analysis, PCR, *Salmonella* spp.

Giriş

Bilimsel araştırmalarda, ilgilenilen bir problem için yapılan tek bir deney araştırmacılar tarafından yeterli görülmez. Bu nedenle, merak edilen konu

üzerinde birden çok deney yaparak bu çalışma sonuçlarından bilgi birikimi sağlanması bilimin temelini oluştırmaktadır [11]. Araştırmacılar, aynı konuda yapılan deneylerin tekrarlanması sonucunda, elde

edilen sonuçların nasıl birleştirileceği problemi ile karşılaşmışlardır [10].

Meta-analiz, aynı konuda değişik yer, zaman ve merkezlerde yapılmış olan araştırma sonuçlarını niteliksel ve niceliksel olarak birleştirmede kullanılan istatistik yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır [1,12,22]. İnsan hekimliğinde uygulanan meta-analiz ile ilgili Türkiye’de ve dünyada çeşitli çalışmalar yapıldığı bildirilmiştir [1]. Veteriner hekimlik alanında ise halen dünyada uygulanmaya devam edilirken henüz Türkiye’de çok sınırlı sayıda uygulanmış istatistiksel bir metot olması dikkat çekicidir.

Herhangi bir soruna yönelik epidemiyolojik ve/veya klinik tıpta, meta-analiz çalışması yapmaya karar verilmesinin ardından öncelikle, o konuya ilişkin literatür araştırması yapılır, ardından kabul ve ret kriterleri belirlenir ve uzmanlar tarafından fikir birliğine varılarak veriler toplanır. Bu adımlardan sonra, üzerinde çalışılan soruna yönelik, öncelikle bulunan çalışmaların niteliksel olarak inceleme aşaması gerçekteştirilir. Bu ara adım tamamlandıktan sonra, uygun çalışmalara niceliksel meta-analiz yöntemlerinden biri ancak uygulanabilir [1,5,8]. Meta-analiz; tanımlamak, tahmin etmek, sentezlemek ve ilişkili bulguları birleştirerek araştırma hakkında bir sonuca varmak için sistematik bir yaklaşımdır [19]. Meta-analizin yürütülmesine ilişkin tek bir yol mevcut değildir. Ancak bir meta-analizde mutlak olan, iyi organize edilmiş bir çalışmayı gerektirmesidir [18]. Genel olarak yapılması gereken adımlar şunlardır: Problemin Tanımlanması, Veri Toplanması ve İşlenmesi, Analiz, Raporlama.

Salmonellozis ise; *Enterobacteriaceae* familiesinde bulunan *Salmonella* genusuna ait bakteriler tarafından oluşturulan perakut septisemi, akut ve kronik enteritis ile karakterize zoonotik bir enfeksiyondur [13]. *Salmonella*’lar, genellikle doku ya da vücut sıvıları ile dışkıdan hazırlanan kültürlerden mikrobiyolojik muayenelerle tespit edilebilirler [17]. *Salmonella* etkenlerinin konvansiyonel tekniklerle teşhisi etkenin besi yerlerinde üretilmesi, biyokimyasal ve serolojik testlere dayanmakta olup; tüm bu işlemlerin tamamlanması en azından iki hafta gibi uzun bir süre almaktadır. Etkenin saptanabilmesi amacıyla FA (Floresan Antikor), aglütinasyon, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) testlerinden de yararlanılmaktadır. Ancak bu testlerin spesifiteleri aynı antijenik determinan-

ta sahip olan diğer bakterilerin de saptanabilmeleri gibi nedenlerle sınırlıdır ve bu yüzden hatalı pozitif reaksiyonlar da görülebilir. Bununla birlikte, özgül genlerin amplifikasyonu temeline dayanan PCR (Polimerase Chain Reaction - Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yoluyla teşhis serolojik testlere göre daha kesin, daha güvenilir ve daha hızlı olmaktadır [16,17]. *Salmonella* tanısında PCR’ın bakteriyolojiye göre daha etkin olduğunu saptayan araştırmalar mevcuttur [15]. Öte yandan, *Salmonella* tanısında PCR’ın bakteriyolojiye göre daha etkin olduğunu belirten çalışmalar yanında bakteriyolojinin daha duyarlı olduğunu saptayan araştırmalar da bulunmaktadır [3]. PCR ve bakteriyolojinin birbirine üstünlüklerinin yanı sıra, sonuçlarının aynı şekilde rapor edildiği çalışmalar da mevcuttur [7,9].

Bu çalışmada, veteriner mikrobiyolojide *Salmonella*’ların tanısında kullanılan bakteriyoloji ve PCR tekniklerine ait sonuçların, tutarlılık yönünden değerlendirilmesi için meta-analiz metodunun kullanılabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

1. Meta-analiz uygulanacak konu

Bu çalışmada, “Veteriner mikrobiyolojide *Salmonella*’ların tanısında kullanılan bakteriyoloji ve PCR teknikleri ile elde edilen sonuçların tutarlılık yönünden incelenmesi için meta-analiz metodunun kullanılabilirliğinin saptanması” konu olarak belirlenmiştir.

2. Konuyla ilgili literatürlerin araştırılması

Çalışma amacıyla belirlenen konu hakkında yapılmış çalışmaların saptanması için Ankara Üniversitesi Kütüphanesi’nin üyesi olduğu veri tabanları; PubMed, Science Direct, ISI Web of Knowledge, Proquest, Summon ve Taylor and Francis kullanıldı. Bu problem için “*Salmonella*, veterinary, PCR, cattle, sheep, goat, pig, chicken, horse, poultry” anahtar kelimeleri değişik kombinasyonlar halinde veri tabanlarında araştırıldı [6,14].

3. Kabul ve ret kriterlerini belirlemek

Belirlenen literatürler, kitap ve/veya bölümleri, İngilizce olmayan literatürler, derleme ve tekrarlar mikrobiyoloji alanında ayrıca iki uzman tarafından da bağımsız şekilde değerlendirilerek ayıklandıktan sonra kalan literatürler sistematik derleme ve me-

ta-analiz için değerlendirilmeye tabi tutuldu. Bu literatürler ayıklandıktan sonra, makaleler ayrıca yine bahse konu iki uzman tarafından da bağımsız şekilde okunarak, hem kültür hem de PCR tekniğinin kullanıldığı araştırmalar, hayvanın türü, numune türü ve sayısı, PCR tekniği, araştırılan etken türü ve kullanılan istatistiki yöntem açısından değerlendirmeye alındı [1,6,8,14].

4. Verinin toplanması

Ayıklandıktan sonra okumaya alınan makaleler araştırmanın yapıldığı hayvan türü, kullanılan numune türü ve sayısı, araştırılan etkeninin türü, istatistiki yöntem kullanılıp kullanılmaması, kullanıldı ise hangi yöntemin kullanıldığı ve çalışmanın yapıldığı yıl açısından değerlendirildi ve elde edilen veriler excel programında hazırlanan çizelgeye işlendi [4].

5. İstatistiksel değerlendirme

Elde edilen verilerin değerlendirilmesi amacıyla Comprehensive Meta-Analysis (CMA) paket bilgisayar programı kullanılması planlandı [4].

Bulgular

1. Konuyla ilgili literatürlerin araştırılması

Çalışmada belirlenen “*Salmonella*, veterinary, PCR, cattle, sheep, goat, pig, chicken, horse, poultry” anahtar kelimeleri kullanılarak yapılan taramada 1472 kaynağa ulaşıldı. Elektronik kütüphanenin duplikasyonları elemesinden sonra 698 literatür kaldı. Bu makalelerin de özetleri okunarak hala duplikasyon olan yayınlar (64 makale) ayıklandı ve bu ayıklamadan sonra İngilizce olmayan yayınlar (12 makale) ile kitap, kitapta bölüm ve derleme olarak (9 makale) yer alanların yanı sıra, *Salmonella* dışında çalışılmış olan makaleler (7 makale) ve deneysel çalışmalar (5 makale) elendikten sonra kalan 601 makale elde edildi.

2. Kabul ve ret kriterleri

Makaleler, çalışmaların yapıldığı hayvan türü, kullanılan numune türü, çalışmada uygulanan PCR tekniği ve makalede araştırılan *Salmonella* türü açısından değerlendirilerek veriler çıkarıldı.

3. Elde edilen veriler

Veriler ayrıntılı olarak incelendiğinde; tavuklarda yapılan ve çalışmada kullanılabilir veriler içeren

3 makalenin 2’si piliç etinde yapılırken 1’i de piliç bağırsak örneği kloakal svab çöp örneği sürme svab civciv toz örneği kullanılarak yapılmıştır.

Numune örneğine göre verilerin detayları incelendiğinde; 2 çalışmanın buzağılarda, 1 çalışmanın sığır, 1 çalışmanın da köpeklerde yapıldığı görüldü.

Çalışmalarda kullanılan PCR tekniğine göre veriler incelendiğinde; 9 çalışmada klasik PCR tekniği kullanılırken diğer PCR yöntemlerinin kullanıldığı birer çalışma olduğu, klasik PCR tekniğinin kullanıldığı çalışmaların 2’sinin tavuklarda ve piliç etinden, diğerlerinin ise psittasin kuşlarda, koyunda, et-süt ürünlerinde, buzağıda, deve, midyede ve kremada çalışılmış birer araştırma olduğu saptandı.

Salmonella spp. olarak çalışılan 11 makalenin 3 adedi tavuklarda, diğerleri deve, midye, at, psittasin kuşlar, krema, süt, yiyecek, et-süt ürünlerinde yapılan birer adet çalışmaydı. Tavuklarda yapılan 3 çalışmanın 2’si piliç etinde, 1’i de piliç bağırsak örneği kloakal svab çöp örneği sürme svab civciv toz örneği numunelerinde yapılmış bir çalışmaydı.

Bütün literatürlerin incelenmesi sonucunda; sadece tavuklarda yapılan 2 çalışmada piliç etinde kültür ve klasik PCR tekniği kullanılarak *Salmonella* spp. arandığı saptandı.

İncelenen ve veri çıkarılan hiçbir makalede herhangi bir istatistiki yöntem kullanılmadığı belirlendi.

4. İstatistiksel değerlendirme

Elde edilen verilerin herhangi bir tanımlayıcı istatistik yöntemiyle değerlendirilmesi mümkün olmadı.

Tartışma ve Sonuç

Türkiye’de ve dünyada insan hekimliğinde sistematik derleme ve meta-analiz ile yapılan çok sayıda çalışmalar bulunmaktadır [2]. Veteriner hekimlik alanında ise dünyada yapılan araştırmalar bulunmakla beraber bu alanda Türkiye’de veteriner bilimlerde meta-analizin kullanıldığı çalışmalar sınırlı sayıdadır.

Dünyada ve Türkiye’de veteriner bilimlerde yapılan meta-analiz çalışmalarının çok az kısmının mikrobiyoloji disiplininde yapıldığı görülmektedir. Domuzlarda *Salmonella* türlerinin tanısı için kültür ve PCR tekniklerinin tanısai doğruluğunda materyal

ve metodolojideki farklılıkların etkisini belirlemek için sistematik inceleme, meta-analiz ve meta-regresyon yaklaşım çalışması yapmışlardır. Araştırmacılarca bu alanda yapılan ilk çalışma olduğu bildirilen çalışmada hem kültür, hem de PCR tekniklerinde önemli bir heterojenlik olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle kültür tekniğinde zenginleştirme ısısı, çalışma popülasyonu, agar ve zenginleştirme yöntemlerinin çalışmalarda büyük oranda farklılık gösterdiğini, PCR tekniğinde ise örnek tipi ve çalışma büyüklüğünün farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmada negatif ve pozitif kontrollerin değişkenliği, çalışmaların raporlanmasındaki yetersizlikler, örnek seçme kriterlerinin standart olmayışı gibi nedenlerle yeterli veri elde edemediklerini bildirmişler ve gıda güvenliği ve halk sağlığı araştırmacılarının araştırmalarının yazımı ve yöntemlerde standartlaşmanın sağlanmasını önermişlerdir [21]. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virüsünün çiftlik hayvanlarında varlığı ve atlarda *Tylorella equigenitalis*'in kültür ve PCR metotlarıyla tespitinde sonuçların tutarlılığının incelenmesi olarak belirledikleri iki problem için meta-analiz yöntemi uygulamak istedikleri çalışmada, her iki konuda da meta-analiz uygulanabilecek veriler elde edemediklerini belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu durumun, hayvan türlerinin farklılığı, makalelerde sonuçların bu türlere göre net olarak verilmemesi, etkenlerin türe göre değişmesi, alınan numunelerin, çalışma metotlarının çeşitliliği ve kullanılan istatistik yöntemlerinin çeşitliliği gibi nedenlerden kaynaklandığını, veteriner hekimliği ve hayvan sağlığını ilgilendiren çalışmalarda daha yaygın olarak sistematik derleme ve meta-analiz uygulayabilmek için yayınlanan makalelerde veri elde etmeye yarayacak bir standart oluşturularak yazım yapılmasını önerdiklerini rapor etmişlerdir [2]. Broylar piliçlerde halk sağlığı açısından önemli olan *Salmonella* türlerinin azaltılmasında bazı yem ve su katkı maddelerinin etkinliğini belirlemek için yaptıkları çalışmada metodolojik sağlamlık ve/veya makalelerin yazımlarının çok yetersiz olduğunu belirtmişlerdir [20].

Yapılan bu çalışmada, veteriner mikrobiyolojide *Salmonella*'ların laboratuvar teşhisinde klasik bakteriyolojik yöntem ve PCR tekniği ile elde edilen sonuçların tutarlılık yönünden değerlendirilmesinde meta-analiz metodunun kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlandı. Ancak bu hipotezde de

araştırmacıların bildirimlerine paralel olarak meta-analiz yapılabilecek veriler elde edilemedi. Bunun nedenleri arasında, incelenen çalışmalardaki hayvan türlerinin farklılığı, makalelerde sonuçların hayvan türüne göre net olarak verilmemesi, çalışmalarda incelenen *Salmonella* türlerindeki çeşitlilik, alınan numunelerin çeşitliliği, gerek kültür gerekse PCR protokollerinde farklılıklar ve istatistikî yöntem kullanılıp kullanılmaması ve kullanılmışsa da kullanılan istatistik yöntemlerinin farklı olması sıralanabilir. Bu faktörler de sağlıklı meta-analiz yapmayı sağlayacak verilerin elde edilmesini oldukça zorlaştıran nedenlerdir.

Sonuç olarak; Farklı yer ve zamanlarda yapılmış olan çalışmalardan elde edilen dağınık bilginin bir araya getirilmesi ve yüksek kanıt düzeyinde bilgi elde etmeye olanak veren meta-analiz teknikleri, büyük bir imkan olmakla birlikte her sorunun cevabını verebilen yöntemler de değildir. Diğer araştırma yöntemlerinde karşılaşılabilecek çeşitli kısıtlılıklar meta-analiz çalışmaları için de büyük sorundur. Bu nedenle hem meta-analiz çalışması planlarken, hem de yapılmış bir çalışmayı değerlendirirken bu kısıtlamalar unutulmamalıdır. Yapılan bilimsel çalışmaların birbiriyle benzer olması durumunda indeksli dergilerde orijinal olmadığı gerekçesi ile yayınlanmadığı, bu nedenle de incelenen konudaki yayınlarda bir homojenlik olmadığı saptandı. Materyal ve metot yönünden birbirinden tamamen farklı olan bu çalışmalardan standart verilere ulaşılamadı ve okunan makalelerdeki bu heterojenlik nedeniyle meta-analizde kullanılacak veriler elde edilemedi.

Çalışmalardaki heterojenlikten kaynaklanan nedenlerle standart veriler elde etmeye uygun olmayan kültür ve PCR teknikleri gibi yöntemlerle elde edilen sonuçların tutarlılık yönünden karşılaştırılması amacıyla meta-analiz yönteminin kullanılamayacağı kanısına varıldı.

Bu sonuca göre, araştırmalarda meta-analiz yönteminin kullanılabilmesi için şunlar önerilebilir:

Meta-analiz çalışmasında ilk aşama olan hipotezin oluşturulmasıdır. Bu aşamada meta-analiz yapmaya elverişli standart verilerin elde edilebileceği doğru bir hipotez oluşturulması çok önemlidir. Hipotez oluşturulurken, araştırmacılar kabul ve ret kriterleri için uygun eşiği saptayarak heterojenlikten kaynaklanabilecek sorunları giderebilirler. Sonraki

aşama ise, oldukça zaman alıcı bir süreç olan literatür tarama, değerlendirme ve veri elde etme aşamasıdır. Bu aşamada mümkün olduğunca fazla eş anlamlı anahtar kelime kullanmak birçok araştırmanın elde edilmesini sağlayacaktır. Makalelerde verilen bilgilerin net yazılmaması durumunda yazara ulaşarak veya eldeki veriler ile hesaplamalar yaparak veri elde etmek mümkün olsa da, bu her zaman mümkün olamamaktadır. Bu dönem, çok büyük miktarlarda verilerle uğraşmayı gerektiren bir süreç olduğu için genellikle bir kişinin tek başına üstesinden gelebileceğinden daha fazla iş yükü olması nedeniyle sağlıklı bir meta-analiz çalışmasının bir ekip tarafından gerçekleştirilmesinde büyük yarar vardır.

Ayrıca, yayınlanacak makalelerde meta-analizde kullanılacak verilerin elde edilmesi için makalelerin yazımında belirli standartlar konulmalıdır. Yayınlanan makalelerin bu standartlara uygun olup olmadığını inceleyen, uygun olan makalelere de sistematik derleme ve meta-analiz uygulayarak, yetkili otoritelere sahada kullanılabilir kanıta dayalı sonuçlar sunabilen, veteriner mikrobiyoloji yanında diğer veteriner bilimlerini de kapsayan kurumsal bir yapı oluşturulması faydalı olacaktır.

Teşekkür

Bu makale, aynı isimli doktora tez çalışmasından hazırlanmış olup, buna temel teşkil eden doktora tezimin, "Gereç ve Yöntem"i gereği elde edilen literatürlerin değerlendirilerek ayıklanmasında uzman olarak emeği geçen Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Oktay Keskin ve Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Neval Berrin Arserim'e teşekkür ederim.

Kaynaklar

- Akçıl M, Karaağaoğlu E, (2001). *Tıpta Meta Analizi*. Hacettepe Tıp Dergisi. 32(2), 184-190.
- Arserim NB, Keskin O, (2012). *Veteriner Epidemiyoloji'de Sistematik Derleme ve Meta-analizi*. Dicle Üniv Vet Fak Derg. 2(1), 37-39.
- Carli KT, Unal CB, Caner V, Eyigor A, (2001). Detection of Salmonellae in chicken faces by a combination of tetrathionate broth enrichment, capillary PCR, and capillary gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*. 39, 1871- 1876.
- Çarkungöz E, (2010). *Meta Analizin Veteriner Hekimlikte Uygulanması*. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyoistatistik Anabilim Dalı, Bursa.
- Egger M, Smith GD, Phillips AN, (1997). *Meta- Analysis: Principles and Procedures*. British Medical Journal. 315, 1533-1537.
- Egger M, Smith GD, Altman DG, eds., (2001). *Systematic Reviews In Health Care: Meta-Analysis In Context*. Second edition. BMJ Publishing Group, p.1-487.
- Eyigor A, Carli KT, (2003). Rapid detection of Salmonella from poultry by real-time polymerase chain reaction with fluorescent hybridization probes. *Avian Diseases*. 47, 380-386.
- Fisher M, Friedman SB, Strauss B, (1994). The Effects of Blinding on Acceptance of Research Papers by Peer Review. *JAMA*. 272(2), 143-146.
- Gouws PA, Visser M, Brözel VS, (1998). A polymerase chain reaction procedure for the detection of Salmonella spp. within 24 hours. *Journal of Food Protection*. 61, 1039-1042.
- Hedges L, Olkin I, (1985). *Statistical methods for meta-analysis*. Academic Press, New York. p.224-236.
- Hunter J, Schmidt FL, Jackson GB, (1982). *Meta-Analysis: Cumulating research findings across studies*. Sage Publication, California. p.56-62.
- Hunter JE, Schmidt FL, (1990). *Methods of Meta-Analysis Correcting Error and Bias in Research Findings*. The Publisher of Professional Social Science, Newbury Park, London, New Delhi.
- İzgür M, (2006). *Enterobakteri İnfeksiyonları (Enterobacteriaceae)*. Aydın N, Paracıkoğlu J. eds. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). İlke-Emek Yayınları, Ankara. p.109-127.
- Leandro G, (2005). Meta-analysis in medical research : the handbook for the understanding and practice of meta-analysis. First published. Blackwell Publishing, Massachusetts, USA. p.1-98.
- Oliveira SD, Santos LR, Schuch DMT, Silva AB, Salle CTP, Canal CW, (2002). *Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR*. *Veterinary Microbiology*. 87, 25-35.
- Ridge SE, Harkin JT, Badman RT, Mellor AM, Larsen JWA, (1995). *Johne's disease in alpacas (Lama pacos) in Australia*. *Aust. Vet. J.* 72, 150-153.
- Rodriguez JM, (1997). Detection of pathogens by using the Polymerase Chain Reaction(PCR). *Vet. Journal*. 153, 287-305.
- Shelby LB, Vaske JJ, (2008). Understanding Meta-Analysis: A Review of the Methodological Literature. *Leisure Sciences*. 30(2), 96-110.
- Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, (2000). *Meta Analysis of Observational Studies in Epidemiology*. *JAMA*. 283(15), 2008-2012.
- Totton SC, Farrar AM, Wilkins W, Bucher O, Waddell LA, Wilhelm BJ, Mcewen SA, Rajić A, (2012). The effectiveness of selected feed and water additives for reducing Salmonella spp. of public health importance in broiler chickens: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression approach. *Prev Vet Med*. 106(3-4), 197-213.
- Wilkins W, Rajić A, Parker S, Waddell L, Sanchez J, Sargeant J, Waldner C, (2010). *Examining heterogeneity in the diagnostic accuracy of culture and PCR for Salmonella spp. in swine: a systematic review/meta-regression approach*. *Zoonoses And Public Health*. 57(1), 121-34.
- Wolf FM, (1986). *Meta-Analysis : Quantitative Methods for Research Synthesis*. Series: Quantitative Applications in the Social Sciences. Sage Publications, California. 3, 7-59.

Probiyotikler: Genel Özellikleri ve Güvenilirlikleri

Yağmur Koçak, Arzu Fındık, Alper Çiftçi

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

Geliş Tarihi / Received: 08.08.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 09.10.2016

Özet: Bu derlemede hayvan ve insan sağlığında antibiyotiklere alternatif olarak kullanılmakta olan probiyotiklerin etkileri ve güvenilirlikleri ile beraber probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar ve bu mikroorganizmalarda aranan özellikler hakkında bilgi verilmiştir.

Anahtar kelimeler: probiyotik, laktik asit bakterileri, güvenilirlik

Probiotics: General Features and Safety

Abstract: The effects and reliabilities of probiotics used in animal and human health as an alternative for antibiotics along with the microorganism used as a probiotics and the features of these microorganisms were reported in this review.

Key words: probiotic, lactic acid bacteria, reliability

Giriş

Probiyotik terimi “canlı için” (Latince “pro” ve “bios”) anlamına gelmektedir. Güncel araştırmalar ve kullanım alanlarına bağlı olarak probiyotikler, kalitatif veya kantitatif olarak bağırsak mikroflorasını etkileyen veya immun sistemin durumunu değiştirerek yararlı etkilerini tetikleyen, insan ve hayvanlar tarafından tüketilen canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadır [8]. Probiyotikler hakkındaki ilk çalışma 19. yüzyılın sonlarında, “probiyotiklerin isim babası” olarak anılan Nobel ödüllü Rus bilim adamı Elie Metchnikoff tarafından yapılmıştır. Metchnikoff fermente süt tüketimi ile uzun ömür arasında ilişki kurmuş ve sütte probiyotiklerin (laktik asit bakterilerinin) varlığını tespit etmiştir.

Prebiyotik terimi Gibson ve Roberfroid tarafından, “kolon bakterilerinden birinin veya az bir kısmının çoğalması ve/veya aktivitesini etkileyerek yararlı bir etki oluşturan sindirilmeyen gıda maddesi” olarak tanımlanmış olup, “fonksiyonel gıda” ya da “nutrasotikler” olarak da adlandırılmaktadırlar [9,25]. Prebiyotikler, insan ve hayvan sağlığında kullanılabilen ve kolon bakterilerine olumlu yönde etki yapan karbonhidratlardır.

Sinbiyotikler, probiyotik ve prebiyotikleri bir arada içeren gıda/besin veya katkı maddeleri olarak

tanımlanmakta olup, probiyotik ve prebiyotiklerin sinerjik etkisi göz önüne alınarak geliştirilmişlerdir [3,9].

Laktik asit bakterileri probiyotik olarak en çok kullanılan mikroorganizmalar olup, sınıflandırmada 6 grup olarak (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Leuconostoc* spp., ve *Pediococcus* spp.) değerlendirilmektedirler [27]. Ayrıca, *Bacillus*, *Saccharomyces* ve *Aspergillus* türleri de probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar arasında bildirilmektedir.

Laktobasiller fakültatif anaerobik olup pH 3,0'e kadar tolerans gösterir, böylece düşük mide pH'sında canlılıklarını koruyarak, bağırsak kanalına geçip etkilerini burada gerçekleştirirler. Duodenumda safra tuzlarından etkilenmezler. Ayrıca, pek çok *Lactobacillus* suşu 45-48°C gibi yüksek ısı ve basınca nispeten dayanıklı olduğundan yem yapım işlemleri sırasında ısı ve basınçtan etkilenmeyerek canlılıklarını koruyabilir [10].

Enterokoklar, fakültatif anaerobik, 10°C ve 45°C'de, pH 9,6'da, % 6,5 NaCl' de % 40 safra tuzunda gelişebilen bakterilerdir. *E. faecium* ve *E. faecalis*, bağırsak hastalıklarındaki etkileri nedeniyle probiyotik olarak kullanılmaktadır. Probiyotik olarak kullanımları bakteriyosin üretimine dayanmakta

olup, patojen mikroorganizmalara direnç gen aktarımı ihtimalleri nedeniyle kullanımları sorgulanmaktadır [19].

Bifidobakteriler, insan ve hayvanların bağırsak florasında ve kanalizasyon sularında bulunurlar. İshal vakalarında, immun uyarım için, anti-mutajen ve antikolesterojenik olarak kullanılırlar. Ayrıca vitamin sentezinde de aktiftirler [19].

Mikroorganizmaların probiyotik özellikleri

Probiyotik olarak kullanılacak olan mikroorganizmaların verildiği canlılarda bulunan diğer mikroorganizmalara karşı etkili olmaları ve konakçıya yararları etki göstermeleri en önemli özellikleridir. Bunların yanı sıra probiyotik olarak kullanılması düşünülen mikroorganizmaların diğer bazı özellikleri de bulundurma gerektirir. Probiyotiklerin insan ve hayvanda yan etki oluşturmamaları ve dolayısı ile güvenilir olmaları beklenmektedir. Dolayısı ile bu mikroorganizmalar patojenik olmamalı ve toksin üretmemelidir. Ayrıca, aktarılabılır antibiyotik direnç genleri içermemeleri de barsak florası için önemlidir. Probiyotik mikroorganizmaların stabilitesi yüksek olmalı ve düşük pH ve safra tuzları gibi olumsuz çevre koşullarından etkilenmeden bağırsakta metabolize olmalıdır. Verildikleri canlıların bağırsak hücrelerine adheze ve kolonize olabilmelidir. Probiyotik mikroorganizmaların ürettikleri antimikrobiyel maddeler vasıtasıyla patojen bakterilere karşı antagonistik etki göstermeleri gerekmektedir. Antibiyotiklere dirençli olmalıdır ve bağırsakta gelişen hastalıkların tedavisi için kullanılan antibiyotiklerden etkilenmemelidir. Bu özellikleri nedeniyle de antibiyotik kullanımına bağlı olarak şekillenebilen diyare gibi semptomlar gösteren hastalıklarda bağırsak florasını düzenlemek amacı ile kullanılmaktadır. Canlı hücreler halinde ve tercihen fazla sayıda bulunmalı ve bağırsak ortamında canlı kalarak metabolize edilebilmelidir. Probiyotiklerin birden fazla mikroorganizma içeren karışımların hazırlanmasına uygun olmaları ve üretim ve depolama işlemleri sırasında canlılığını ve aktivitesini korumaları istenmektedir [5,30,31].

Probiyotiklerin etkileri

Probiyotiklerin rasyona katılmaları sonucunda hayvanlarda canlı ağırlık artışının olduğu, yem-

den yararlanmanın iyileştiği, üretimin yükseldiği, gastrointestinal hastalıkların azaldığı gözlenmesine rağmen etki şekilleri konusunda halen belirsizlikler bulunmaktadır.

Patojen bakterilerin sayısını azaltma: Probiyotik mikroorganizmalar, *E. coli* gibi diğer enteropatogenler için istenmeyen bir ortam oluşturup, bu grup mikroorganizmalara karşı antagonistik etki oluştururlar. Probiyotik mikroorganizmaların çoğunluğu, başta laktik asit olmak üzere, asetik ve formik asit gibi organik asitler üreterek bağırsak pH'sını düşürürler. Böylece Gram negatif patojen bakterilerin üremesini engelleyen bir ortam oluştururlar [28].

Probiyotik suşlar hidrojen peroksit, organik asit, bakteriyosin gibi etken maddeler sayesinde antibakteriyel özellik gösterirler [20].

Probiyotik bakteriler tarafından üretilen Gram negatif ve pozitif bakteriler ile mantarlara karşı geniş spektrumlu antibakteriyel etki gösteren bileşikler bildirilmiştir [6, 13].

Besin elementleri için rekabet: Probiyotikler, patojen bakterilerin çoğalmak için gereksinim duydukları besinleri tüketirler ve bu bakterilerin üremelerini inhibe ederler [2].

Adezyon mekanizması: Probiyotiklerin intestinal sistemde patojen mikroorganizmalara karşı bir bariyer oluşturmak suretiyle bu mikroorganizmaların epitelyal hücrelere adheze olmasını engellediği düşünülmektedir.

Laktik asit bakterilerinin intestinal epitel hücrelere adezyonu çeşitli yüzey determinantları (elektrostatik ilişkiler, hidrofobisite, sterik kuvvetler, lektinler, lipoteikoik asit, vb.) ile gerçekleştirilir [26].

Toksin ve patojenlerin bağlanması engellenmesi, mün gibi konak faktörlerin uyarımı ya da reseptörlere kompetitif bağlanma gibi mekanizmalar bildirilmesine rağmen, inhibisyon mekanizması henüz tam olarak açıklık kazanmamıştır [21].

İmmun sistem üzerine etki: Probiyotiklerin son yıllarda ortaya atılan önemli etkileri "immunos-timulan" etkileridir. İntestinal epitel hücreleri, kan lökositleri, B ve T lenfositleri ve immün sistemin yardımcı hücrelerinin tamamı probiyotiklerden etkilenir. İmmunomodülatör özelliğe sahip bakteriyel ürünler arasında endotoksik lipopolisakkaridler,

peptidoglikanlar ve lipoteikoik asitler yer almaktadır. Gram pozitif bakterilerin, lipoteikoik asitleri epitel hücre membranlarına yüksek affinite gösterirken aynı zamanda diğer antijenler için taşıyıcı rol de oynayabilir ve immün cevabı uyacakları hedef dokulara bağlar.

Probiyotikler, proinflatuar sitokinlerin ve kemokinlerin üretilmesinde anahtar rol oynamaktadır [24].

Probiyotiklerin bulunması, mukozal immün sistemde, antikor üretimini artırmak, fagositoz ve NK hücrelerinin aktivitesini artırmak ve T hücre apoptozisini indüklemek gibi birçok modifikasyonlara neden olur [14].

Antikarsinojenik etki: Beslenmenin kanser oluşumunda önemli bir etken olduğu bilinmekte olup, probiyotik mikroorganizmaların beslenmede kullanımının kanser riskini azaltabildiği bildirilmiştir [12,29]. Probiyotik mikroorganizmaların başta bağırsaklar olmak üzere diğer organlarda mutajenik etkileri engellemesi nedeniyle antikarsinojenik etkileri olduğu ortaya konulmuştur [23].

Antikolestrol etki: Probiyotik bakterilerin safra tuzlarını serbest asitlere parçalamaları ve intestinal sistemden hızlı bir şekilde uzaklaştırmak suretiyle serum kolesterolünün düşürülmesinde etkili olduğu düşünülmektedir. Kolesterolün düşürülmesinde 2 mekanizmanın etkili olduğu bildirilmektedir. Bildirilen ilk mekanizmada serbest safra tuzlarının vücuttan atılması ve kolesterolden yeni safra asitlerinin sentezinin azaltılması ile total kolesterol seviyesinin düşürülebileceği bildirilmektedir. Diğer bir görüşe göre, probiyotik bakterileri tarafından üretilen asitler pH'yı düşürmekte ve dekonjuge safra tuzları da kolesterolün presipitasyonuna neden olmaktadır.

Antibiyotik ilişkili diyareler üzerine etkileri: Oral yolla alınan antibiyotikler patojen mikroorganizmalar ile beraber barsak florasında bulunan yararlı bakterilere de etki gösterirler ve buna bağlı olarak antibiyotiğe bağlı diyare şekillenebilir [11]. Ağız yoluyla vücuda alınan mikroorganizmaların gastrointestinal sistemden geçişleri sırasında canlılıklarını korumalarını engelleyen stres faktörlerinden biri antibiyotiklerdir. Probiyotik bakteriler ve bu bakterilerin kullanılmasıyla hazırlanan ürünler bağırsak sisteminde antibiyotik kullanımına bağlı

olarak oluşan kolitlerin iyileştirilmesinde kullanılabilmektedir [17].

Besin sentezi ve biyoyararlanım: Probiyotik mikroorganizmalar lipaz, proteaz, amilaz, beta-glukanaz gibi yemlerin sindirimine yardımcı olan enzimler salgılayarak ve B grubu vitaminler (niasin, biotin, pridoksin, pantotenik asit, folik asit, riboflavin, B12) sentezleyerek sindirime katkıda bulunurlar [7,15].

Probiyotiklerin güvenilirlikleri

Günümüzde ticari probiyotik ürünler hakkındaki mevcut bilgiler bu ürünlerin güvenilir olduklarını göstermektedir [18,22]. Bununla birlikte, potansiyel yeni cins ve türlerin probiyotik ürün oluşturmak amacıyla seçiminde, Avrupa Birliği tarafından önerilen zorunlu güvenlik kriterlerine dikkat edilmesi gerekmektedir. Probiyotik ürünlerin güvenilirliğinde, üretilen gıdanın fenotipik ve genotipik özellikleri ile bu mikroorganizmaların gıdalarda kullanımının geçmişinde elde bulunan veriler temel kriterler olarak değerlendirilmektedir [1,32].

Avrupa Birliği ülkelerinde probiyotiklerin güvenilirliği ve teknolojik özellikleri çok geniş kapsamlı iki projede araştırılmıştır. "Nordic projesi" ve Prodemo (FAIR CT96-1028) projesi [16].

Genel olarak probiyotiklerin güvenilirliği konusunda göz önünde tutulması gereken kriterler şu şekilde özetlenmektedir:

1. Üretici firma ürettiği gıdanın güvenilirliğinden birinci derece sorumludur. Probiyotik gıdalar en az diğer gıdalar kadar güvenilir olmalıdır.
2. Probiyotik mikroorganizmalar yeni bir ürün oluşumunda kullanılacakları zaman yasal olarak onaylanmış olmaları gerekmektedir.
3. Bir suş probiyotik olarak uzun zamandır güvenilir bir şekilde kullanılıyorsa, gıda üretiminde ilk defa kullanılacak yeni suşlarla aynı işleme tabi tutulmaz.
4. Hiçbir suşu patojen olarak belirlenmemiş olan mikroorganizmalar ile uzun yıllardır probiyotik olarak güvenle kullanılan suşlar probiyotik üretiminde güvenilir kabul edilmekte ve yeni ürün üretiminde kullanımına izin verilmektedir.

5. Hiçbir suşu patojen olarak belirlenmemiş ama güvenilir bir kullanım geçmişi olmayan suşlar probiyotik üretiminde kullanılabilir. Ancak bunların yeni ürün oluşumunda ilk defa izole edilen suşlarla aynı işlemi görmesi gerekmektedir.

6. Probiyotik potansiyeli olan suş, patojenik suşları da olduğu bilinen bir türe ait ise yeni bir ürün üretiminde kullanılmadan önce çok iyi incelenmelidir.

7. Antibiyotik direnç genleri taşıyıp aktarabilen suşlar probiyotik olarak değerlendirilmemelidir.

8. Güvenilir bir probiyotik seçiminde belki de en önemli kriter, suşun kesin olarak tanımlanmış olmasıdır. Bu amaçla günümüzde DNA-DNA hibridizasyon teknikleri veya 16S rRNA dizi analiz teknikleri kullanılmaktadır. Taksonomik analizleri gelişmiş yöntemler kullanılarak tanıları doğru bir şekilde yapılmayan suşlar probiyotik olarak kesinlikle satılmamalıdır [4,32].

Sonuç

Hayvan ve insan sağlığında farklı etki şekillerine bağlı olarak probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotikler birçok fayda sağlamaktadır. Probiyotiklerin akut bir hastalığın tedavisinde antibiyotiklerin yerini alması düşünülmese de koruyucu tedavide antibiyotiklere alternatif olarak kullanımı mümkündür. Gelecekte özellikle hayvan sağlığında bunların kullanımının daha yaygın hale gelmesi sonucunda verim artışının sağlanması muhtemeldir. Dolayısıyla, probiyotiklerin yeme katılması ve depolanması esnasında canlılıklarının korunmasının sağlanması, diğer katkı maddeleri ile birlikte kullanılma olasılıklarının araştırılması ve bu araştırma sonuçlarının pratiğe aktarılmasının ülkemiz hayvancılığının daha sağlıklı ve güvenilir olması için önemli olduğu düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Başyigit G, (2004). *Bazı laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak kullanılma özellikleri*. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 96s, Isparta.
2. Castagliuolo LM, Riegler MF, Valenick I, La Mont JT, Pathoulakis C, (1999). *Saccharomyces boulardii*; protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect Immun*. 67, 302-307.

3. Douglas LC, Sanders ME, (2008). *Probiotics and prebiotics in dietetics practice*. *J Am Dietetic Assoc*. 108, 510-521.
4. Dunne C, Murphy L, Flynn S, O'Mahony L, O'Halloran S, Feeney M, Morrissey D, Thornton G, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, Quigley EMM, O' Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK, (1999). *Probiotics: From myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76, 279-292.
5. Ezema C, (2013). *Probiotics in animal production: A review*. *J Vet Med Anim Health*. 5(11), 308-316.
6. Fox SM, (1988). *Probiotics: intestinal inoculants for production animals*. *Vet Med*. 83, 806-830.
7. Fuller R, (1989). *A review. Probiotics in man and animals*. *J Appl Bacteriol*. 66, 365-378.
8. Fuller R, (2004). *Reasons for the apparent variation in the probiotic response*. *Biologist*. 51(4), 232.
9. Gibson GR, Roberfroid M, (1995). *Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics*. *J Nutr*. 125, 1401-1412.
10. Gilliland SE, (1984). *Importance of bile tolerance of Lactobacillus acidophilus used as a dietary*. *J Dairy Sci*. 67, 3045-3051.
11. Gönç S, Akalın A, (1995). *Yoğurtta canlı olarak bulunan Lactobacillus acidophilus ve Lactobacillus bifidus'un organizma ve sağlık üzerine etkisi*. İzmir, Proje No: VHAG-1168.
12. Hirayama K, Rafter J, (1999). *The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention: mechanistic considerations*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76, 391- 394.
13. Kim CJ, Namkung H, An MS, Paik IK, (1988). *Supplementation of probiotics to the broiler diets containing moldy corn*. *Korean J Anim Sci*. 30, 542-548.
14. Kognoff MF, (1993). *Immunology of the intestinal tract*. *Gastroenterol*. 105, 1275-1280.
15. Kung L, (1990). *Microbes and enzymes*. *Feed Int*. 11(8), 10-16.
16. Leroy F, deVuyst L, (2004). *Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry*. *Trend Food Sci Technol*. 15, 67-78
17. Marteau P, Minekus M, Havenoer R, Veld JHJ, (1997). *Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: Validation and the effects of bile*. *J Dairy Sci*. 80, 1031-1037.
18. Mattila-Sandholm T, Matto J, Saarela M, (1999). *Lactic acid bacteria with health claims- interactions and interference with gastrointestinal flora*. *Int Dairy J*. 9, 25-35.
19. Mombelli B, Gismondo MR, (2000). *The use of probiotics in medical practise*. *Antimicrob Agent Chemother*. 16, 531-536.
20. Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, (1999). *Probiotics: mechanisms and established effects*. *Int Dairy J*. 9, 43-52.
21. Rastall RA, Gibson GR, Gill HS, (2005). *Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An over-*

- view of enabling science and potential applications. FEMS Microbiol Ecol. 52, 145-152.
22. Salminen S, vonWright A, (1998). *Current probiotics- safety assured?* Microbial Ecol Health Dis. 10, 68-77.
 23. Sanders ME, (1999). *Probiotics*. Food Technol. 53, 67-77.
 24. Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T, (2005). *Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms*. Current Opin Biotechnol. 16, 204-211.
 25. Schrezenmeir J, de Vrese M, (2001). *Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition*. Am J Clin Nutr. 73(2 Suppl), 361S-364S.
 26. Servin AL, Coconnier MH, (2003). *Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens*. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 17(5), 741-754.
 27. Tannock GW, (1997). *Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental R&D*. Tibtech. 15, 270-274.
 28. Vanbelle N, Teller E, Focant M, (1990). *Probiotics in animal nutrition: a review*. Arch Anim Nutr. 40, 543-567.
 29. Williams GM, Wynder EL, (1996). *Diet and cancer: A synopsis of causes and prevention stratagies*. In 'Nutrition and Press, Inc., Boca Raton, Fla.
 30. Yıldırım Z, Yıldırım M, (2000). *Probiyotik özellik gösteren bifidobakteriler: Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu* (Ed. M. Demirci), Tekirdağ, 266-271.
 31. Yılsay TÖ, Kurdal E, (2000). *Probiyotik süt ürünlerinin beslenme ve sağlık üzerindeki etkisi*. VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu (Ed. M. Demirci), Tekirdağ, 279-286.
 32. Zhou JS, Shu Q, Rutherford KJ, Prasad J, Birtles MJ, Gopal PK, Gill HS, (2000). *Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains Lactobacillus rhamnosus HN001, L. acidophilus HN017, and Bifidobacterium lactis HN019 in BALB/ c mice*. Int J Food Microbiol. 56, 87-96.

Balıkların Başlıca Bakteriyel Zoonozları

İlker Hancı¹, Ertan Emek Onuk²

¹ Sinop İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Sinop

² Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun

Geliş Tarihi / Received: 05.09.2016, **Kabul Tarihi / Accepted:** 23.10.2016

Özet: Son yıllarda su içerisindeki yaşamın hızlı bir şekilde endüstriyel bir sanayi dalı olarak gelişmesi ve buna bağlı olarak yoğun yetiştiricilik şartlarında yapılan üretimin artması enfeksiyöz hastalıkların görülme sıklığını arttırmaktadır. Özellikle, akuakültürde görülen bazı bakteriyel enfeksiyonların zoonoz potansiyele sahip olması bu hastalıkları halk sağlığı açısından önemli kılmaktadır. Bu derlemede hem balıklarda hem de insanlarda enfeksiyon oluşturan başlıca bakteriyel zoonotik ajanlar hakkında literatür bilgilerine yer verilmiştir.

Anahtar kelimeler: Bakteriyel zoonoz, balık

Main Bacterial Zoonoses of Fish

Abstract: In recent years, due to the development of life in water as an industrial branch and increase in aquaculture production under intensive culture conditions have lead to increase in incidence of infectious diseases. Particularly some bacterial infections which appear in aquaculture are important for public health due to their zoonotic potential. This review includes literature information about major bacterial zoonoses causing infection both in fish and human.

Key words: Bacterial zoonose, fish

Giriş

Nüfusun ve beslenme sorunlarının hızla arttığı dünyada, zengin bir protein kaynağı olan su ürünlerine olan talep giderek artmaktadır. Su ürünleri stoklarından ekonomik ve sürekli olarak yararlanmak için kaynakların korunarak üretiminin devamlılığının sağlanması gerekmektedir. Bu nedenle yetiştiricilik yoluyla mevcut su ürünleri üretiminin artırılmasına yönelik çalışmalar, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde giderek artmaktadır [49]. Bununla birlikte yoğun balık üretiminin doğal ve insan eliyle yapılmış akuatik ortamların kontamine olmasına neden olabileceği ve bu durumun sadece balık sağlığını etkilemediği aynı zamanda insan tüketimine sunulan balıklar ile ilgili güvenlik endişelerini artırdığı bildirilmektedir [41]. Verilere göre ülkemiz su ürünleri sektörünün de hızlı bir gelişim sürecine girdiği ve su ürünleri yetiştiriciliği ile sağlanan ürün miktarının her yıl arttığı görülmektedir. 2014 yılında bir önceki yıla oranla yetiştiricilik yoluyla elde edilen ürün miktarında %0,7'lik bir artış gerçekleşmiş ve toplam üretim 235 bin 133 tona ulaşmıştır [51]. Su ürünleri yetiştiriciliği hızla gelişmesine rağmen ülkemizde kişi başına düşen yıllık balık eti tüketiminin oldukça düşük miktarda olduğu görülmektedir.

Kişi başına düşen yıllık balık eti tüketimimiz 2007 yılında 8,57 kg ile en yüksek seviyede iken 2013 yılında 6,307 kg ile en düşük seviyede seyretmiştir [50]. Oysa dünyada kişi başı su ürünleri tüketimi 2010 yılı verilerine göre 18,9 kg, Çin dışında dünya su ürünleri tüketimi kişi başına 15,4 kg, Avrupa'da ise 22,00 kg düzeyindedir [15]. Bu verilere göre dünya ortalamasını yakalamak için yaklaşık üç kat, Avrupa ortalamasını yakalamak için ise yaklaşık dört kat balık tüketmemiz gerekmektedir.

Zoonoz terimi genel olarak hayvanlardan insanlara geçebilen bir enfeksiyon olarak tanımlanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ise zoonoz teriminin tam anlamıyla omurgalı hayvanların doğal olarak enfeksiyonun sürmesi için gerekli olduğu vakaları tanımlamada kullanılması gerektiğini ve insanların rastlantısal konakçılar olduğunu bildirmektedir. Bu ikinci tanım insanlar ve hayvanlar tarafından ortak çevresel kaynaklardan ya da omurgasız organizmalardan bulaşan patojenler yani "ortak enfeksiyon" olarak adlandırılan kavram ile gelişmektedir. Gıda kaynaklı enfeksiyonlarda zoonoz enfeksiyonların bir formu olarak sınıflandırılmaktadır. Balık zoonozu olarak düşünülen birçok bakteri genellikle fakültatif patojenlerdir ve sıklıkla ortak

enfeksiyon ya da kesin zoonoz olduğu arasında bir ayrım yapmak mümkün değildir [16]. Bu derlemede bakteriyel balık zoonozları tartışılırken hem balıklarda hem de insanlarda enfeksiyon oluşturan başlıca bakteriyel zoonotik ajanlar dikkate alınmıştır.

Gram Pozitif Bakteriler

***Clostridium botulinum*:** *C. botulinum* tüm dünyada tatlı su ve deniz balıklarının bağırsaklarında komensal olarak bulunan, aynı zamanda çevresel sedimentlerde ve çürüyen organik maddelerde de bulunabilen mikroorganizmadır [16]. Etken anaerobik, Gram pozitif, spor oluşturan bir bakteridir ve dört farklı fenotipik gruba (I-IV) ayrılmaktadır. Bu gruplardan I ve II insanlar için patojeniktir. Ayrıca *C. botulinum* suşları serolojik olarak yedi farklı nörotoksin (A-G) üretmektedir. Bu toksin tipleri arasından insanlardaki salgınlarda en fazla karşılaşılan toksin tipleri tip A, B, E ve F iken, tip C ve D hayvanlardaki botulizm ile ilişkilendirilmektedir [8]. Balık tüketimiyle ilişkili olarak insanlarda ortaya çıkan birçok hastalık vakasından ise tip E toksininin sorumlu olduğu bildirilmektedir [16]. *C. botulinum* nörotoksin tip E'nin neden olduğu hastalık tablosu Amerika, Britanya ve Danimarka'da yetiştiriciliği yapılan salmonid balıklarda bildirilmiştir [5,12,21]. Bununla birlikte son yıllarda Güneydoğu Amerika'da kanal yayın balıklarında (*Ictalurus punctatus*) saptanan bir hastalık vakası viseral toksikozis olarak rapor edilmiştir [29]. Yapılan çalışmalar *C. botulinum*'un balıkların bağırsaklarında, yüzeylerinde, balık çiftliklerindeki sedimentlerde, balık ürünlerinde ve alglerde bulunabildiğini göstermektedir [19,22,65].

İnsanlarda *C. botulinum* tip E toksin kaynaklı hastalıkların öyküsüne bakıldığında bulaşmanın sucul ortam, balık ve balık ürünlerinin tüketilmesi ile ilişkili olduğu görülmektedir. 2013 yılında Kanada'nın Ontario eyaletinde rapor edilen bir vakada iki yetişkin kadın tuzlanmış balık yedikten sonra hastaneye başvurmuşlar ve yapılan inceleme sonrası her iki hastanın serumlarında *C. botulinum* nörotoksin tip E tespit edilmiştir. Ayrıca bu hastalardan birinin mide sıvısından izolasyon yapılmıştır. Bu vakada aynı zamanda epidemiyolojik olarak bulaşma kaynağının belirlenmesi amacıyla marketlerden alınan gıda örneklerinden (tuzlanmış balık) etkenin izolasyonu yapılmış ve bu örneklerden de tip E toksini

belirlenmiştir [59]. *C. botulinum*'un balıklardaki varlığı kontamine sucul ortam ile direkt temas ve *C. botulinum* sporlarının sedimentten veya kontamine besinlerden alınımı ile ilişkili olabilir. Balıkların işlenmesi esnasında özellikle, uygun olmayan veya yetersiz ısı uygulamaları son üründe tüm *C. botulinum* sporlarını yok etmede başarısız olabilmektedir. Bu gibi durumlarda *C. botulinum* halk sağlığı için bir tehdit oluşturabilir [41].

***Erysipelothrix spp.*:** *Erysipelothrix* türleri arasında *E. rhusiopathiae*, *E. tonsillarum* ve *E. insipinata* bulunmaktadır. Hayvanlarda *E. rhusiopathiae*'nin sebep olduğu hastalık "erysipelas" olarak bilinirken insanlarda hastalık "erysipeloid" olarak adlandırılmaktadır [16]. Erysipeloid aynı zamanda Rosenbach's hastalığı, Baker-Rosenbach hastalığı ve pseudoerysipelas olarak da isimlendirilmektedir [58]. *E. rhusiopathiae* (önceden *E. insidiosa*) küçük, Gram pozitif, çomak şeklinde, fakültatif aerobik, hareketsiz, spor oluşturmeyen bir bakteridir [58, 63]. Organizma her yerde bol olarak bulunmakta ve doğada (marin yerleşkeler dahil) uzun süreler boyunca persiste olarak kalabilmektedir. Etken birçok vahşi ve evcil hayvanda, kuşlarda ve balıklarda patojen veya kommensaldir. Domuz erysipelas'ı en yaygın olan ve en fazla ekonomik öneme sahip olan hastalıktır [63]. Chong ve ark., [6] iki farklı Avustralya yılan balığında (*Anguilla reinhardtii* ve *A. australis*) ortaya çıkan ve septisemi ile seyreden hastalık tablosunun *E. rhusiopathiae* kaynaklı olduğunu bildirmişler ve etkeni moleküler olarak PCR ile tanımlamışlardır. Bu vakada hastalığın strese bağlı ortaya çıkan septisemik bir hastalık olduğu ve düşük mortalite ile seyrettiği rapor edilmiştir.

İnsanlarda *E. rhusiopathiae* nedenli enfeksiyonlar meslekle ilişkilendirilmiş, başlıca kontamine hayvanlar, onların ürünleri veya atıkları veya toprak ile temas sonucunda ortaya çıktığı bildirilmiştir [63]. Hastalık başlıca hayvan yetiştiricileri, Veteriner Hekim, kesimhane çalışanı, kürkçü, kasap, balıkçı, ev kadını ve aşçılık gibi meslek gruplarında saptanmıştır [58]. *E. rhusiopathiae* kaynaklı insan enfeksiyonları (Fish rose) deri yaralarının kontaminasyonu ile olur ve genel olarak lokalize ağrılı, sınırlı selülit, morarma ve ödem görülür. *E. rhusiopathiae* insanlarda sistemik enfeksiyon olarak nadir görülür, fakat sık olarak endocarditis ile ilişkilendirilir. İnsanlara *E. rhusiopathiae* kaynaklı zoonotik

bulaşmanın (fish-handlers disease) balıkçılık sektöründe çalışanlar arasında meydana geldiği bildirilmektedir. Genetik bir kanıt bulunmamakla birlikte, insanlardaki deri lezyonları ve *E. rhusiopathiae* ile kolonize olmuş balıklardan elde edilen bağlantı bu bakterinin zoonotik bir ajan olduğu savını desteklemektedir [16].

***Lactococcus garvieae*:** *L. garvieae* fakültatif anaerobik, hareketsiz, sporsuz, Gram pozitif oval kok şeklinde, alfa hemolitik mikroorganizmadır. Etken ilk defa Büyük Britanya’da sığır mastitis vakasından izole edilmiş [56] sonraları ise, D grubu streptokoklar arasında en önemli balık patojeni olarak kabul görmüştür [16]. Balıklarda *L. garvieae* tarafından meydana getirilen laktokokkozis enfeksiyonu, özellikle, tatlı su kültürlerindeki salmonid balıklar ve denizde yetiştiriciliği yapılan balık türlerinde yıkımlayıcı bir etkiye sahip olan bir tür streptokokkozis enfeksiyonu olarak tanımlanmaktadır [56].

L. garvieae’nın konakçı aralığı suda yaşayan türler ile sınırlı değildir. Etken aynı zamanda ineklerdeki subklinik meme içi enfeksiyonlardan, su buffalolarındaki subklinik mastitisten, tavuk etlerinden, çığ inek sütünden, et ürünlerinden, domuz kanı işleyen endüstriyel mezbahanelerden ve kedi ve köpeklerin tonsillerinden izole edilmiştir [56]. Son yıllarda ise endocarditis, kolesistit ve diskospondilitis’e neden olan bir insan patojeni olarak tanımlanmaktadır [16]. İnsanlarda görülen enfeksiyonlar ile akuakülterde görülen salgınlar arasındaki ilişki açık bir şekilde ortaya konulmasa da, *L. garvieae* kaynaklı insan enfeksiyonları çığ deniz ürünlerinin tüketilmesi ile ilişkilendirilmektedir. Wang ve ark., [60] insanlarda görülen bir *L. garvieae* enfeksiyonunun çığ balık tüketiminden kaynaklandığını ortaya koymuşlardır. Bu vakada enfeksiyonun özellikle balıklarda enfeksiyonun yüksek oranda görüldüğü yaz aylarında çığ deniz ürünü tüketilmesiyle ortaya çıkmış olabileceğini bildirilmiştir. Epidemiyolojik incelemelerde 16S rDNA sekans analizi sonucuna göre hasta bireyden elde edilen izolat ile hastanın çığ deniz ürünü yediği restorandan alınan mürekkep balığından elde edilen izolat arasında %100 benzerlik belirlenmiştir. Bir başka vakada akut akalküloz kolesistitis enfeksiyonu bulunan bir hastanın safra kesesinden konvansiyonel kültür ve moleküler metotlar kullanılarak *L. garvieae* izolasyon ve identi-

fikasyonu yapılmıştır. Bu vakadaki hastanın balıkçı olması, Kore’de gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliği yapan bir işletmede çalışması ve ara sıra çığ alabalık, sıklıkla çığ deniz ürünü yediğinin bildirilmesi, enfeksiyonun kaynağının çığ balık olabileceği yönünde güçlü şüphe oluşturmuştur [31].

***Streptococcus spp.*:** Streptokoklar, Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz ve aerobik mikroorganizmalardır [2]. Balıklardaki enfeksiyonlar genel olarak Lancefield grup B organizmaları (*S. agalactiae*) ya da Lancefield antijenlerini ekspres etmeyen *S. iniae* türlerinden kaynaklanmaktadır. *S. agalactiae* insanlarda neonatal sepsis, ineklerde mastitis etkenidir [16]. Japonya’da insan neonatal enfeksiyonlardan izole edilen *S. agalactiae* izolatı ile Kuveyt’te balık ve yunuslardan izole edilen *S. agalactiae* izolatları arasında genetik yakınlık olduğu bildirilmiştir [13]. Yapılan bir başka çalışmada ise insan orijinli *S. agalactiae* izolatının deneysel olarak Nil tilapialarını (*Oreochromis niloticus*) enfekte ettiği belirlenmiş ve bu deneysel çalışma sonucunda grup B streptokokların memeliler ile balıklar arasındaki bulaşması ortaya konulmuştur [14].

S. iniae, orijinal olarak Amazon ırmağı yunuslarından (*Inia geoffrensis*) izole edilmiştir [16]. Weinstein ve ark. [64] Toronto’da bir hastalık salgınında *S. iniae*’yı zoonoz enfeksiyon olarak tanımlamışlardır. Bu vakada dokuz hastada çığ balık ile teması bağlı olarak ortaya çıkan selülit, bir hastada ayrıca endokarditis, meningitis ve artiritis saptanmıştır. Araştırmacılar PFGE metodu ile 9 hastadan izole edilen *S. iniae* şuşlarının 1993 yılında Virginia’da yerel balık marketlerindeki tilapia balıklarından elde edilen *S. iniae* şuşları ile eşleştiğini bildirmişlerdir. *S. iniae* kaynaklı zoonotik enfeksiyonlar Güneydoğu Asya, Kanada ve Hon Kong’da öncelikli olarak balık işleme esnasında ve canlı balıklar ile temas ile ilişkilendirilerek rapor edilmiştir [32,34].

***Nocardia spp.*:** *Nocardia* etkenleri Gram pozitif, zayıf asidorezistans özellikte aerobik, sporsuz, kokoid ve/veya küçük çomakçık şeklinde görülen mikroorganizmalardır [2]. Doğada yaygın olarak bulunan *Nocardia* türleri, insanlarda pulmoner, kutanöz, merkezi sinir sistemi ve sistemik nokardiyoz gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olabilmekte ve sıklıkla bağışıklığı baskılanmış hastalarda belirtiler meydana gelmektedir [35,52]. İnsanlarda *Nocardia*

spp. enfeksiyonları öncelikli olarak *N. asteroides* ve yakın akraba türleri *N. farcinica*, *N. brasiliensis* ve *N. otitiscaviarum* ile ilişkilendirilmesine rağmen [35] ülkemizde yapılan bir çalışmada klinik örneklerden izole edilen 45 suşun çoğunluğunun *N. cyriacigeorgica* (n:26, %57,8) olduğu, bunu *N. farcinica* (n:12, %26,7), *N. otitiscaviarum* (n:4, %8,9), *N. asteroides* (n:1, %2,2), *N. neocaledoniensis* (n:1, %2,2) ve *N. abscessus*'un (n:1, %2,2) takip ettiği saptanmıştır [52]. Balıklarda enfeksiyona başlıca *N. asteroides* ve *N. seriolae* türleri neden olmaktadır [2]. Ancak balık ve insan izolatları arasında henüz epidemiyolojik veya genetik bir ilişki saptanamadığı bildirilmiştir [16].

Mycobacterium spp.: *Mycobacterium* genusunda yer alan *M. tuberculosis* kompleksi ve *M. leprae* dışında kalan tüm türler tüberküloz dışı mikobakteriler (Nontuberculous mycobacteria, NTM) olarak tanımlanmaktadır [37]. Genel olarak çoğu mikobakter plemorfik Gram pozitif, asit fast, aerobik, hareketsiz ve çomak şeklinde mikroorganizmalardır [17, 23]. 140'dan fazla NTM türü rapor edilmiş olup, bu türlerin yaklaşık 25'i NTM hastalıkları ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmektedir. Geri kalan türler ise nadir olarak çevresel örneklerde karşılaşılan türlerdir [54]. Balıklarda tüberküloz, başta *M. marinum*, *M. fortuitum* ve *M. chelonae* olmak üzere *M. abscessus*, *M. gordonae*, *M. haemophilum*, *M. interjectum*, *M. montefiorensis*, *M. pseudoshottsii*, *M. scrofulaceum*, *M. shottsii*, *M. szulgai* ve *M. similiae* gibi birçok mikobakteriyel tür tarafından meydana getirilmektedir [17,23].

NTM'ler tipik olarak toprak ve suyun yanı sıra arıtılmış sularda da yaşayan çevresel organizmalardır. Genel olarak insanlar için düşük patojeniteye sahip olmalarına rağmen, sıklıkla akciğer hastalıklarına, takiben özellikle çocuklarda lenfadenitis'e, *M. marinum* tarafından meydana getirilen deri hastalıklarına, bağışık sistemi baskılanmış bireylerde diğer ekstrapulmoner hastalıklara veya yaygın sistemik enfeksiyonlara neden olabilmektedir [54]. İnsanlarda balık ya da su kaynaklı mikobakteriyel enfeksiyonlar çoğunlukla, ekstremitelerde süperfasiyal granulomatöz bir yangı formu şeklinde görülür. Ancak lezyonlar daha derin dokulara inebilir ve tenosynovitis, bursitis, artiritis ve osteomyelitis'e neden olabilir [33]. Patojenik balık mikobakterileri ile ilişkili insan enfeksiyonlarının genellikle, yara

ve deri sıyrıklarının kontamine suya maruz kalması yoluyla bulaştığı bildirilmektedir [43]. Yine akvaryum balıklarında ve balık sahiplerinde aynı VNTR (variable number tandem repeat) profiline sahip *M. marinum* suşlarının izole edilmiş olması akvaryumların olası enfeksiyon kaynağı olabileceğini göstermektedir [47]. Pekin'de yapılan bir çalışmada NTM kaynaklı sporadik deri enfeksiyonlarında en yaygın türün *M. marinum* (37 vakanın 30'unda) olduğu ortaya konmuştur [28]. Yine bir başka çalışmada Milan'da hastalık öyküsünde balık tanklarıyla düzenli olarak fiziksel teması olduğu bildirilen sporotrichoid deri enfeksiyonu gözlenen 14 hastadan *M. marinum* izole edilmiştir [57].

1984-2014 yılları arasında Orta Doğu ülkelelerinde yapılmış 96 çalışmada 1751 NTM suşu izole edilmiştir. Bunların 1084'ü klinik örneklerden, 619'u çevresel örneklerden, 48'i ise olgu bildirimlerinden elde edilmiştir. Bu tarihler arasında ülkeler bazında İran'dan 34, Türkiye'den 21, Suudi Arabistan'dan 18, Lübnan'dan 5, Katar'dan 4, Pakistan'dan 4, Irak'tan 3, Mısır'dan 2, Bahreyn'den 2, Kuveyt'ten 2, Umman'dan 1 bildirim yapılmıştır. Hızlı üreyen mikobakteriyel türler arasında yer alan *M. fortuitum* klinik ve çevresel örneklerden sırasıyla %60,1 ve %46,7 izoloasyon oranıyla en yaygın tür olarak belirlenmiştir [55].

Gram Negatif Bakteriler

Aeromonas spp.: *Aeromonas* cinsi, akuatik çevrenin normal faunasında bulunan fakültatif anaerobik, oksidaz pozitif, Gram negatif bakterilerdir. *Aeromonas* cinsinin bugünkü sınıflandırması DNA-DNA hibridizasyonuna ve 16S ribozomal DNA ile ilgili çalışmalara dayanmaktadır. Bu cins içerisinde 17 Hibridizasyon Grubu (HG) ve gruplara dahil mezofilik ve psikrofilik olarak bilinen hareketli (tek, polar flagella) ve hareketsiz türler bulunmaktadır. *Aeromonas*lar hayvan ve insanların bağırsak florasında gastrointestinal hastalık tablosu göstererek veya göstermeden bulunmaktadır. Bazı türleri insanlar için patojendir. İnsanlarda meydana gelen hastalıkların birçoğu HG-1 (*A. hydrophila*), HG-4 (*A. caviae*), HG-8 (*A. veronii*), HG-9 (*A. jandaei*), HG-10 (*A. veronii* biovar *veronii*), HG-12 (*A. schubertii*) veya HG-14 (*A. trola*) gruplarında bulunan türlerden ileri gelmektedir. İnsanlarda hastalık oluşturma yeteneğinde olan bu hibridizasyon grup-

larındaki türlerin oranı ise bilinmemektedir [39]. İnsanlarda hastalık oluşturan aeromonaslar septisemi, yara enfeksiyonu, menenjit, peritonit ve karaciğer fonksiyon bozukluğu gibi çok değişik enfeksiyonlar ile ortaya çıkabilmektedir. Bazı türler ise enterotoksin üretmesi nedeniyle gastrointestinal sistem hastalıklarına neden olabilmektedirler [27]. Özellikle, *A. hydrophila* kaynaklı hastalıkların büyük bir kısmı su ürünleri veya uzun süreli dondurulmuş tüketime hazır gıdalar ile ilişkilendirilmektedir [10]. Bununla birlikte hastalık etkenlerinin direkt olarak canlı balıklardan insanlara geçişi ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Yapılan bir çalışmada kistik fibröz 11 aylık bir erkek çocuğunun öksürük sıvabından *Pseudomonas aeruginosa* ve *A. hydrophila* izole edilmiş ve bu vakada izole edilen *A. hydrophila* suşunun çocuğun evinde bulunan akvaryumdan aerosol yolla bulaştığı sonucuna varılmıştır. Akvaryumun evden çıkarılması ile etken bir daha izole edilmemiştir [9].

Edwardsiella spp.: *Edwardsiella* genusu *Enterobacteriaceae* familyasının bir üyesidir ve bu genus içerisinde yer alan türler Gram negatif, genellikle hareketli, fakültatif anaerobik, küçük düzgün çomak şeklinde mikroorganizmalardır [44]. *Edwardsiella* genusu içerisinde *E. ictaluri*, *E. tarda* ve *E. hoshinae* gibi balık, insan, kuş ve sürüngenlerden izole edilmiş türler bulunmaktadır [16,40,44]. Ayrıca son yıllarda daha önce hasta balıklardan *E. tarda* olarak izole ve tanımlanmış olan suşlarının fenotipik ve genetik çalışmalar sonrası *E. tarda* türüne ait olmadıkları belirlenmiş ve bu suşlar *Edwardsiella* genusuna ait yeni bir tür, *E. piscicida*, olarak önerilmiştir [1]. *E. ictaluri* kedi balıklarının önemli patojenlerinden bir tanesidir ve enterik septisemiyeye neden olur [18]. Etkenin insanları enfekte ettiği bilinmemektedir [16]. *E. hoshinae* genel olarak kuşlar ve sürüngenlerden izole edilir. Aynı zamanda insan dışkısından izole edilmesine rağmen insan ve hayvan patojeni olarak rolü kesin değildir [24]. *E. tarda* başlıca yılan balıkları ve kedi balıkları olmak üzere tatlı ve tuzlu sularda bulunan birçok balık türünü enfekte etmesine rağmen konakçı aralığı sadece balıklarla sınırlı değildir. Etkenin reptilleri, kuşları, deniz memelilerini, büyük baş hayvanları, domuzları enfekte edebileceği bildirilmektedir. *E. tarda* çoğu kez akuatik hayvanların normal intestinal florasının bir parçasıdır. Etken aynı zamanda insanlarda birçok farklı klinik tablo ile ilişkilendi-

ilmektedir [44]. *E. tarda*'nın neden olduğu insan enfeksiyonları primer olarak gastroenteritis ile karakterizedir. Bununla birlikte septisemi ve menenjit gibi sistemik hastalıklar ve yara enfeksiyonları da görülmektedir [7, 25]. *E. tarda* asemptomatik olarak insanların dışkısında bulunabilmektedir [25]. Hastalık için risk faktörleri arasında akuatik çevre ve buna bağlı olarak balıklar, sürüngenler ve amfibiler yer almaktadır. *E. tarda* çeşitli deniz ve tatlı su balıklarında *Edwardsiella septicaemia* olarak adlandırılan hemorajik ve nekrotik hastalığı, yılan balıklarında kırmızı hastalığına (red disease) neden olur [16]. *E. tarda*'nın balıklardan insanlara direkt olarak geçişiyle ilgili birkaç rapor vardır. Bunlardan bir tanesinde Belçikalı 2 aylık bir bebekteki diyare tablosu *E. tarda* ile ilişkilendirilmiş ve etken hasta ile aynı evde bulunan tropikal akvaryumdaki balıktan izole edilmiştir. Bu vakada balıkların hastalık için rezervuar olarak görev yaptığı bildirilmiştir [53].

Vibrio spp.: *Vibrionaceae* familyası içerisinde yer alan Vibriolar Gram negatif, fakültatif anaerobik, genellikle hareketli, düz veya hafif kıvrık çomakçıklar şeklinde mikroorganizmalardır [2]. *Vibrio* türleri balıklarda ve sucul ortamda yaygın bir dağılım göstermektedir. Çeşitli *Vibrio* türleri hem vahşi hem de kültür balıklarında ciddi hastalıklara neden olabilirler. Balıklarda patojenik türler arasında *V. ordalii* (salmonidlerde septisemi), *V. anguillarum* (yılan balıklarında red pest), *V. salmonicida* (soğuk su vibriozisi), *V. vulnificus* (Avrupa yılan balıklarında sıcak su vibriozisi), *V. viscosus* ve *V. wadonis* (Atlantik somonlarında kış ülser hastalığı) yer almaktadır [16,41].

Vibrio türleri doğada yaygın olarak bulunması nedeniyle aynı zamanda balık ve kabuklu deniz ürünlerinin deri, solungaç ve intestinal kanalında gözlenmektedir [41]. *Vibrio* türleri arasında, *V. cholerae*, *V. vulnificus* ve *V. parahaemolyticus* türleri insanlardaki vibriozis vakalarında görülmekte ve bu türler balık ve kabuklu deniz ürünlerinin tüketimi ile ilişkilendirilmektedir. Bu türler arasında insan sağlığı açısından en önemli olanı *V. cholerae*, özellikle de kolera toksini üreten suşlarıdır [16,41]. *V. cholerae*'nin 200'den fazla serogrubu bulunmaktadır ve bu serogruplardan sadece O1 ve O139 kolera hastalığının etiyolojik ajanıdır. Diğer serogrurlara dahil suşlar genellikle non-O1/non-O139 suşlar olarak ifade edilmektedir ve tüm dünyada akuatik

ekosistemin normal mikrobiyotasının parçasıdır. Bu gruplara dahil *V. cholerae* suşları kulak ve yara enfeksiyonu gibi lokal enfeksiyonların yanı sıra gastroenteritise neden olabilmektedir [20]. *V. cholerae*'nin balıklarda hastalık oluşturduğuna dair ise sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır [30]. *V. vulnificus* ve *V. parahemolyticus* türleri insan vibriozisi ile daha sık olarak ilişkilendirilmekte ve genellikle yetersiz işlem görmüş balık ya da balıkçılık ürünlerinin tüketilmesi ile hastalığın meydana geldiği bildirilmektedir [41]. Bu bakteriler insanlarda yara enfeksiyonu, septisemi ve gastroenteritis'e neden olmaktadır. Bu etkenlerden *V. parahaemolyticus* gıda kaynaklı bir zoonoz olup, insanlarda kontamine gıdaların özellikle, istiridye gibi yumuşakçaların ağız yoluyla alınmasıyla hastalık oluşturmaktadır [11]. Balıklarda ise *V. parahemolyticus* kaynaklı mortalite bildirimleri İspanyol dişli sazanlarında (*Aphanius iberus*) yapılmıştır [3]. *V. vulnificus* ise başlıca yılan balıklarında hastalığa neden olmaktadır. *V. vulnificus*'un üç biyotipi (biyotip 1, 2 ve 3) tanımlanmıştır. Biyotip 1 başlıca sular ve insanlardan, biyotip 2 ise başlıca balıklardan ve insanlardan izole edilmiştir. Biyotip 2 sonraları balıklar için enfeksiyöz olan serovar A, E ve I'ya ayrılmıştır, ancak bu serovarlardan sadece serovar E'nin zoonotik potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Biyotip 3 insanlarda septisemi ve yara enfeksiyonlarından izole edilmiştir. Ancak bu biyotipin biyotip 1 ve 2 arasında hibrit bir biyotip olduğu kabul edilmektedir [16]. *V. vulnificus* biyotip 2, serovar E insan izolatının balık suşları için identikal virulens plazmidini taşıdığına saptanması [61] ve sekans analizi sonucu insan ve yılan balığı izolatlarına ait virulens genlerinin (*vvhA* ve *vvp*) dizilimlerinin örtüşmesi [45] balık ve insan izolatları arasındaki olası geçişin kanıtları arasında yer almaktadır.

V. cholerae, *V. vulnificus* ve *V. parahemolyticus* dışında kalan diğer türler; *Grimontia* (= *Vibrio*) *hol-lisae*, *Photobacterium* (= *Vibrio*) *damselae* subsp. *damselae*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. harveyi* (= *V. carchariae*), *V. metschnikovii* ve *V. mimicus* düşük risk grubunda yer almaktadırlar ve nadir olarak da insanlarda özellikle de gastroenteritis ve yara enfeksiyonlarından izole edilmektedir [4,16].

***Plesiomonas shigelloides*:** *P. shigelloides* Gram negatif, hareketli ve oksidaz pozitif uzun düz

çomak şeklinde mikroorganizmalardır. Etken *Plesiomonas* genusunun tek üyesidir ve aynı zamanda *Enterobacteriaceae* familyasında oksidaz pozitif olan tek üyedir [48]. *P. shigelloides* tüm dünyada yaygın bir dağılıma sahiptir. Başlıca tatlı sularda (havuz, akarsu ve göller) bulunmasına rağmen dere ağız ve deniz ortamında da bulunmaktadır. *P. shigelloides* çeşitli balık türlerinden, deniz kabuklularından, kuşlardan ve insanlardan izole edilmiştir. Aynı zamanda insan mikrobiyotasının bir üyesidir. Tropikal ve subtropikal bölgelerde *P. shigelloides* enfeksiyonu büyük çoğunlukla yaz aylarında meydana gelir [42]. İnsanlarda başlıca intestinal hastalıklar olmak üzere yüksek mortalite oranı ile seyreden sepsis ve menenjit gibi daha yaygın görülen ekstraintestinal hastalıklara neden olan önemli bir patojendir [48]. İnsanlardan rapor edilen enfeksiyon vakalarının büyük çoğunluğunun başlıca az pişmiş ya da çiğ istiridye, balık, deniz tarağı ve karides gibi kontamine deniz ürünlerinin alımı ile veya içerisinde *Plesiomonas* bulunan içilebilir suların kaynaklandığı düşünülmektedir [26]. Son yıllarda *P. shigelloides*'in tatlı sularda yetiştiriciliği yapılan farklı balık türlerinde enfeksiyona neden olduğuna dair bildirimlerin sayısında dikkate değer bir artış görülmektedir [38,62]. Bu vakaların birinde mersin balıklarında %60'a varan kümülatif mortalite bildirilmiştir [62].

***Pseudomonas spp.*:** *Pseudomonaceae* familyasında yer alan türler, Gram negatif, hareketli, aerobik ve fakültatif anaerobik ve çomak şeklinde mikroorganizmalardır [2]. Bu mikroorganizmalar tüm dünyada su ve toprakta yaygın olarak bulunurlar [16]. Balıklarda hastalık yapan *Pseudomonas* türleri arasında *P. anguilliseptica* ve *P. fluorescens* en sık izole edilen türlerdir [2]. *P. anguilliseptica* başlıca yılan balıklarında olmak üzere çipura, Baltık ringası ve morina balıklarında peteşiyel hemoraji ile karakterize hastalığa neden olmaktadır. *P. fluorescens* ise gümüş sazanı, Japon balığı, kadife balığı, ot sazanı, siyah sazan ve gökkuşağı alabalığı gibi bir çok balık türünde görülen nekrotik ve hemorajik hastalığın etkenidir [4]. *P. aeruginosa* insanlarda pnömoni etkeni olarak iyi bilinmektedir ve balıkların viseral dokularından izole edilmiştir [36]. *P. fluorescens*'in de insanlarda kistik fibrozis vakalarından izole edildiğine dair veriler bulunmaktadır [46].

Kaynaklar

- Abayneh T, Colquhoun DJ, Sørum H, (2013). *Edwardsiella piscicida* sp. nov., a novel species pathogenic to fish. J Appl Microbiol. 114, 644-654.
- Arda M, Seçer S, Sarıeyyüpoğlu M, (2005). *Balık Hastalıkları*. II. Baskı (Genişletilmiş). Ankara: Medisan Yayın Serisi: 61. p.70, 96, 99, 105
- Austin B, Austin DA. (2007) *Bacterial fish pathogens, Diseases of farmed and wild fish*. Springer-Praxis Publishing, Chichester, UK.
- Austin B, (2010). *Vibrios as causal agents of zoonoses*. Vet Microbiol. 140, 310-317.
- Cann DC, Taylor LY, (1982). *An outbreak of botulism in rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson, farmed in Britain*. J Fish Dis. 5, 393-399.
- Chong, RS-M, Shinwari MW, Amigh MJ, Aravena-Roman M, Riley TV, (2015). *First report of Erysipelothrix rhusiopathiae-associated septicaemia and histologic changes in cultured Australian eels, Anguilla reinhardtii (Steindachner, 1867) and A. australis (Richardson, 1841)*. J Fish Dis. 38, 839-847.
- Clarridge JE, Musher DM, Fainstein V, Wallace RJ Jr, (1980). *Extraintestinal human infection caused by Edwardsiella tarda*. J Clin Microbiol. 11, 511-514.
- Collins MD, East AK, (1998). *Phylogeny and taxonomy of the foodborne pathogen Clostridium botulinum and its neurotoxins*. J Appl Microbiol. 84, 5-17.
- Cremonesini D, Thomson A, (2008). *Lung colonization with Aeromonas hydrophila in cystic fibrosis believed to have come from a tropical fish tank*. J R Soc Med. 101, S44-S45.
- Daskalov H, (2006). *The importance of Aeromonas hydrophila in food safety*. Food Control. 17(6), 474-483.
- Drake SL, DePaola A, Jaykus L.-A, (2007). *An overview of Vibrio vulnificus and Vibrio parahaemolyticus*. Comp Rev Food Sci Food Safe. 6, 120-144.
- Eklund MW, Poysky FT, Peterson ME, Peck, LW, Brunson WD, (1984). *Type E botulism in salmonids and conditions contributing to outbreaks*. Aquaculture. 41, 293-309.
- Evans JJ, Bohnsack JF, Klesius PH, Whiting AA, Garcia JC, Shoemaker CA, Takahashi S, (2008). *Phylogenetic relationships among Streptococcus agalactiae isolated from piscine, dolphin, bovine and human sources: a dolphin and piscine lineage associated with a fish epidemic in Kuwait is also associated with human neonatal infections in Japan*. J Med Microbiol. 57, 1369-1376.
- Evans JJ, Klesius PH, Pasnik DJ, Bohnsack JF, (2009). *Human Streptococcus agalactiae isolate in Nile Tilapia (Oreochromis niloticus)*. Emerg Infect Dis. 15(5), 774-776.
- FAO, (2014). *The State of World Fisheries and Aquaculture*, Rome, Italy, 62-63 pp.
- Gauthier DT, (2015). *Bacterial zoonoses of fishes: a review and appraisal of evidence for linkages between fish and human infections*. Vet J. 203(1), 27-35.
- Gauthier DT, Martha WR, (2009). *Mycobacteriosis in fishes: a review*. Vet J. 180, 33-47.
- Hawke J, McWhorter A, Steigerwalt A, Brenner D, (1981). *Edwardsiella ictaluri* sp. nov., the causative agent of enteric septicemia of catfish. Int J Syst Bacteriol. 31, 396-400.
- Hielm S, Björkroth J, Hyytia E, Korkeala H, (1998). *Prevalence of Clostridium botulinum in Finnish trout farms: pulsed-field gel electrophoresis typing reveals extensive genetic diversity among type E isolates*. Appl Environ Microbiol. 64(11), 4161-4167.
- Huehn S, Eichhornb C, Urmersbacha S, Breidenbach J, Bechlarsd S, Bied N, Altera T, Bartelte E, Frankc C, Oberheitmannf B, Gunzerb F, Brennholtg N, Böerg S, Appeld B, Dieckmann R, Strauch E, (2014). *Pathogenic vibrios in environmental, seafood and clinical sources in Germany*. Int J Med Microbiol. 304(7), 843-850.
- Huss HH, Eskildsen U, (1974). *Botulism in farmed trout caused by Clostridium botulinum type E; a preliminary report*. Nord Vet Med. 26, 733-738.
- Hyytia E, Hielm S, Björkroth J, Korkeala H, (1999). *Biodiversity of Clostridium botulinum Type E Strains Isolated from fish and fishery products*. Appl Environ Microbiol. 65(5), 2057-2064.
- Jacobs JM, Stine CB, Baya AM, Kent ML, (2009). *A review of mycobacteriosis in marine fish*. J Fish Dis. 32(2), 119-130.
- Janda JM, Abbott SL, Kroske-Bystrom S, Cheung WK, Powers C, Kokka RP, Tamura K, (1991). *Pathogenic properties of Edwardsiella species*. J Clin Microbiol. 29, 1997-2001.
- Janda JM, Abbott SL, (1993). *Infections associated with the genus Edwardsiella: the role of Edwardsiella tarda in human disease*. Clin Infect Dis. 17, 742-748.
- Janda JM, Abbott SL, (1999). *Unusual food-borne pathogens. Listeria monocytogenes, Aeromonas, Plesiomonas, and Edwardsiella species*. Clin Lab Med. 19, 553-582.
- Janda JM, Abbott SL, (2010). *The genus Aeromonas: Taxonomy, pathogenicity, and infection*. Clin Microbiol Rev. 23, 35-73.
- Jin J, Jia J, Ding XL, Chen X, Sun QM, Xu JN, Xue CH, DU J, Cai L, Zhang JZ, (2015). *Sporadic cutaneous infections due to nontuberculous mycobacteria: a retrospective study of 37 cases*. Beijing Da Xue Xue Bao. 47(6), 939-944.
- Khoo LH, Goodwin AE, Wise DJ, Holmes WE, Hanson LA, Steadman JM, Mc Intyre LM, Gaunt PS, (2011). *The pathology associated with visceral toxicosis of catfish*. J Vet Diagn Invest. 23(6), 1217-1221.
- Kiiyukia C, Nakajima A, Nakai T, Muroga K, Kawakami H, Hashimoto H, (1992). *Vibrio cholerae non-O1 isolated from ayu fish (Plecoglossus altivelis) in Japan*. Appl Environ Microbiol. 58(9), 3078-3082.
- Kim JH, Go J, Cho CR, Kim JI, Lee MS, Park SC, (2013). *First report of human acute acalculous cholecystitis caused by the fish pathogen Lactococcus garvieae*. J Clin Microbiol. 51, 712-714.
- Koh TH, Kurup A, Chen J, (2004). *Streptococcus iniae dis-citis in Singapore*. Emerg Infect Dis. 10, 1694-1696.
- Lahey T, (2003). *Invasive Mycobacterium marinum infections*. Emerg Infect Dis. 9, 1496-1498.

34. Lau SKP, Woo PCY, Tse H, Leung K-W, Wong SSY, Yuen K-Y, (2003). *Invasive Streptococcus iniae infections outside North America*. J Clin Microbiol. 41, 1004-1009.
35. Lederman ER, Crum NF, (2004). *A case series and focused review of nocardiosis*. Medicine. 83, 300-313.
36. Leung CK, Huang YW, Pancorbo OC, (1992). *Bacterial pathogens and indicators in catfish and pond environments*. J Food Protect. 55, 424-427.
37. Li J, Chong AH, O'Keefe R, Johnson PD, (2014). *The fish tank strikes again: Metachronous nontuberculous mycobacterial skin infection in an immunosuppressed host*. Australas J Dermatol. 55(4), e77-e79.
38. Liu Z, Ke X, Lu M, Gao F, Cao J, Zhu H, Wang M, (2015). *Identification and pathological observation of a pathogenic Plesiomonas shigelloides strain isolated from cultured tilapia (Oreochromis niloticus)*. Wei Sheng Wu Xue Bao. 55(1), 96-106.
39. Martin-Carnahan E, Joseph WS, (2005). *Aeromonas*. In: DJ Brenner, NR Krieg, JT Staley, GM Garrity (Ed), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed., Vol. 2, Springer-Verlag, New York. p.556-578.
40. Mohanty BR, Sahoo PK, (2007). *Edwardsiellosis in fish: a brief review*. J Biosci. 32, 1331-134.
41. Novoslavskij A, Terentjeva M, Eizenberga I, Valciņa O, Bartkevičs V, Bērziņš A, (2016). *Major foodborne pathogens in fish and fish products: a review*. Ann Microbiol. 66, 1-15.
42. Pence MA, (2016). *Wound infection with Plesiomonas shigelloides following a freshwater injury*. J. Clin Microbiol. 54(5), 1180-1182.
43. Petrini B, (2006). *Mycobacterium marinum: Ubiquitous agent of waterborne granulomatous skin infections*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 25, 609-613.
44. Plumb JA, (1999). *Edwardsiella Septicemias*. In: Fish Diseases and Disorders Volume 3. Viral, Bacterial and Fungal Infections. Ed.: P.T.K. Woo, D.W. Bruno, CAB International, New York, USA. p.479-521.
45. Roig FJ, Amaro C, (2009). *Plasmid diversity in Vibrio vulnificus biotypes*. Microbiology (Reading, England). 155, 489-497.
46. Scales BS, Erb-Downward JR, Huffnagle IM, LiPuma JJ, Huffnagle GB, (2015). *Draft Genome Sequences of Seven Pseudomonas fluorescens Subclade III Strains Isolated from Cystic Fibrosis Patients*. Genome Announc. 3(1), e01285-14.
47. Slany M, Jezek P, Bodnarova M, (2013). *Fish tank granuloma caused by Mycobacterium marinum in two aquarists: two case reports*. Biomed Res Int. 2013:161329, 4 pages.
48. Stock I, (2004). *Plesiomonas shigelloides: an emerging pathogen with unusual properties*. Rev Med Microbiol. 15, 129-139.
49. Türel M, (2002). *Su Ürünleri Yetiştiricilik Alt Sektöründe Planlama*. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
50. Türkiye İstatistik Kurumu (TUİK), (2013). *Su Ürünleri İstatistikleri 2012*, Türkiye İstatistik Kurumu Matbaası, Ankara.
51. Türkiye İstatistik Kurumu (TUİK), (2014). *Türkiye Su Ürünleri İstatistikleri 2014*, internet erişimi: http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1005, 23.05.2016
52. Uner MC, Hascelik G, Mustak HK, (2016). *16S rRNA gen dizi analizi ile tanımlanan klinik Nocardia izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıkları*. Mikrobiyol Bul. 50(1), 11-20.
53. Vandepitte J, Lemmens P, Swert L, (1983). *Human Edwardsiellosis traced to ornamental fish*. J Clin Microbiol. 17, 165-167.
54. van Ingen J, (2013). *Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections*. Semin Respir Crit Care Med. 34(1), 103-109.
55. Velayati AA, Rahideh S, Nezhad ZD, Farnia P, Mirsaedi M, (2015). *Nontuberculous mycobacteria in Middle East: Current situation and future challenges*. Int J Mycobacteriol. 4(1), 7-17.
56. Vendrell D, Balcazar JL, Ruiz-Zarzuola I, de Blas I, Girones O, Muzquiz JL, (2006). *Lactococcus garvieae in fish: A review*. Comp Immun Microbiol Infect Dis. 29, 177-198.
- Veraldi S, Çuka E, Nazzaro G, (2014). *Treatment of sporotrichoid fish tank granuloma with pulsed clarithromycin*. Dermatology. 229, 83-87.
57. Veraldi S, Girgenti V, Dassoni F, Gianotti R, (2009). *Erysipeloid: a review*. Clin Exp Dermatol. 34(8), 859-862.
58. Walton RN, Clemens A, Chung J, Moore S, Wharton D, Haydu L, deVilla E, Sanders G, Bussey J, Richardson D, Austin JW, (2014). *Outbreak of type E foodborne botulism linked to traditionally prepared salted fish in Ontario, Canada*. Foodborne Pathog Dis. 11(10), 830-834.
59. Wang CY, Shie HS, Chen SC, Huang JP, Hsieh IC, Wen MS, Lin FC, Wu D, (2007). *Lactococcus garvieae infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks*. Int J Clin Pract. 61, 68-73.
60. Wang J, Sasaki T, Maehara Y, Nakao H, Tsuchiya T, Miyoshi S-I, (2008). *Variation of extracellular proteases produced by Vibrio vulnificus clinical isolates: Genetic diversity of the metalloprotease gene (vvp), and serine protease secretion by vvp-negative strains*. Microb Pathog. 44, 494-500.
61. Wang X, Xu L, Cao H, Wang J, Wang S, (2013). *Identification and drug sensitivity of a Plesiomonas shigelloides isolated from diseased sturgeons*. Wei Sheng Wu Xue Bao. 53(7), 723-729.
62. Wang Q, Chang BJ, Riley TV, (2010). *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Vet Microbiol. 140(3), 405-417.
63. Weinstein MR, Litt M, Kertesz DA, Wyper P, Rose D, Coulter M, McGeer A, Facklam R, Ostach C, Willey BM, Borczyk A, Low DE, (1997). *Invasive infections due to a fish pathogen, Streptococcus iniae*. N Engl J Med. 337, 589-94.
64. Wijesinghe RU, Oster RJ, Haack SK, Fogarty LR, Tucker TR, Riley SC, (2015). *Spatial, temporal, and matrix variability of Clostridium botulinum Type E toxin gene distribution at great lakes beaches*. Appl Environ Microbiol. 81(13), 4306-4315.

Canine Adenovirus Enfeksiyonları

Fahriye Saraç

Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, 34890, İstanbul

Geliş Tarihi / Received: 10.02.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 09.04.2016

Özet: *Adenoviridae* ailesinde yer alan Canine adenoviruslar, Canine Adenovirus Tip 1 (CAV 1) ve Canine Adenovirus Tip 2 (CAV 2) olmak üzere iki tip olup, sırasıyla, infectious canine hepatitis (ICH) ve infectious canine laryngotracheitis'e neden olmaktadır. Canine adenovirusların neden olduğu bu iki hastalık, dünya çapında görülen çok önemli adenovirus enfeksiyonlarından. Yeni doğan ve genç köpekler her iki tipe karşı duyarlı olup, yetişkin köpekler genellikle iyi prognoza sahiptir. Bu derlemenin amacı, özellikle yavru köpeklerde etkili olan her iki adenoviral enfeksiyon hakkında bilgi vermektir.

Anahtar sözcükler: Canine Adenovirus Tip 1, Canine Adenovirus Tip 2, Köpek

Canine Adenovirus Infections

Summary: Canine adenoviruses are typical members of the family Adenoviridae and two types of adenoviruses, Canine Adenovirus Type 1 (CAV 1) and Canine Adenovirus Type 2 (CAV 2) are causative agents of infectious canine hepatitis and infectious canine laryngotracheitis, respectively. The two diseases caused by canine adenoviruses (CAV) are the most important adenovirus infections of animals worldwide. Both of the infections generally have a good prognosis, being totally silent in adults, although neonates and juveniles are more sensitive. The aim of this review is to give information about adenoviral infections which is especially effect to puppies.

Key words: Canine Adenovirus Type 1, Canine Adenovirus Type 2, Dog

Giriş

Enfeksiyöz canine hepatitis (ICH), Canine Adenovirus Tip 1 (CAV 1)'in neden olduğu Canidae and Ursidae ailelerinin sistematik bir enfeksiyonudur [7]. Rubarth tarafından 1947 yılında köpeklerin spesifik viral bir enfeksiyonu olarak tespit edilen ICH, asemptomatik fatal hastalık ile karakterizedir [16]. ICH'a neden olan CAV 1, aynı zamanda, kurt, ayı, tilki, kocarca ve çakalların önemli bir patojenidir ve epizootilere neden olmaktadır [2,14,17]. İlk olarak kurt ansefalit nedeni olarak fark virus [14], köpeklerde akut hepatitise neden olmakla birlikte, respiratör veya oküler hastalığa, ensefolopati, kronik hepatit ve intestinal nefrite de neden olabilmektedir [2,14].

CAV 2, ilk olarak 1961 yılında laryngotracheitis klinik semptomları gösteren bir köpekte Ditchfield ve arkadaşları tarafından belirlenmiş ve infectious canine laryngotracheitis (ICLT) olarak adlandırılmıştır [8]. Virus, solunum yoluna lokalize olur ve tonsilitis, faranjitis, trahitis, bronşitis ve bronkopnömoniye neden olmaktadır [2,11,14].

Hastalık Etkeni

Adenoviridae ailesi, CAV 1 ve CAV 2'nin yer aldığı ve memelileri enfekte eden Mastadenovirus genusu, kuşları enfekte eden Aviadenovirus, geniş bir konakçı spektrumuna sahip olan Atadenovirus ve Turkey adenovirus 3 ile frog adenovirus 1'i içeren Sialadenovirus olmak üzere 4 genusu içermektedir. Her ne kadar adenoviruslar aynı morfolojiye sahip-lerse de, çeşitli genuslar içerisindeki viruslar arası genomik organizasyonlar farklılık gösterebilmektedir [2].

Mastadenovirus genusu içerisinde cinsler antijenik ve genom karakterlerine göre belirlenmekte olup, her bir virus, CAV 1 ve CAV 2'de olduğu gibi konakçı tipine ve seri numarasına göre isimlendirilmiştir. Restriksiyon endonükleazlarla haritalama (Restriction Endonuclease Mapping) ve genomik DNA'nın sekanslanması, viral suşların kesin olarak kategorize edilmesi için kullanışlı olduğu doğrulanmıştır ve genelde bu sonuçlar serolojik çapraz reaksiyonlara dayanan kategorizasyon sonuçları ile uyum göstermektedir [14]. Ailelerin genel yapıları,

virüslerin moleküler karakterlerine göre yeniden yapılandırıldıktan sonra, virüslere ait immunolojik ilişkilerin temeli daha açık hale gelmiştir. Serotipler, nötralizasyon testi ile suşlar arasında çapraz reaksiyon titre oranları göstermesi ile tanımlanır [2].

Adenovirus virionları, zarfsız, tam olarak hexagonal iskeletle birlikte ikozahedral simetriye sahip ve 70-90 nm çapındadır. Virionlar, ikozahedronların 20 eşkenar üçgen yüzeyinin kenar ve yüzlerine tutunan 240 hexon ve vertekse tutunan 12 penton olmak üzere 252 kapsomerden oluşmuştur. Viral genom, 26-45 kbp büyüklüğünde olan çift iplikçikli tek linear DNA molekülüdür ve viral genom, yaklaşık 40 protein sentezler [2,11].

Birçok adenovirus, kırmızı kan hücreleri ile aglütine olur. Hemagglütinasyon, penton fiber uçları, hücresele reseptörlere bağlandığında ve hücreler arası köprü formu oluştuğunda meydana gelir [2,14].

Adenoviruslar çevrede göreceli olarak stabildirler ancak ortak dezenfektanlar ile kolaylıkla inaktive edilirler [2,14]. Birçok adenovirus akut solunum ve gastroenterik hastalığa neden olmaktadır [2]. Bunun yanında bazıları, equine adenovirus 1'de olduğu gibi immünsüpresyonla birlikte reaktif olabilen persiste enfeksiyona neden olmaktadır. İnsan, sığır ve tavukların bazı adenovirusları, yeni doğan hamsterlere inokule edildiğinde tümöre neden olur ve deneysel onkogeneze çalışmalarında kullanılmıştır. Bununla birlikte, bu virüsler doğal konakçıda tümöre neden olmazlar [14].

Adenoviruslar çekirdek içinde replike olurlar ve replikasyonları, konakçı immun yanıtının kapsamlı modülasyonu (değişimi) aracılığı ile kolaylaştırılır. Virüsler konakçı hücre reseptörlerine penton fiber topuzları aracılığı ile bağlanır ve takip eden internalizasyona (endositoz) hücresele integrinler ve penton bazları arasındaki etkileşim aracılık eder. Sonrasında, dış kapsit ayrılır ve ilişkili histonları ile birlikte viral genomu içeren kor, messenger RNA(mRNA) transkripsiyonu, viral DNA replikasyonu ve virionun toplanmasının meydana geldiği yer olan çekirdeğe girer [2,14].

Çekirdek içinde genom, her iki DNA iplikçliğini içeren kompleks bir programa göre hücresele RNA polimeraz II aracılığı ile transkribe olur. Burada, beş erken (E) transkripsiyonel ünite (E1A, E1B, E2, E3 ve E4), iki ara ünite (IX ve IVa2) ve geç mRNA'la-

rın 5 ailesinden (L1-L5) bir geç (L) ünite transkribe olur [2,14].

Viral genomun E1A bölgesi, erken adenovirus transkripsiyonunun 3 ana sonucu için esansiyel olan proteinleri kodlar. Bunlar, [1] virus replikasyonu için optimal koşul sağlayan hücre-siklus dizisinin (DNA sentezi) indüksiyonu, [2] enfekte hücrenin konakçı antiviral savunmadan korunması (tümör nekrozis faktör (TNF) aktivitesi ve apoptozis gibi) ve [3] viral DNA replikasyonu için gerekli viral proteinlerin sentezidir [2,14].

E1A ve E1B gen ürünleri hücre transformasyonundan da sorumludur ki böylece bazı adenovirusların onkojenitesinden (deneysel) sorumludur. Her iki protein hücresele tümör baskılayıcı gen olan p53'ü inaktive eder ve böylece hücre siklus dizisini yani DNA sentezini deregüle eder [2,14].

DNA replikasyonundan sonra geç mRNA'lar transkribe olur, bunlar yapısal proteinlere transle olurlar. Bütün adenovirusların geç kodlanan bölgeleri ortak bir protomerden transkribe olur ki bu geç major protomerdir. Birincil transkript 29 kb büyüklüğündedir, geç birincil transkriptin alternatif splicingi ile en az 18 farklı mRNA üretilir. Konakçı makromoleküler sentezinin kapanışı, replikasyon siklusunun ikinci yarısında meydana gelir. Virionlar, kristalin dizinleri formunda olduğu yer olan çekirdek içinde toplanır. Birçok adenovirus, nükleusun anormal görünüşünü veren konakçı hücre şiddetli marjinalasyonu ve yoğunlaşmasına neden olur. Bu, adenovirus enfekte hücrelerde karakteristik inkülyasyon cisimciklerinin temelini oluşturur. Virionlar hücrelerin lizisi ile serbest kalır [2,14].

E3 bölgesi hücre kültüründe adenovirusların replikasyonu için esansiyel değildir ve in vitro olarak virus replikasyonunun bozulmasına sebep vermeden yer değiştirilebilir veya çıkarılabilir. Bu şekilde, adenovirus vektörlerinin yapılandırılmasında yabancı bir DNA için eklenme yerlerinden biridir. E3 proteinlerinin, konakçı immun savunması ile etkileşim halinde olduğu, böylece adenovirus enfeksiyonlarında konakçı yanıtın değiştiği bilinmektedir [2,14]. Bu özelliklerinden dolayı adenoviruslar, yabancı bir DNA'nın dağıtımında vektör olarak oldukça yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Rekombinant adenovirus vektörleri içinde yabancı genlerin ekspresyonuna örnek olarak; pseudorabies virus gD

protein, Epstein-Barr virus glikoproteini, vesicular stomatitis virus yapısal glikoproteini, rotavirus VP4, kuduz virus glikoproteini, bovine parainfluenza virus 3 glikoproteini, feline immunodeficiency virus zarf glikoproteini, porcine respiratory ve reproductive syndrome virus glikoproteini, human hepatitis B virus yüzey antijeni, polyomavirus T antijeni ve kızamık virus füzyon proteini verilebilir [14].

CAV 1 ve CAV 2 arasında genetik antijenik ilişki ve çapraz koruma olmasına rağmen, restriksiyon endonükleazlarla yapılan analizlerde iki virusun genetik olarak farklı olduğu gösterilmiştir [3, 13, 17]. Bununla birlikte, iki virus arasındaki nükleotit benzerliğinin %75 olduğu bildirilmiştir [3].

Bulaşma ve Yayılma

Adenovirusların çoğunun konakçı aralığı sınırlıdır [2,14]. Ancak enfeksiyöz canine hepatitise neden olan CAV 1 kurt, ayı, tilki, kokarca ve çakallarda epizootilere neden olmaktadır [2,14,17]. CAV 2 geniş bir memeli konakçı aralığına sahiptir. Vahşi hayvanlar evcil köpekler için enfeksiyon kaynağı olabilirler [3].

Her iki virus da enfekte ve iyileşmiş köpek dışkı ve idrarı ile saçılır [6,13,17] ve bu şekilde enfekte köpeklerin kontamine akıntılarının oranasal yol ile alınımı hastalığın başlıca bulaşma yoludur [3,14,17].

CAV 1 ile böbreğin enfeksiyonu, idrar ve salya ile hastalığın yayılmasının başlıca yolu olan viruria ile ilişkilidir [2]. İyileşmiş köpekler, idrarları ile virusu 6 aya kadar saçabilirler [2,11,17]. Ayrıca, aşılanmış hayvanlar da virusu çevreye saçabilmekte ve bu faktörler çevrede virus yükü oluşmasına neden olmaktadır [11].

CAV enfeksiyonları, %30-%82 arasında değişen seropozitiflik oranları ile tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir. Okuyan tarafından 1975 yılında Türkiye’de köpeklerde ilk defa ICH bildirilmiştir [11, 17]. Türkiye’de CAV enfeksiyonlarının serolojik olarak tespit edilmesine yönelik yapılan çalışmalarda, Kars ve çevresinde, daha önceden CAV aşısı yapılmadığı bilinen, herhangi bir klinik belirti göstermeyen, 94 adet bir yaşın üzerinde Kars çoban köpeğinde CAV seropozitifliğinin %65,95 (62/94) [17]; Eskişehir ve Konya’da Kangal (n=11), Akbaş (n=17) ve Greyhound (n=15) cinsi ve daha

önceden CAV’e karşı aşılanmadığı bilinen köpeklerde seropozitifliğin sırasıyla %88,2, %93,3 ve %100, Afyon Belediye barınağında barınan 51 köpekte ise %82,3 olduğu bildirilmiştir [11].

Klinik Bulgular

Birçok ülkede CAV 1 enfeksiyonu aşılama ile çok iyi kontrol edilmektedir [2, 14] ve aşılanan birçok enfeksiyon asemptomatik veya ayırt edilemeyen solunum yolu enfeksiyonu olarak ortaya çıkmaktadır. Bazı olgularda, özellikle immun olarak uyarılmamış olan konakçıda, enfeksiyon, solunum sisteminde başlayarak sistemik enfeksiyona doğru ilerler [2,13,14]. Sık karşılaşılmamakla beraber Ensefalit; letarji, ataksi, körlük ve kusma ile seyrederek kısa sürede ölüme neden olabilmektedir [4,5]. Kanama eğiliminden dolayı, ağızda hematomlar görülebilir [4]. Sistemik enfeksiyon, çoğunlukla 6 ay yaştan daha küçük köpeklerde görülen ve üst üste gelen üç sendroma bölünebilir. Bunlar; [1] hastalık anlaşılmadan veya hastalığın görülmesinden sadece 3-4 saat sonra yavru köpeğin ölü bulunduğu perakut hastalık; [2] ateş, depresyon, iştah kaybı, kusma, kanlı ishal, dış etinde peteşiyel kanama, solgun mukoz membranlar ve ikterus ile ortaya çıkan ölümün şekillenebildiği akut hastalık ve [3] canlı modifiye aşılama ile olabilen tamamlanmamış veya kısmi immunité sonucunda olabilen orta dereceli hastalıktır [2,14].

Akut hastalık için inkübasyon periyodu, 4-9 gündür [2,14]. Klinik belirtileri; ateş, iştahsızlık, yaygın hemoraji, abdominal ağrı, kusma, ishal ve daha az sıklıkta dispne, apati, anoreksi, artan susuzluk, şişerek ortaya çıkan karaciğerin arka kısmına yapılan palpasyon ile kendini gösteren abdominal ağrıdır [2,6,14,15]. Ek olarak, nazal ve okuler akıntı da göze çarpan bulgular arasındadır [7,15]. Korneal opozite (mavi göz) ve intersitisyel nefrit, immun komplekslerin sirkülasyonu ile birikimi sonucu meydana gelebilir [4,15]. Klinik belirtilerin kaybolmasından sonra 7-10 günler arasında teşhis açısından yararlı olan ve genellikle spontan olarak ortadan kaybolan karakteristik bileteral korneal opozite, etkilenen hayvanların %25’inde şekillenebilir (Şekil 1) [2,11,14]. Taşikardi, lökopeni, uzamış pıhtılaşma zamanı ve yaygın intravaskular koagülasyon vardır. Bazı olgularda, süt dişlerinin etrafında kanama ve spontan hematomlar gibi hemorajiler

görüldür [2,14]. İyileştikten sonra köpekler iyi beslenseler dahi kilo almaları yavaştır [14].



Şekil 1. Bilateral korneal opozite

Son yıllarda gözlenen CAV enfeksiyonlarının, CDV (Canine Distemper Virus) ve CCoV (Canine Corona Virus) gibi diğer patojenlerle birlikte seyrettiği bildirilmiştir. Böyle olgularda, hastalığın yönü, artan mortalite oranları ile ciddi olabilmektedir [7]. Decaro ve ark. (2007) tarafından yapılan bir çalışma ile de CDV, CPV 2 (Canine Parvovirus Type 2) veya CCoV ile mix seyreden CAV 1 enfeksiyonlarının daha şiddetli seyrettiği ortaya konmuştur.

Tilkilerde ise Canine Adenovirus 1 başlıca, merkezi sinir sistemi hastalığına neden olur. Enfekte hayvanlar hastalık süreleri boyunca aralıklı görülen konvülsiyon sergileyebilir. Son olarak bir veya daha fazla kol ve bacakta paraliz oluşabilir [2,14].

CAV 2 enfeksiyonu, CAV 1 veya 2 ile bağışık olmayan köpeklerde yaygın olarak ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, pet satışı yapılan yerlerde yavru köpekler ve laboratuvar hayvanlarının solunum yollarında CAV 2 taşıyıcısı oldukları bulunmuştur [3]. CAV 2 solunum yolu enfeksiyonudur ve genellikle fark edilmeyen veya orta dereceli hastalığa neden olur [4]. CAV 2 enfekte hayvanlarda solunum hastalığı, çoğunlukla bronşit ve bronşiolitis ile karakterizdir [2]. Bununla birlikte, aniden ortaya çıkan değişen ekspirasyon ile birlikte görülen nöbet şeklinde öksürük ve nasovasküler akıntı ile karakterizedir [6]. CAV 2 aynı zamanda, enteritis vakalarında ve nörolojik semptomlar gösteren köpek beyninde belirlenmiştir [3]. Enfeksiyonu atlatan yavru köpeklerde bronchitis obliterans kalıcı olabilir [11].

Doğal salgınlar üzerine yapılan birçok çalışma ile Kennel Cough sendromunun, çeşitli bakteri ve virusları (canine parainfluenza virus, canine adenovirus, *Bordetella bronchiseptica*, mycoplasmas, *Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus* gibi) içeren kompleks bir etiolojisi olduğu gösterilmiştir [3,9]. CAV 2 enfeksiyonu genellikle, rehabilitasyon merkezleri, hayvan hastaneleri ve barınak gibi köpeklerin gruplar halinde bulunduğu yerlerde sıklıkla görülen Kennel Cough sendromunun (acute respiratory disease of canines, infectious canine laryngotracheitis, canine infectious respiratory disease (CIRD) potansiyel nedenlerinden biridir [2,3,4,9].

Patogenez ve Patoloji

Her iki virus, genetik ve antijenik benzerlik göstermelerine karşın, farklı doku tropizmlerine sahiptirler ve patojeniteleri farklılık gösterir [3,7,12]. CAV 1'in başlıca hedefi endotel, hepatosit ve renal parankim hücreleri iken, CAV 2'nin başlıca hedefi solunum yolu epitelyum hücreleri ve sınırlı oranda intestinal epitelyum hücreleridir [3]. CAV 1, veziküler endotel hücreleri ile hepatositlerde replike olur ve yaşlılara oranla gençlerde daha ciddi klinik tablo ile seyreden akut nekrohemorajik hepatitise neden olur [7,15]. CAV 2 ise solunum epitelinde replike olmakla birlikte [15], bunun enterik bir patojen olabileceği de belirtilmiştir [12].

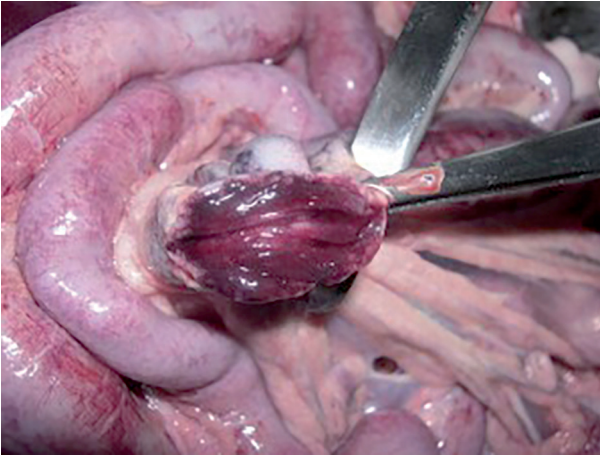
CAV 1 nazofarangingal, oral ve konjunktival yollarla giriş yapar. İlk enfeksiyon tonsiller kriptlerde ve Peyer plaklarında başlar, bölgesel lenf düğümlerine yayılır ve torasik kanal (left lymphatic duct) ile kana geçer. Viremi, virusun başlıca karaciğer, böbrek, dalak ve akciğer olmak üzere organlarda hemoraji ve nekroza neden olan, paransim ve endotelial hücrelerinin enfeksiyonu ile sonuçlanır [2,14].

CAV 1, CAV 2'den daha az öneme sahip olmasına rağmen, akut solunum hastalığının da (acute respiratory disease) nedenlerinden biridir. Hastalığa ismini veren sendrom olan canine infectious hepatitis, perakut ölüm ile sonuçlanan, hepatositlerin yaygın bir şekilde yıkımını içerir [2].

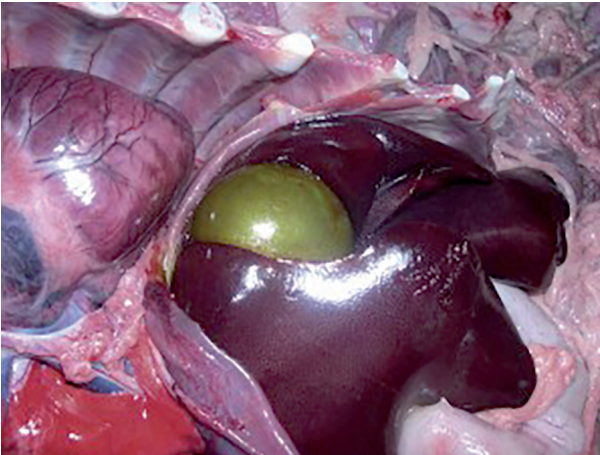
Doğal enfeksiyonu takip eden iyileşme döneminde ve CAV 1 attenüe aşısı ile aşılandıktan 8-12 gün sonra korneal ödem ortaya çıkabilir. Özellikle aşılanmadan sonra klinik olarak önemli derecede ve korkulan bir olgu olan ödem genellikle birkaç gün içinde ortadan kaybolur. Ödem, kornea içindeki

normal sıvı değişiminin engellenmesine neden olan siliar cisimciklerin, küçük kan damarları içinde depolanması ile şekillenen virus antikör komplekslerinden (tip III immun kompleks hipersensivite) dolaydır [2].

Patolojik bulgular enfeksiyonun klinik seyirine bağlıdır. Hızlı klinik bir seyir, seröz yüzeylerde multifokal ekimotik hemoraji ve diffuz peteşilerle birlikte, süperfisiyel lenf düğümlerinde hemoraji ve ödem ile sonuçlanır (Şekil 2). Abdominal viseranın serozal yüzeyinde fibrin birikimi ve dalak parankiminin lekelenmesi ile birlikte karaciğer ve dalak büyür. Safra kesesi duvarı karakteristik olarak kalınlaşmış ve ödematözdür (Şekil 3) [2].

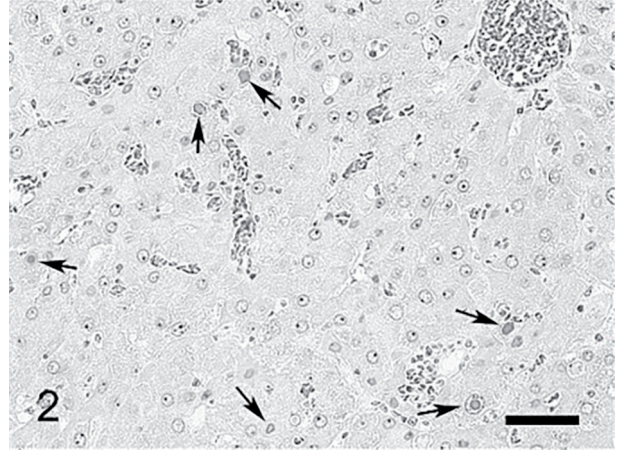


Şekil 2. Lenf düğümünde hemoraji ve büyüme ile kendini gösteren ödem



Şekil 3. Safra kesesi duvarında kalınlaşma ve ödem

Akut enfekte yavru köpeklerde histolojik hepatik bulgular, multifokal hepatik nekroz ve bazen yaygın intravasküler koagülasyon sonucu olan centrilobular hepatik nekrozu içerir. İntranükleer inklüzyon cisimcikleri Kupffer hücreleri ve hepatositler içinde olabilir. Viral inklüzyonlar, etkilenen hayvanların böbreklerindeki endotel hücrelerinde de meydana gelebilir. Tipik olarak, yaygın intravasküler koagülasyon gelişen köpeklerde intravasküler tromboz ile ilişkili yaygın hemoraji ve nekroz vardır (Şekil 4) [2].



Şekil 4. Hepatositlerde intranükleer inklüzyon cisimcikleri

CAV 2, nonsiliar bronşiyolar epitelyum hücrelerinde, nazal mukoza yüzey hücrelerinde, farenks, tonsiller kript, trake ve periferik glandların bronşçuk mukoz hücreleri ve tip II alveolar epitelyum hücrelerinde replike olur. Bu dokulara ek olarak, virus retrofaringeal ve bronşiyal lenf nodülleri kadar mide ve bağırsaktan da izole edilebilir. Enfeksiyondan 3-6 gün sonra replikasyon pik seviyeye ulaşır ve antikör yanıtına bağlı olarak virus miktarı gittikçe düşer. Solunum sistemi belirtileri bronşiyal epitelyum hücrelerinin zarar görmesine bağlıdır ve tip II alveolar epitelyum hücrelerinin enfeksiyonu interstisyel pnömoni ile ilişkilidir [3].

Teşhis

CAV 1 ve CAV 2'nin teşhis ve identifikasyonu genellikle, zahmetli ve oldukça zaman alan virus izolasyonuna dayanır [15]. CAV enfeksiyonlarının belirlenmesinde günümüz metotları; hemotoloji-

kal bulgular, virus izolasyonu ile immunofloresan teknikler ve indirekt hemaglutinasyon testlerini içeren çeşitli serolojik testlere de dayanmaktadır [2,6]. Ayrıca, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), elektron mikroskop, serum nötralizasyon (SN) ve komplement fizyasyon test gibi birçok metot vardır [13,17].

Burun ve boğaz swabları virusun izolasyonu için uygundur ve izolasyon primer köpek böbrek hücresi [3] ile canine orjinli (Madin Darby Canine Kidney Cell gibi) birçok hücre hattında gerçekleştirilir [2]. ICH salgınlarından toplanan örneklerde, virus izolasyonunda kullanılan MDCK hücrelerinde, gözle görülür bir şekilde, enfekte hücrelerin demetler halinde yuvarlaklaşması ve monoleyar yapıdan ayrılma ile karakterize cpe'ler 1. ve 2. pasajlarda ortaya çıkmaktadır [7]. Sitopatoloji birçok olguda 24-48 saat içinde gerçekleşir ve karakteristik intranükleer inklüzyon cisimciklerinin görülmesine ek olarak virus, immunfloresan ve/veya immunohistolojik olarak tanımlanabilir. Bunlara ek olarak, CAV 1 enfeksiyonlarında virus, renal tubüllerdeki epitelium hücrelerinde persiste olarak kalır ve bu şekilde, klinik belirtilerin ortadan kaybolmasından sonra aylarca idrardan izole edilebilir [2].

Viral DNA direkt olarak polimeraz zincir reaksiyonu ile tespit edilebilmektedir [2]. PCR analizi, virus izolasyonu ve immunolojik analizler gibi konvansiyonel metotlardan daha duyarlı, hızlı ve spesifik bir metottur [6]. Enfeksiyon, özellikle sindirim yolunda şekillendiğinde, CAV 1 ve CAV 2'nin hemaglutinasyon ve nötralizasyon testleri ile ayrımı zor olabilmektedir [13, 15]. Bu nedenle PCR tekniği, iki virusun ayrımının hızlı bir şekilde yapılmasında oldukça uygun bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır [13]. PCR gibi nükleik asidi tespit eden sistemlerin gelişi ile birlikte, yalnızca CAV enfeksiyonlarının tespiti değil ayrımı da mümkün olmuştur [3,6,12]. PCR tekniğinin virus izolasyonuna göre daha duyarlı olduğu da gösterilmiştir [12].

CAV 1 ve CAV 2 enfekte köpeklerin postmortem muayenesi sonrası toplanan doku örneklerinde virus, PCR ile başarıyla tespit edilebilmektedir. Bununla birlikte, idrar ve dışkıda bulunan, inhibitör olan maddeler, virusun belirlenmesinde PCR testinin sensitivitesini sınırlayabilmektedir. Bu tür inhibitör maddelerin elemine edilmesi için immunoman-

yetik seperasyon, jel filtrasyon ve ısı tedavisi gibi çeşitli örnek hazırlama metotları kullanılmıştır [6].

Dışkı örneklerinden CAV 1 ve CAV 2'nin tespit ve ayrımının yapılmasında, dışkıda bulunan bazı inhibitör maddeler adenovirusların tespitini engellemektedir. Ancak kloroform tedavisi ile bu maddelerin aktivitesinin engellendiği bildirilmiştir [6]. Yine aynı örneklerde yer alan diğer mikroorganizma genomları da CAV'ların tespit edilmesinde bir engel teşkil etmekte olup, PBS içinde süspanse halde bulunan dışkının filtrelenmesi, DNA ekstraksiyonu öncesinde, PCR testi için uygun bir numune hazırlanmasında, diğer mikroorganizmaların elemine edilmesi için kullanışlı bir yöntemdir [13].

Enfekte, subklinik enfekte veya iyileşmiş köpeklerin idrar ve dışkıları, CAV 1 ve CAV 2 için önemli enfeksiyon kaynağıdır ve CAV enfeksiyonlarının idrar ve dışkıda tespit edilmesi ile sağlıklı köpeklerle enfeksiyonun yayılımı engellenebilir. PCR kullanılarak, köpek adenoviral enfeksiyonlarının belirlenmesinde, belirleme limiti idrarda 16 TCID50 virus, dışkıda ise 1.6 TCID50 virus olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, idrar ve dışkıda, PCR ile canine adenovirus enfeksiyonlarının taranmasının, epidemiyolojik survey çalışmalarının yürütülmesinde kullanılabileceği belirtilmiştir [6].

Bağışıklık ve Mücadele

Enfeksiyonu geçiren annelerden maternal antikorları alan yavruların, 9-12 aylıktan önce aşılama, anneden gelen bu antikorlar nedeniyle yavruların aşılama sonrası aktif bağışıklık geliştirmesini engellemektedir [2, 3]. Nötralizan antikorların gelişimi direkt olarak immun savunma ile ilişkilidir ve yüksek nötralizan antikor seviyesine sahip köpekler, klinik hastalığa karşı korunmaktadır. Oluşan nötralizan antikor seviyesi hastalığa karşı korunma ile ilişkilidir [3]. Birçok üretici tarafından 6 ayda bir yapılan aşılama önerilmektedir [2]. ICH enfeksiyonu geçiren köpeklerde ömür boyu bağışıklık oluşmaktadır [4].

CAV enfeksiyonları dünyaca yaygın olarak görülmele birlikte, aşılamanın pratik olarak yapıldığı yerlerde nadir olarak görülmektedir [4]. İnaktif ve attenüe aşılar uzun yıllar geniş çaplı olarak kullanılmıştır. CAV 1 ve CAV 2 arasındaki antijenik yakınlık nedeniyle, CAV 1 hem ve CAV 2 aşılarının birbirlerine karşı çapraz koruma özellikleri vardır [3].

Bunun yanı sıra, korneal ödeme neden olmaması avantajına sahip olan [2] CAV 2 attenüe ve ölü aşıların, CAV 1 enfeksiyonuna karşı köpekleri klinik olarak koruyabildiği [3, 12] ve köpek popülasyonlarında virus sirkülasyonunun canlı modifiye CAV 2 aşıları ile etkili bir şekilde azaltıldığı ispatlanmıştır [13].

CAV 1 ve CAV 2 arasındaki esansiyel farklılık, CAV 1'in sistemik hastalığa neden olması, CAV 2'nin ise yalnızca solunum hastalığı ile sınırlı olarak kalmasıdır. Bu farklılığın moleküler temeli belirsiz kalmıştır, fakat bu özellik köpeklerin aşılması için kullanılmaktadır. Spesifik olarak CAV 1 canlı attenüe aşıları, aşı virusunun sistemik olarak replike olabilme yeteneğinden dolayı bazen mavi göz ile sonuçlanırken, CAV 2 aşıları sistemik olarak replike olamamaktadır. Bununla birlikte, CAV 2 aşıları CAV 1 tarafından başlatılan hastalığa karşı tam anlamıyla homolog ve çapraz koruma sağlamaktadır [2].

CAV 1 aşılarının yan etkileri bulunduğundan dolayı, ICH önlenmesinde alternatif olarak CAV 2 aşıları geliştirilmiş ve kullanılmaktadır. Yaygın bir şekilde aşılamanın, köpek popülasyonunda ICH olgularını giderek azalttığı da bildirilmiştir [7]. Yapılan çalışmalarla, CAV'lara karşı aşılanan köpeklerde canine adenovirusun hiçbir tipinin tespit edilmediği, bu şekilde, hastalığa karşı yapılan aşılamanın hastalığın kontrol ve eliminasyonu için gerekli olduğunu kanaatine varıldığı bildirilmiştir [13].

Veteriner pratikte, yıllarca aşılamanın yapıldığı bölgelerde enfeksiyöz canine hepatitisin hemen hemen ortadan kaybolmasının temelinde, aşılanan köpekler vasıtasıyla aşı virusunun çevreye saçılması ile attenüe virusun çevreye bir nevi ekilmesi ve diğer köpeklerin sekonder olarak bağışıklanmasıyla sürü bağışıklığının yüksek seviyede yapılandırılmasının olduğu belirtilmiştir [2]. Ayrıca, uzun yıllar aşılama programlarının uygulandığı bölgelerde, sekonder aşılama olmadan dolayı ICH klinik vakaları görülmemektedir [11].

Uzun yıllardır yetişkin köpeklerin enfeksiyöz hastalıklardan korunmasında, 6 aylık rapel aşılama dayanan protokoller takip edilmiştir. Geçtiğimiz yıllarda, uygulanan bu protokol, aşıların potansiyel yan etkilerinin var olması ve uygulanan gele-

neksel aşılama programlarını destekleyen bilimsel kanıtların yetersizliğinin göz önüne alınması ile bir soru haline gelmiştir. Ayrıca birçok araştırmacı ve immunolojist, aşılama ile uyarılan bağışıklığın bir yıldan uzun sürdüğünü immunolojik ve serolojik olarak göstermişlerdir [10]. Yapılan bir çalışma ile ticari multivalan [Canine Distemper Virus, Canine Adenovirus Tip 2, Canine Parvovirus Tip 2b, ve Canine Parainfluenza Virus) modifiye canlı aşı ile subkutan aşılanan 7-8 haftalık köpek yavrularının, aşılama sonrası 55-57 aylarda yapılan challenge çalışması ile en az 4 yıllık bir bağışıklık süresinin koruyucu düzeyde olduğu bildirilmiştir [1]. Başka bir çalışma ile Canine Adenovirus Tip 2, Canine Parvovirus (CPV) ve Canine Distemper Virus (CDV) içeren modifiye canlı aşı ile ikinci aşılama sonrası 3 yıl sonra, aşılama sonrası virulent virus ile karşı karşıya kalmasına bağlı olarak aşı koruyuculuğunun belirlenmesine (challenge of immunity) yönelik olarak, 7-11 hafta yaşta aşılama sonrası 3 yıl boyunca izole bir yerde tutulan 33 seronegatif köpeğin, virulent Canine Adenovirus Tip-2, Canine Parvovirus (CPV) ve Canine Distemper Virus (CDV)'a maruz bırakıldığı ve aşılama sonrası tüm hayvanlarda her üç virusa karşı %100 koruma sağlandığı bildirilmiştir [10].

Sonuç

Canine adenovirus enfeksiyonları özellikle köpek yavrularında ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Ayrıca, CAV 2'nin Kennel Cough sendromunun önemli etkenlerinden biri olması ve CAV 1'in CaCoV, CDV, CPV-2 gibi diğer etkenlerle birlikte seyretmesi, bu enfeksiyona yakalanan hayvanlarda mortalite oranlarını yükseltmesi nedeniyle bu hastalıklara karşı uygulanacak aşıların kombine geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Türkiye'de canine adenoviral enfeksiyonların yayılımına ilişkin yapılan çalışmalar olsa dahi, ülke genelinde hastalıkların yaygınlığı hakkında tam bir bilgi yoktur. Ayrıca, adenoviral enfeksiyonlara karşı programlı bir aşılama yürütülmemekte ve özel kliniklerde hayvan sahiplerinin isteğine bağlı yapılan tüm aşılar yurt dışından ithal edilmektedir. Türkiye'de sirküle olan adenoviruslar genetik olarak tanımlanmamıştır. Tüm diğer viral etkenlerde olduğu gibi sahada sirküle olan virusun genetik olarak tanımlanması ve varsa farklılıkların hem moleküler hem de serolojik

olarak gerek çapraz nötralizasyon gerekse challenge çalışmaları ile belirlenmesi vasıtasıyla, CAV enfeksiyonları ile mücadele daha etkili programlar ortaya konacaktır.

Kaynaklar

1. Abdelmagid OY, Larson L, Payne L, Tubbs A, Wasmoen T, and Schultz R, (2004). *Evaluation of the efficacy and duration of immunity of a canine combination vaccine against virulent parvovirus, Infectious Canine Hepatitis Virus, and Distemper Virus experimental challenges*. Veterinary Therap. 5(3),173-86.
2. Barthold SW, Lairmore MD, Bowen RA, Parrish CR, Hedrick RP, Saif LJ, Knowles DP, Swayne DE, (2011). *Adenoviridae*. MacLachlan NJ, Dubovi EJ, eds. Fenner's Veterinary Virology. London Academic Press, s.203-212.
3. Buonavoglia C, Martella V, (2007). *Canine respiratory viruses*. Review article. Vet res, 38, 355-373.
4. Carter GR, Wise DJ, Flores EF, (2005). *Adenoviridae*. In: A concise review of veterinary virology. International Veterinary Information Service, Ithaca NY Erişim adresi: <http://www.libyanvet.com/Books/13%20Adenoviridae.pdf>. Erişim tarihi: 20.02.2016
5. Caudell D, Confer AW, Fulton RW, Berry A, Saliki JT, Fent G. M, Ritchey JW, (2005). *Diagnosis of infectious canine hepatitis virus (CAV 1) infection in puppies with encephalopathy*. Journal of Veterinary Diagnostic, 17, 58-61.
6. Chaturvedi U, Tiwari AK, Ratta B, Ravindra PV, Rajawat YS, Palia SK, Rai A, (2008). *Detection of canine adenoviral infections in urine and faeces by the polymerase chain reaction*. Journal of Virological Methods, 149, 260-263.
7. Decaro N, Campolo M, Elia G, Buonavoglia D, Colaianni ML, Lorusso A, Mari V, Buonavoglia C, (2007). *Infectious canine hepatitis: An "old" disease reemerging in Italy*. Research in Veterinary Science, 83,269-273.
8. Ditchfield J, MacPherson LW, Zbitnew A, (1962). *Association of a canine adenovirus (Toronto A26/61) with an outbreak of laryngotracheitis (kennel cough)*. Canadian Veterinary Journal, 3,238-24.
9. Erles K, Dubovi EJ, Brooks HV, Brownli J, (2004). *Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease*. Journal Of Clinical Microbiology, 42(10), 4524-4529.
10. Gore TC, Lakshmanan N, Duncan KL, Coyne MJ, Lum MA, and Sterner FJ, 2005. *Three-year duration of immunity in dogs following vaccination against Canine Adenovirus Type-1, Canine Parvovirus, and Canine Distemper Virus*. Veterinary Therapeutics, 6(1), 5-14.
11. Gür S, Acar A, (2009). *A retrospective investigation of Canine Adenovirus (CAV) infection in adult dogs in Turkey*. S Afr Vet Ver, 80(2), 83-86.
12. Hu RL, Huang G, Qiu W, Zhong ZH, Xia X Z, Yin Z, (2001). *Detection and differentiation of CAV 1 and CAV 2 by polymerase chain reaction*. Veterinary Research Communications, 25, 77-84.
13. Mohammadı A, Masoudian M, and Nematı Y, (2011). *Evaluation of PCR techniques for detection and differentiation of Canine Adenoviruses in faecal samples in Shiraz, Iran*. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 14(4), 247-251.
14. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ, (1999). *Adenoviridae*. Third Edition. Veterinary Virology. Academic Press. s. 327-334.
15. Parthiban M, Kumanan K, Sunder K, Senthil Kumar S. and Kathiresan D, (2009). *Molecular detection of Canine Adenovirus using Polymerase Chain Reaction and sequencing*. Tamilnadu J Veterinary & Animal Sciences, 5(4), 140-142.
16. Rubarth S, (1947). *An acute virus disease with liver lesions in dogs (hepatitis contagiosa canis): a pathologico-anatomical and etiological investigation*. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica, 69, 9-207.
17. Yıldırım Y, Kırmızıgül AH, Gökçe E, (2009). *Seroprevalence of Canine Adenovirus (CAV) infection in Kars dogs in Turkey*. YYU Veteriner Fakültesi Dergisi, 20 (1), 37-39.

Batı Nil Virüs Enfeksiyonu

Eda Dinç, Yakup Yıldırım

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Burdur

Geliş Tarihi / Received: 15.08.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 28.10.2016

Özet: Batı Nil Virüsü (BNV) kanatlılar, atlar, insanlar ve diğer memeli hayvanlarda nöropatik hastalıklara neden olan, eklem bacaklılarla (arthropotlarla) nakledildiği için arbovirus olarak tanımlanan *Arthropod Borne* virus sınıfındadır. Doğal yaşam döngüsü *Culex* cinsi sivrisinekler ile evcil ve yabani kuşlar arasında olan etkenin, atlar başta olmak üzere insanlar ve diğer memeliler düşük viremi seviyesi ile rastlantısal konaklarıdır. Özellikle son yıllarda baraj göllerinin artması ve sulu tarım yapılan alanların yaygınlaşması sonucu, sokucu sinek popülasyonlarındaki artışa bağlı olarak bunlar aracılığı ile aktarılan çeşitli insan ve hayvan enfeksiyonlarındaki artış dikkat çekici boyutlara ulaşmıştır. Yapılan bu derlemede insan ve hayvan sağlığı açısından önemli olan BNV enfeksiyonu ile ilgili bilgiler verilmiştir.

Anahtar kelimeler: Batı Nil Virüsü(BNV), arbovirus

West Nile Virus Infection

Abstract: West Nile Virus (WNV), poultry, horses, humans and other mammals causing neuropathic diseases, by arthropods (with robot that arhat) as defined for arbovirus transmitted is class Arthropod Borne Virus. Flavivirus is located in the Flaviviridae family. Factor between domestic and wild birds, the natural life cycle of the *Culex* species of mosquitoes, people, especially horses and other mammals are incidental hosts with a low level of viremia. The WNV infection and many arbovirus infections, symptoms and medical history information while helping to diagnosis, laboratory tests should be done with a certain diagnosis. Particularly the increase in recent years in the reservoir as a result of the expansion of the area under irrigation due to the increase in biting fly populations, the increase in human and animal infection transmitted through them reached remarkable sizes. Due to the lack of a safe and effective WNV vaccine, precautions should be taken in the social and individual levels to be kept under control and to prevent the disease. Information about this study that are important for human and animal health WNV infection is provided.

Key words: West Nile Virus (WNV), arbovirus

Giriş

Batı Nil virüsü ilk kez 1937 yılında Uganda'nın kuzeyindeki Batı Nil bölgesinde 37 yaşında ateşli hastalık geçiren bir kadının serumunda tespit edilmiştir [77]. Batı Nil Virüsü (BNV) kanatlılar, atlar, insanlar ve diğer memeli hayvanlarda nöropatik hastalıklara neden olan, eklem bacaklılarla (arthropotlarla) nakledildiği için arbovirus olarak tanımlanan *Arthropod Borne* virus sınıfındadır. Arboviruslar arasında *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Reoviridae* ve *Rhabdoviridae* virus ailesinde yer alan 500'ün üstünde virus bulunmaktadır. BNV günümüzde yeniden güncellik kazanmış olan, doğal yaşam döngüsü kanatlılar ve sivrisinekler arasında süregelen bir RNA virusudur [57,59].

Batı Nil Virüsü 300'ün üstünde kuş türü ve enfekte kuşları ısırarak sivrisinekler tarafından doğada taşınır. Virusun doğal geçişi, arthropod-enfekte kuşlar-arthropod döngüsüyle meydana gelmektedir.

Kuşlar etkenin replike olduğu birincil konaklardır. Özellikle kırlangıç, güvercin, tavuk ve kazlar da yüksek prevalans söz konusudur [27]. BNV doğada özellikle *Culex* cinsi sivrisinekler ile evcil ve yabani kuşlar arasında sirküle olmaktadır [25,26]. Virusun doğal rezervuarı kuşlardır. Bundan dolayı virusun bir bölgeye ilk kez veya tekrarlayan girişlerinde özellikle göçmen kuşların önemli rolü vardır. Enfekte sivrisineğin ısırıldığı kuşlarda yüksek ve uzun süreli viremi oluşur. Gelişecek insan epidemileri ani kuş ölümlerine bakılarak öngörülebilir [31,59]. İnsan ve atlar, dokularında yeterli seviyede virus üremesi olmadığından ve virüsü diğer konaklara aktaramadıklarından dolayı son konaklılar [57,59,60]. Atlarda ve insanlarda kısa viremi döneminin aksine, yabani veya evcil kuş türlerinde yüksek ve uzun süreli viremi düzeyi oluşur [14,41]. Bu derlemenin amacı, insan ve hayvan sağlığı açısından önemli olan BNV enfeksiyonu ile ilgili bilgiler vermektir.

Dünya ve Türkiye’de BNV Enfeksiyonunun Durumu

Literatürde kayıtlı ilk epidemi 1951 yılında İsrail’den bildirilmiş olup, ardından 1954 ve 1957 yılları arasında salgınlar görülmüştür. 1957’deki İsrail salgınında yaşlı hastalarda meningoensefalit etkeni olarak BNV gösterilmiş. Sonraki yıllarda Fransa’da, 1974 yılında Güney Afrika’dan salgınlar bildirilmiştir. İspanya’da, Rusya’da, Güney Afrika’da ve Hindistan’da takip eden yıllarda nadiren de olsa benzer salgınlar görülmüştür [68].

Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) tarafından yapılan çalışmalarla, bu suşun 1998 yılında İsrail’de dolaşan virus ile homolog olduğu belirlenmiş ve etken Batı Nil virusu olarak tanımlanmıştır [36].

1999 yılına kadar BNV’nin coğrafi dağılımı Afrika ülkeleri, Hindistan, Ortadoğu, Batı ve Orta Avrupa ile sınırlı olmasına karşın; virus 1999’da Amerika Birleşik Devletleri’nde New York şehrinde ilk kez saptanmış ve geçen zaman içinde tüm kıtaya hızla yayılarak önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir [33].

2002 yılında Amerika’daki BNV vakalarında çarpıcı ve beklenmedik bir artış olmuş 4156 insan enfeksiyonu vakası ile 284 kişinin ölümüne sebep olmuştur [62]. 2003 yılında bildirilen sayı ise 9122 olup, 223 olgu ölümle sonlanmıştır [79]. ABD’de gerçekleşen bu epidemi, batı yarımkürede bugüne kadar bildirilmiş en büyük arboviral meningoensefalit epidemisi olmasının yanı sıra en büyük BNV meningoensefalit epidemisidir [68].

Ülkemiz, virusun çok çeşitli ekosistemlerde var olabilme yeteneği sayesinde yeni coğrafi alanlara yayılma potansiyeli ve endemik bölgelerle komşuluğu göz önüne alındığında birçok arboviral enfeksiyonun görülme olasılığı yüksek riskli bölgeler arasında yer alır [84].

BNV Türkiye’de insan salgınlarında bildirim zorunlu hastalıklar arasında yer alır [13]. BNV yüksek riskli bir patojen olduğundan dolayı tanı genellikle referans laboratuvar ile sınırlı olsa da virusun üretilmesini gerektirmeyen testlerin yapılmasında klinik mikrobiyoloji laboratuvarları da rol üstlenebilir.

Ülkemizde değişik yıllarda BNV ile ilgili yapılmış çalışmalarda [27,34,50,61,63,73] enfeksiyonun seroprevalansı insanlarda %0.9 ile %47.8 oranları arasında, hayvanlarda ise %1 ile %37.7 oranları arasında tespit edilmiştir.

Etiyolojisi

Batı Nil Virusunun Sınıflandırılması

Batı Nil Virusu, *Flaviviridae* familyasından Flavivirus genusunda yer alan nöropatik bir arbovirustur. 10 serolojik alt gruba ayrılan genus tek zincirli ve pozitif polariteli RNA taşır. Etken aynı zaman Japon ensefalit virusu (JEV), Saint Louis encephalitis virusu (SLEV), Murray Valley encephalitis virus (MVEV), Koutango virus (KOUV), Cacipacore virus (CPCV), Alfuy virus (ALFV), Yaounde virus (YAOV), Usutu virus (USUV) ve Kunjin virus ve BNV içeren JEserokompleksi içinde yer almaktadır [13,57,59,60]. Özellikle Kunjin virus antijenik ve genetik benzerlik yönünden BNV’nin alt tipi olarak tanımlanmaktadır [55].

Batı Nil Virusu izolatlarının zarf proteinlerindeki aminoasit dizilim değişiklikleri ile filogenetik analizler ve meydana gelen delesyonlara göre 5 farklı genetik kökeni tespit edilmiştir.

İnsanlarda önemli hastalıklara köken 1’e ait BNV izolatları neden olmaktadır. 2 alt grubu (clade 1a, clade 1b) tesbit edilen köken 1; Asya, Avrupa, Amerika, Avustralya ve Afrikadan izole edilmiştir [31,57,69].

Madagaskar, Güney Afrika ve 2010 yılından sonra Avrupa’da tespit edilen BNV izolatlarında köken 2’ye ait olduğu belirlenmiştir. Birinci kökene ait suşların diğer kökenlerdeki izolatlara göre daha virulent olduğu tespit edilmiştir [17,69].

Son yıllarda Avustralya’dan köken 3 izolatları, Rusya’da farklı türlerden köken 4 ve Hindistan’dan köken 5, BNV virus izolatları tespit edilmiştir [9].

İzolatlar arasındaki patojenite farklılıklarının virusun E, prM ve yapısal olmayan proteinlerdeki nükleotid dizilimindeki farklılıklardan kaynaklandığı tahmin edilmektedir [59,69,81]

Batı Nil Virusun Yapısı ve Genomu

BNV virionları sferik ikozahedral simetriye sahip ve 45-50 nm çapındadır. Pozitif polariteli, tek zin-

cirli RNA kapsayan virus yaklaşık 12000 nükleotite sahiptir. Virion zarflı olduğu için dış ortamlara dayanıklı değildir. Isı, lipid çözücülerle veya deterjan içeren dezenfektanlar içinde süratle inaktive olur [69]. Virusun yapısında üçü yapısal (kapsid [C], zarf [E] ve premembran [prM]/membran [M]), yedisi yapısal olmayan (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b ve NS5) ve viral replikasyona katılan toplam 10 protein vardır [57,59,69]. Viral poliproteinler çoklu transmembran alanları içerdiğinden, uygun viral proteinlerin poliproteinlerden kesilme işleminden sonra C, NS3 ve NS5 proteinleri sitoplazmik alanda, PrM, E ve NS1 proteinleri lümeninde, NS2A, NS2B, NS4A ve NS4B proteinleri ise endoplazmik retikulumun çift zarlı membranı içerisinde lokalize olur [46,47].

Hücre içi viral RNA çoğalmasında yapısal olmayan proteinlerin görev aldığı belirlenmiştir. BNV ile enfekte memeli hücrelerinde çok miktarda sentezlenen yapısal olmayan NS1 proteininin, bu virusa karşı oluşan immün yanıtın sinyal yollarının düzenlenmesinde rol oynadığı belirlenmiştir. NS5 geninin ürünü olan viral RNA-bağımlı RNA polimeraz viral genomun replikasyonundan sorumludur. Virusun immunolojik görevi yapısal en önemli proteini olan E, aynı zamanda etkenin hemagglütinasyon ve hücreye tutunmasını sağlayan en önemli virulans faktörüdür [57,59,69,82].

Virus Replikasyonu

Batı Nil Virusunun hücre yüzey reseptörlerine adsorbsiyonu ile başlayan replikasyon siklusu invitro şartlarda karmaşıktır. Virusun DC-SIGN, DC-SIGNR ve integrin $\alpha\beta 3$ gibi hücre adezyon molekülleri olduğu belirlenmiştir [10]. Hücre yüzeyine tutunan etken klattrin endositoz yoluyla hücre içerisine girer. Virusun yapısal E proteininin değişimi ile hücre ve virus zarfları birleşir bunu müteakiben nükleokapsit sitoplazmaya girer. mRNA görevi gören virusun, pozitif polariteli RNA'sı öncül proteinlerin sentezinde görev alır. Bunu takiben viral ve hücresele proteazların birlikte çalışması ile virusun yapısal (C, prM, E) ve yapısal olmayan proteinleri sentezlenir. Protein sentezinde konak hücrenin endoplazmik retikulumundaki (ER) sinyal peptidaz enzimi ile etkenin NS3 proteazı görev alır. Virus nükleik asit replikasyonu; NS5 'in kodlandığı RNA polimeraz enzimi vasıtasıyla pozitif sarmaldan yeni viral

nükleik asitlerin sentezinde kalıp görevi görecektir negatif polariteli RNA sentezlenir. Virusun yapılarının sentezini takiben indüklenen endoplazmik retikulum kaynaklı membran içinde virus toplanması olur. İmmatür virionlar tomurcuklanarak hücre sitoplazmasına geçerler [12,47].

İmmatür vironda E ve prM proteinleri bulunur. Hücre lümenine bırakılan E proteinleri ER sekresyonları ile düzleşerek dimerik yapı şeklinde virusun yüzeyinde yer alırlar. Virusun yüzeyinde bulunan prM proteinleri konak serin proteazları tarafından kesilerek virusun olgunlaşma süreci tamamlanır ve ekzositoz ile hücreden dışarı bırakılır. Protein sentezinin (E, prM, vs.) yeteri miktarda yapılmadığı durumlarda viron olgunlaşması şekillenmez [66].

Epidemiyoloji

Mısır'da keşfedilen virus yalnızca sivrisineklerden izole edilmiştir. Diğer artropodlardan izole edilmemiş olması nedeniyle sivrisineklerin birincil vektör oldukları görüşü ileri sürülmüştür. Bu görüş, konaktan beslenmeyle başlayan enfeksiyonun vektör döngüsünü yalnızca sivrisineklerin sürdürdüğü ve virus bulaşımının sivrisineklerin ısırmasıyla aktarılmaya devam ettiğinin gösterilmesiyle kanıtlanmıştır. Birincil vektörün *Culex* cinsi sivrisinekler olduğu ortaya konulmuştur [58,79]. Sonra ki yıllarda birçok ülkede (İsrail, ABD, Rusya, Fas, Güney Afrika, Sudan, Cezayir, Romanya, Çek Cumhuriyeti, Tunus, Kongo, Fransa, Kanada ve İtalya) teşhisi yapılan hastalığın yayılmasında ayrıca yabani kuş göçlerinin de sorumlu olduğu kabul edilmektedir [51].

Kuş türleri Batı Nil Virusunun çoğaldığı birincil ana konak olarak kabul edilir. Endemik bölgede, virusun yaşam döngüsü sivrisinekler ve kuşlar arasında gerçekleşir. İnsanlar, diğer memeliler ve özellikle atlar BNV için alternatif konak olabilirler; bunlara enfeksiyonun asıl geçiş yolu enfekte sivrisineklerin ısırmasıyla olur. Ayrıca virusun; intrauterin yolla veya emzirme yoluyla anneden yavruya ve kan transfüzyonu veya organ nakli ile bireyler arasında yayılabileceği birkaç çalışmada gösterilmiştir [1,20].

Çoğu insanda enfeksiyon asemptomatik seyrederken vakaların %20- 30'unda Batı Nil ateşi bu vakaların da yaklaşık %1'inde BNV ile karakterize

ensefalit, menenjit, akut flask paralizi ve hatta uzun vadeli nörolojik sekeller şekillenir [45].

BNV suşları en az 5 genetik soy içine gruplandırılmıştır [50]. Köken 1 Asya, Avrupa, Kuzey Amerika, Afrika ve Avustralya'da izole edilen antijenik olarak farklı izolat gruplarını içermektedir. Bu nesil en az iki farklı dala ayrılır; Batı Nil Virüsü-1a Afrika, Avrupa, Kuzey Amerika ve Asya'da esas olarak bulunur [52]. BNV 1-b ise Avustralya'da yer alır. Hindistan izolatlarını içeren üçüncü bir dal (1c) köken 5 olarak sınıflandırılmıştır [11]. Sahra altı Afrika ve Madagaskar'da izole edilen suşlarda köken 2'de yer alır. Bu suşlar son zamanlarda Avrupa ülkelerinde de görülmüştür. Son yıllarda Macaristanda yırtıcı kuşlarda bu suşlar tespit edilmiştir [6]. Macaristan ve Güney Afrika suşlarına göre, 2007 yılında tespit edilen Rus soyundan farklı köken 2 suşları tespit edildi [3,74]. Köken 3 memelilerde patojenik olan ve Güney Moravia ile Çek Cumhuriyeti'nde belli *Culex* ve *Aedes* türü sivrisineklerle dolaşan "Rabensburg virusunu" içerirken [5], köken 4 *Derma-centormarginatus* kene türü ile taşınan Kafkasya'da izole edilen suşları içerir [49].

Patogenez

BNV türleri arasındaki virulans farklılığı, laboratuvar bulguları ile doğrulanmış insan vakalarının azlığı ve klinik semptomların hafif seyri nedeni ile BNV'nin patogenezi ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. BNV yaygınlaşması ve patogenezi ile ilgili bilgilerimizin çoğu kemirgenlerde yapılan çalışmalardan elde edilmiştir [18]. Ancak bu gözlemler yine de virusun insan vücudunda oluşturduğu doğal enfeksiyon seyrini tam olarak gösterememektedir. Virus taşıyan sinek tarafından ısırılma sonucunda organizmaya giren BNV lenf nodüllerine yerleşir ve primer replikasyonunu burada gerçekleştirir [16,18,44]. Birkaç gün süren düşük düzeyli viremi ile birlikte IgM'ler oluşur [31,57,59,69]. Karaciğer, böbrek ve dalak gibi organlara viremi sonucu ulaşan virus bu organlara yerleşir. Viremi aşamasında beyne ulaşan virusun kan-beyin bariyerini ne şekilde geçtiği tam olarak bilinmemekle birlikte aksonal taşınma ile veya endotel replikasyon ile bu bariyeri geçtiği düşünülmektedir. MSS'ye ulaşan virus ciddi immun patolojik bozukluklar ile apoptozise neden olur. Nörovirulan olan BNV virusu interferon üretimine karışan genleri, MHC sınıf I ve II antijen

sunumunu, T hücre transferini ve apoptozis mekanizmasını bozar. Enfeksiyonun viremi düzeyi ve süresini bireyin yaşı, kronik hastalıkları ve immun durumu belirler [35,39,57,59].

Enfeksiyona bağlı ölüm vakalarına yapılan postmortem patolojik muayenelerde beyin ve medulla spinaliste nöron dejenerasyonu ile peteşiler görülür. Prognozun iyi olduğu durumlarda iyileşme görülebilir ama aylar /haftalar sonra hastalığın tekrarlayabileceği göz önünde bulundurulmalıdır [40].

Tanı

BNV enfeksiyonu ve birçok arbovirus enfeksiyonunda, anamnez bilgileri ve semptomlar teşhise yardımcı olur. Kesin tanının laboratuvar testleri ile yapılması gerekir. Çünkü BNV benzeri klinik semptomlar gösteren, ensefalit, aseptik menenjit ve ateşli hastalık etkeni birçok patojen bulunmaktadır. Bu durum ayırıcı tanıda göz önünde tutulmalıdır [28,69].

BNV enfeksiyonunda şüphelenilen durumlarda; beyin omurilik sıvısı (BOS), serum ve diğer vücut sıvılarından alınan marazi maddeler hastalığın teşhisi için laboratuvara gönderilebilir. Enfeksiyonun serolojik teşhisinde JE kompleksi ile çapraz reaksiyon verebileceği unutmamalıdır. Bu amaçla BNV enfeksiyonunun laboratuvar teşhisinde virus izolasyonu, virus nükleik asidinin veya viral antijenlerin saptanması ve etkene karşı oluşan immun yanıtın belirlenmesine yönelik hemaglutinasyon inhibisyon (HI), komplement fikzasyon (KF), IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay (MAC-ELISA), plak redüksiyon nötralizasyon testi (PRNT) ve PCR gibi spesifik teknikler kullanılmaktadır [33].

BNV hastalığının teşhisinde kullanılan başlıca metotlar

Virus İzolasyonu

Virus izolasyonu virusun tanısı için altın standart olarak kabul edilmektedir. BNV izolasyonu için hem memeli hem de sivrisinek dokularından türetilmiş hücre hatları kullanılmaktadır [22,23].

Antijen Testleri

Tarama çalışmalarında kullanılmak üzere kanatlılarda ve sivrisineklerde viral antijenlerin saptanma-

si amacıyla geliştirilen farklı yöntem ve duyarlılıklara sahip ticari test sistemleri vardır [23].

Serolojik Testler

İnsanlarda BNV tanısında “spesifik antikor tespitine dayalı yöntemler” yaygın olarak kullanılmaktadır. Flaviviruslar arasında görülen antijenik çapraz reaksiyonların varlığı, serolojik yöntemlerin klinik önemini sınırlandırmaktadır. Oldukça özgül zarf proteinine (E) karşı oluşan nötralizan antikor yanıtına dayalı yöntem, sıklıkla daha az özgül olan membran proteinine ve yapısal olmayan proteinlere karşı oluşan antikor yanıtına dayalı test ile birleştirilir. [23,71]. Bu bağlamda BNV enfeksiyonunun serolojik teşhisinde başlıca; indirekt-immunofluoresan (IF), hemaglutinasyon-inhibisyon (HI), komplement fikzasyon (KF) ve altın standart yöntem olarak kabul edilen plak redüksiyon nötralizasyon testi kullanılmaktadır [36,71].

İnsanlarda BNV enfeksiyonlarının teşhisinde serolojik testler uygulaması durumunda; bireyin daha önce geçirdiği arboviral enfeksiyonlar, bunlarla ilgili aşılınmalar, BNV'nin bölgesel epidemiyolojisi ve hastalığın endemik seyrettiği bölgelere yapılan seyahat bilgileri bir bütün olarak değerlendirilmelidir [29,82].

Moleküler Testler

BNV genomu arthropod, memeli ve kanatlıların serum, doku ve plazmalarında enfeksiyon sonrası 2-3 ile 14-18 günler arasında saptanabilir. Moleküler yöntemlerin analitik duyarlılığı yüksektir. BNV enfeksiyonunun tanısında tarama amacıyla sıklıkla kullanılan yöntem viral RNA sekanslarının kullanıldığı reverse transcription-polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) yöntemidir.[75].

Laboratuvar Bulguları

BNV enfeksiyonunun laboratuvar bulgularında spesifik bir özellik yoktur. Ancak periferik kan tablosundaki toplam lökosit sayısı normal yada lenfositopeni şekillenmiş veya anemik bir tablo gelişmiş olabilir. Periferik kan tablosunda sola kayma ve monositoza rastlanabilir. Eritrosit sedimentasyon hızı çoğu zaman normaldir. Eozinofili genellikle görülmezken, trombosit sayısı normal sınırlardadır. Karaciğer tutulumu sık olmamakla birlikte na-

dirende olsa transaminazlar yükselebilir, bilirübin yüksekliği çok nadirdir, alkalen fosfataz düzeyleri normal sınırlardadır. BNV enfeksiyonunda özellikle ensefalit klinik tablosu gösteren vakalarda hiponatremi oluşabilir ve bu durum çoğu zaman Lejyoner enfeksiyonu ile karışmasına sebep olur [65]. Hastalığın MSS formunda diffüz bilateral anormallikler elektroensefalografide (EEG) belirlenebilir. BOS berraktır, pleositos gösterir ve genellikle BOS'taki hücre sayısı 45-1720 hücre/mm³civarında olur ve BNV enfeksiyonlarının erken dönemlerinde bu hücrelerin içinde de lenfositlerin belirgin bir hakimiyeti vardır [65].

BOS protein düzeyi yüksek seviyelere (1000 mg/dL) ulaşabilir. BOS'dan tespit edilen lenfosit sayısı artışı (>%50) ve protein konsantrasyonundaki artış tanıya yardımcı olur [15,33]. Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) çoğu hastada normal olmasına rağmen, talamusta, ponsta T2 ağırlıklı sekanslarda, beyaz madde sinyal dansitelerindeki artış görüntülemeye önemli bulgudur.

Ayrırcı Tanı

BNV enfeksiyonunun semptomları MSS tutulumu ile seyreden birçok viral hastalık ile aynıdır. Ayrıca arbovirus enfeksiyonlarının serolojik teşhisinde çapraz reaksiyonlar görülme ihtimalinden dolayı ayrırcı teşhis önem kazanmıştır. Arbovirusların neden oldukları enfeksiyonların ayrırcı teşhisinde coğrafi dağılım, hastanın yaşı, bölgedeki endemik durum vs. göz önünde bulundurulmalıdır. BNV enfeksiyonu insanlarda genellikle yetişkinlerde veya yaşlılarda görülmesi oluşan vakaların yaklaşık %10'unun ölümle sonuçlanması bakımından diğer flavivirus enfeksiyonlarından farklılık gösterir. Etiyolojisi belirlenemeyen aseptik menenjitli hastaların gövdelerinde makülo papüler döküntülerin görülmesi, ensefalit veya hepatit semptomlarının belirlenmesi halinde hasta BNV yönünden araştırılmalıdır [53,54].

BNV özellikle epidemik olmadığı bölgelerde St. Louis virus ensefaliti vakaları ile karışabilir. Ayrıca insanlarda görülen aseptik menenjit vakalarına neden olan enterovirus enfeksiyonlarından ve ensefalite neden olan diğer viral enfeksiyonlardan (herpes simpleks virus vs.) ayırımına dikkat edilmesi gerekir [65].

Klinik

BNV enfeksiyonu insanlarda, subklinik enfeksiyondan ölüme kadar değişik klinik tablolara sebep olmaktadır. Nörolojik bulguların gelişmediği olgular Batı Nil ateşi olarak adlandırılırken, meningoensefalit gibi nörolojik bulguların geliştiği olgular ise Batı Nil meningoensefaliti olarak adlandırılmaktadır.

Batı Nil Virusunun neden olduğu hastalık vakalarının yaklaşık %80'i asemptomatik seyrederken; %20'si ise inkübasyon periyodu 2-15 gün arasında olan grip benzeri hastalık şeklinde ortaya çıkar [4]. Olguların %1'inde ise ensefalit, menenjit ve akut flask paralizi ile seyreden ve ölüme sonuçlanan nöroinvaziv enfeksiyon gelişebilir [24,57,60,81].

En önemli klinik belirtiler baş ağrısı, ateş, titreme, kırgınlık, halsizlik, kas ve eklem ağrısı, retroorbital ağrı, bulantı, kusma, ishal, genellikle çocuklarda makülopapüler veya roseolar döküntü şeklindedir [80,82]. Lenfadenopati hastaların büyük çoğunluğunda saptanır. Çok şiddetli vakalarda genel durum bozuklukları ile birlikte olgularda, uyuşukluk, optik nörit, vücut kaslarında zayıflık, myelit, boynu dik tutamama, zihinsel karışıklık, mental durum değişikliği, kas titremeleri, hareket bozuklukları, koma, konvülsiyonlar ve paralizi gelişebilir [24,81,82].

BNV enfeksiyonuna bağlı ensefalit vakaları; diyabet, kardiyovasküler rahatsızlıklar, hepatit C virüs enfeksiyonları ve immünsupresyon gibi hastalıklarla birleşirse ölüm riski artar [48,72]. Genç ve çocuklarda yaşlılara (50 yaş ve üzeri) oranla daha az görülen BNV hastalığında mortalite oranı %3-15 civarındadır [38,81].

İnsanlarda olduğu gibi hayvanlarda da enfeksiyon genellikle subklinik seyretmekte ve vakaların sadece %10'unda klinik semptomlar gelişmektedir [14].

Kedilerde köpeklere nazaran Batı Nil virüsü hastalığının klinik bulguları daha belirgin görülür. Klinik hasta hayvanlarda yüksek ateş, letarji ve nörolojik bulgular tespit edilebilir. Ayrıca kedilerin BNV enfeksiyonunun epidemiyolojisinde önemli rolleri vardır [83].

Klinik semptom gösteren atlarda ateş, ayaklarda zayıflık, ataksi, diş gıcırdatma, tremor, körlük ve kaslarda seğirme gibi belirtiler bildirilmiştir. Ayrıca ensefalit tablosuda gelişebilir. BNV enfeksiyonunun

dan etkilenen atlarda ölüm oranı %25 ile %45 arasındadır [82,84].

Kuşlarda klinik bulgular kalp kası yangısı, depresyon, uyuşukluk, tüylerde dökülme, kilo kaybı, ataksi ve felçtir. BNV çoklu organ hasarına da sebep olabilir. Beyin, kalp, akciğerler, böbrek, karaciğer, dalak, deri, gonadlar ve yemek borusu başlıca etkilenen organlardır [41]. Nörolojik semptom göstermeyen hasta hayvanlar tamamen iyileşirken, MSS semptomları gösterenlerde enfeksiyon uzun seyir gösterir ve bu durumlarda mortalite %10'u aşar [71].

Tedavi

İnsanlarda standart bir tedavisi olmayan BNV enfeksiyonunda semptomatik tedavi uygulanır [4]. Bu sebeple, insanlarda hafif vakalarda ateşin düşürülmesi, baş/kas ağrısının giderilmesi ve bulantı/kusmanın önlenmesi için antipiretik, analjezik ve antiemetik ilaçlar kullanılabilir [36,71].

Hastaneye yatırmayı gerektiren şiddetli vakalarda ise aşırı kusma durumunda intra venöz (İV) sıvı verilmesi, ileri derece kas zayıflaması durumunda entübasyon ve mekanik ventilasyon, sekonder enfeksiyon gelişmesinin önlenmesine yönelik tedavi, beyin ödeminin tedavisi/önlenmesi, gerekli ise antikonvülsan verilmesi ayrıca paraliz açısından değerlendirmeler yapılmalıdır [29,64].

Beyin ödemi ve herniasyona karşı kısa süreli steroid ve osmotik solüsyonlar kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, ribavirin, alfa-interferon (IFN- α) ve pirazidin nükleozidleri gibi antiviral ajanların BNV'ye karşı in vitro aktiviteleri gösterilmiştir [2,37]. Yapılan bir çalışmada [37] yüksek doz ribavirinin in-vitro olarak insan oligodendroglial hücrelerine verilmesi sonucunda BNV replikasyonunun ve sitopatojenitesinin inhibe olduğu belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada ribavirin invitro olarak koruyucu bulunmuş ama tedavi edici etkisinin olmadığı bildirilmiştir.

İnterferon alfa-2b (IFN- α 2b) hücreye BNV ile enfekte olmadan önce veya sonra uygulandığında düşük dozda viral sitotoksititeyi inhibe etmektedir. Farelerde yapılan çalışmalarda alfa ve beta interferonlarının BNV'ye karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar IFN- α 2b ile meningoensefalitli olguların başarıyla tedavi edildiğini bildirmekteler [19,43]. İnterferon alfa-2b, in-vitro olarak riba-

virinden daha fazla tedavi edici aktiviteye sahiptir. Fakat hepatit C virus (HCV) enfeksiyonunun tedavisinde olduğu gibi kombine kullanım için ileri çalışmalara gerek olduğu vurgulanmaktadır [2]. Çünkü bu ajanların in-vivo kullanımı ile ilgili destekleyici/kontrollü klinik veriler mevcut değildir.

Batı Nil virusunun ABD’nde yüksek oranda nöroinvazif hastalık oluşturmasından dolayı son yıllarda yeni ve özgül antiviral ilaçların geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır [48]. 2004 yılından itibaren, özellikle virusun yapısal zarf proteinleri (prM ve E) ile NS3 (helikaz ve proteaz) ve NS5 (metiltransferaz ve RNA polimeraz) gibi yapısal olmayan proteinleri, hedef alınarak tedavi ve koruma amaçlı çalışmalara yoğunlaşmıştır [70]. 2005 yılında plazmid tutan DNA aşısı geliştirilmiş ve aşının hayvan deneylerinde başarılı sonuçlar alınmıştır [21].

BNV’ye spesifik antikorları içeren yüksek doz intravenöz immünoglobulin uygulamasının, profilaktik ve terapötik etkinliği olduğu belirlenmiştir [7]. Yapılan deneylerdeki etkinliğine dayanarak salgınlar sırasında insanlarda hiperimmüngamaglobulin uygulaması da bu sonuçları doğrulamıştır [4,7,76].

Hayvanlardaki tedavide insanlarda olduğu gibi semptomatiktir, analjezik ve antipiretik ilaç kullanılır. Özellikle MSS semptomları gösteren atların çok sıkı tedavi ve takibi yapılmalıdır [8,18].

Aşı

Günümüzde insanlarda kullanılmak üzere geliştirilmiş FDA onaylı ticari bir BNV aşısı henüz mevcut değildir. Fakat rekombinant canlı virus, alt ünite, DNA aşısı ve inaktive virus aşısı üzerinde çalışılmaktadır [23,32].

Atlar için etkili ve lisanslı aşısı bulunmaktadır. Özellikle 6. ayın üstündeki atlarda kullanılan 4 adet lisanslı aşı vardır. Bunlar canlı attenüe aşısı, genetiği değiştirilmiş canlı virus aşısı, inaktif aşısı ve DNA aşısıdır [4,23,32]. Atlarda kullanılan bu aşılarından birincisi, 2003 yılında lisans almış formalin ile inaktive tüm virus aşısı; diğeri ise 2004 yılında lisans almış rekombinant canlı canarypox virus aşısıdır [23]. Bu iki aşının da atlarda viremiye karşı koruyuculuğu %95-100 oranları arasında olduğu bildirilmiştir.

İnsanlarda kullanılmak amacıyla üzerinde çalışılan Rekombinant aşılarda primer hedef prM ve E yapısal proteinlerini kodlayan genlerdir. Ayrıca yine prM ve E alt ünitelerinden oluşan ve enfeksiyöz olmayan virus benzeri partiküllerin (Virus Like Particles, VLP) kullanımı ile ilgili aşı çalışmaları da yapılmaktadır. Fakat VLP alt ünite aşısının koruyucu immün yanıt oluşturmak için çok yüksek miktarlarda kullanılması büyük bir dezavantajdır [4,78]. Diğer taraftan humoral yanıtı iyi bir şekilde uyaran inaktif aşılarda rutin uygulamalarında bazı olumsuzluklar vardır. Ekonomik olan ve humoral immunitiyi iyi şekilde uyaran attenüe aşılarda ise immünsüprese kişilere uygulanması mümkün değildir [23,42].

Canlı attenüe aşılarda olduğu gibi, in vivo olarak replike olabilen, viremiyi önleyebilen, kuvvetli nötralizan antikor yanıtı oluşturabilen ve tek bir immünizasyon ile etkin korumayı sağlayabilen değişik genetik kökenli kimerik aşılarda umut verici sonuçlar doğurmuştur [23].

Günümüzde iki kimerik BNV aşısı üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Bunlardan birincisi, uzun yıllar uygulanan güvenli ve etkili olduğu kanıtlanmış sarı humma virusu (YFV) 17D aşısının vektör olarak kullanıldığı aşılardır [56]. Bu teknolojiye, BNV yapısal protein genleri (WN-prM/E), YFV 17D aşısı suşuna karşılık gelen genlerinin (YF-prM/E) yerine yerleştirilmektedir. Bununla ilgili Amerika’daki çalışmalar şu anda faz I ve faz II aşamasında olup başarılı sonuçların alındığı belirtilmektedir [56]. Bir diğeri canlı attenüe kimerik aşı ise, WN-prM/E genlerinin Dengue tip 4 virusuna entegrasyonu ile elde edilen aşı olup, faz I insan çalışmaları devam etmektedir [67].

Korunma ve Kontrol

Güvenilir ve etkili bir BNV aşısının eksikliği nedeniyle, hastalığın kontrol altında tutulabilmesi ve önlenmesi için dört önemli noktaya dikkat edilmelidir. Bunlar toplumsal düzeyde;

- Atlardaki enfeksiyonun ve kuşlardaki ölümlerin izlenmesi,
- Vektör sivrisineklerin larva haritalarının belirlenmesi ve sürekli bu bilgilerin güncel tutulması,
- Ergin sivrisineklerin kontrolünün sağlanması,
- Bireysel düzeyde korunma önlemlerinin alınması [40].

Kuşlarda yapılacak sürveyans çalışmaları, enfeksiyon durumunda diğer hayvanlar ve insanların korunmasında faydalı bilgiler sağlayabilir. Bu amaçla diğer kuşlara göre kargalar hastalığa çok duyarlı olduğu için sıklıkla ölü kargaların test edilebilmesi için insanlar tarafından karga ölümlerinin hemen en yakındaki veteriner hekimler ve ilgili sağlık kuruluşlarına bildirilmesi sağlanmalıdır [30].

Sivrisineklerin yumurtlayabileceği, içerisinde su birikebilecek bütün eşyaların ve kullanılmayan malzemelerin (teneke kutu, şişe, plastik kaplar, otomobil lastikleri, seyyar havuz vb) uygun şekilde imhası sağlanmalıdır. Ayrıca sivrisinek üreme alanlarında larvasitler ile ilaçlamalar yapılmalıdır.

Çatı veya teraslarda biriken suların boşaltılmasını sağlayan boruların ve yağmur oluklarının temizliği yapılmalı, tıkanıklığı kontrol edilerek, suların buralarda birikmesi engellenmelidir.

Sivrisinek yiyen balıklar süs havuzlarında bulundurulmalıdır.

Çöp kutuları, sarnıç, fosseptik çukuru, lağım çukuru ve variller bir kapakla sıkıca kapatılmalıdır.

Kapalı alanların pencere ve kapılarına sineklik takılmalı, bu uygulama ahırlarda da yapılmalıdır.

İnsan sağlığı için zararsız olduğu bildirilen sivrisinek ve kene kovucu DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) içeren repellentler kullanılmalıdır.

Şafak vakti ve gün batımı gibi sivrisineklerin aktif olduğu saatlerde dışarı çıkılmamalı; çıkılacaksa da uzun kollu ve pantolon gibi kapalı kıyafetler giyilmelidir. Aynı şekilde atlar da bu zaman dilimlerinde mümkünse dışarıda bırakılmamalıdır.

Enfeksiyonun epidemiyolojisi hakkında veteriner hekimlerin ayrıntılı bilgilendirilmesi ve sinir sisteminde enfeksiyon görülen at, köpek, kanatlı vs. hayvanların ihbar edilmelidirler.

Konuyla ilgili kamuoyunda farkındalık oluşturularak, vatandaşlara eğitimler verilmelidir [30,71,81,84].

Kaynaklar

- Alpert SG, Ferguson J, Noel LP, (2003). *Intrauterine West Nile virus: ocular and systemic findings*. Am J Ophthalmol. 136, 733-735.
- Anderson JF, Rahal JJ, (2002). *Efficacy of interferon alpha-2b and ribavirin against West Nile virus in vitro*. Emerging infectious diseases. 8(1), 107-108.
- Bagnarelli P, Marinelli K, Trotta D, Monachetti A, Tavio M, Del Gobbo R, Capobianchi MR, Menzo S, Nicoletti L, Magurano F, Varaldo PE, (2011). *Human case of autochthonous West Nile virus lineage 2 infection in Italy, September 2011*. Euro Surveill. 16(43), 1-4.
- Bakır E, (2015). *Batı Nil Virüsü Varlığının Marmara Bölgesi Kan Donörlerinde Serolojik Ve Moleküler Yöntemler İle Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD ve Tıbbi Viroloji Bilim Dalı, İstanbul.
- Bakonyi T, Hubalek Z, Rudolf I, Nowotny N, (2005). *Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe*. Emerg. Infect. Dis. 11(2), 225-231.
- Bakonyi T, Ivanics E, Erdelyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenböck H, Nowotny N, (2006). *Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe*. Emerg. Infect. Dis. 12(4), 618-623.
- Ben-Nathan D, Gershoni-Yahalom O, Samina I, Khinich Y, Nur I, Laub O, Gottreich A, Simanov M, Porgador A, Zisman BR, Orr N, (2009). *Using high titer West Nile intravenous immunoglobulin from selected Israeli donors for treatment of West Nile virus infection*. BMC infectious diseases. 9, 18.
- Biendenbender R, Bevilacqua J, Gregg AM, Watson M, Dayan G, (2011). *Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study to investigate the immunogenicity and safety of a West Nile virus vaccine in healthy adults*. J Infect Dis. 203, 75-84.
- Blut A, (2013). *West Nile Virus*. Transfus Med Hemother. 40, 265-284.
- Bogachek MV, Zaitsev BN, Sekatskii SK, Protopopova EV, Ternovoi VA, Ivanova AV, Kachko AV, Ivanisenko VA, Dietler G, Loktev VB, (2010). *Characterization of glycoprotein E C-end of West Nile virus and evaluation of its interaction force with alphaVbeta3 integrin asputative cellular receptor*. Biochemistry. 75, 472-480.
- Bondre VP, Jadi RS, Mishra AC, Yergolkar PN, Arankalle VA, (2007). *West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage*. J. Gen. Virol. 88, 875-884.
- Brington MA, (2014). *Replication Cycle and Molecular Biology of the West Nile Virus*, Viruses. 6, 13-53.
- Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 - 27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> Erişim tarihi: 23.05.2016.
- Bunning LM, Bowen AR, Cropp B, Sullivan GK, David SB, Komar N, Godsey SM, Baker D, Hettler LD, Holmes AD, Biggerstaff JB, Mitchell JC, (2002). *Experimental infection of horses with west nile virus*. Emerg Inf Dis. 8(4), 380-386.
- Busch MR, Kleinman SH, Tobler LH, Kamel HT, Norris PJ, Walsh I, Matud JL, Prince HE, Lanciotti RS, Wright DJ, Linnen JM, Caglioti S, (2008). *Virus and antibody dynamics in acute West Nile virus infection*. J. Infect. Dis. 198, 984-993.
- Byrne SN, Halliday GM, Johnston LJ, King NJC, (2001). *Interleukin-1beta but not tumor necrosis factor is involved in West Nile virus-induced Langerhans cell migration from the skin in C57BL/6 mice*. 117(3), 702-709.
- CDC, (2011). *Expert consultation on West Nile virus infection*. Thessaloniki, ECDC, 25-26 January

18. CDC, (2013). *West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control*, 4th Revision June 14.
19. Chan-Tack KM, Forrest G, (2005). *Failure of interferon alpha-2b in a patient with West Nile virus meningoencephalitis and acute flaccid paralysis*. Scand J Infect Dis. 37, 944-6.
20. Charatan F, (2002). *Organ transplants and blood transfusions may transmit West Nile virus*. BMJ. 14, 325(7364)- 566.
21. Colpitts TM, Conway MJ, Montgomery RR, Fikrig E, (2012). *West Nile Virus: Biology, Transmission, and Human Infection*. Clin Microbiol Rev. 25, 635-648.
22. Cunha BA, (1999). *West Nile Encephalitis*. Infectious Disease Practice for Clinicians. 23(10), 85-89.
23. Dauphin G, Zientara S, (2007). *West Nile virus: Recent trends in diagnosis and vaccine development*. Vaccine. 25, 5563-5576.
24. Debiasi RL, (2011). *West Nile virus neuroinvasive disease*. Curr Infect Dis Rep. 13(4), 350-359.
25. Diamond SM, (2003). *Evasion of innate and adaptive immunity by flavivirus*. Immunol and Cell Biol. 81, 196-206.
26. Duran B, Chevalier V, Pouillot R, Labie J, Marendat I, Murgue B, Zeller H, Zientara S, (2002). *West Nile virus outbreak in horses, Southern France, 2000: Results of serosurvey*. Emerg Infect Dis. 8(8), 777-782.
27. Erdem H, Pahsa A, (2003). *Yeni bir pandemi mi ? Batı Nil virüs enfeksiyonu*. İnfeksiyon Dergisi. 17, 245-249.
28. Ergünay K, (2010). *Batı Nil Virüsü: Viroloji, Epidemiyoloji ve Mikrobiyolojik Tanı*. III Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu; Ankara.
29. Ergünay K, Aydoğan S, Menemenlioğlu D, (2010). *Ankara Bölgesinde Nedeni Bilinmeyen Merkezi Sinir Sistemi Enfeksiyonlarında Batı Nil Virüsünün Araştırılması*. Mikrobiyol Bul. 44, 255-262.
30. Ertürk A, (2010). *Batı Nil virüsü enfeksiyonunda korunma ve kontrol*. III Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu. 166-173.
31. Gyure KA, (2009). *West Nile virus infections*. J. Neuropath. Exp. Neur. 68, 1053-1060.
32. Hall RA, Khromykh AA, (2004). *West Nile virus vaccines*. Expert Opin Biol Ther. 4, 1295-1305.
33. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL, (2005). *Virology, pathology and clinical manifestations of West Nile virus disease*. Emerg. Infect. Dis. 11, 1174-1179.
34. Heinz FX, Collett MS, Purcell RH, Gould EA, Howard CR, Houghton M, Moormann RJM, Rice CM, Thiel HJ, (2000). *Family: Flaviviridae*. Ed(s) Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, et al. eds. *Virustaxonomy: classification and nomenclature of viruses*. 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Academic Press, p. 859-878.
35. Hızel K, Yenicesu İ, Erdal B, Yeşilyurt E, Fidan I, Kalkancı A, Dilsiz G, (2010). *Investigation of West Nile virus seroprevalence in healthy blood donors*. Mikrobiyol. Bul. 44, 425-430.
36. Huhn GD, Sejvar JJ, Montgomery SP, Dworkin MS, (2003). *West Nile virus in the United States: an update on an emerging infectious disease*. Am Fam Physician. 68, 653-660.
37. Jordan I, Briese T, Fischer N, Lau JY, Lipkin WI, (2000). *Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells*. The Journal of infectious diseases. 182(4), 1214-1217.
38. Kalaycıoğlu H, (2010). *Türkiye’de görülen West Nile vakalarının epidemiyolojisi*. III. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu, Ankara, Türkiye, 1-2 Kasım 2010, 174-183.
39. Kalaycıoğlu H, Korukluoğlu G, Ozkul A, Oncul O, Tosun S, Karabay O, Gozalan A, Uyar Y, Çağlayık DY, Atasoylu G, Altas AB, Yolbakan S, Özden TN, Bayraktar F, Sezak N, Pelitli TS, Kurtcebe ZO, Aydın E, Ertek M, (2012). *Emergence of West Nile virus infection in humans in Turkey, 2010 to 2011*. Eurosurveillance. 17, p. 20182.
40. Kılıç A, Doğançlı L, (2003). *Batı Nil Virüsü*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 33, 284-290.
41. Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler DL, Davis BS, Bowen RA, Bunning ML, (2003). *Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus*. Emerg. Infect. Dis. 9(3), 311-322.
42. Lanciotti SR, Kerst JA, Nasci SR, Godsey MS, Mitchell CJ, Savage HM, Komar N, Panella NA, Allen BC, Volpe KE, Davis BS, Roehrig JT, (2000). *Rapid detection of West Nile Virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay*. J Clin Microbiol. 38, 4066-4071.
43. Lewis M, Amsden JR, (2007). *Successful treatment of West Nile virus infection after approximately 3 weeks into the disease course*. Pharmacotherapy. 27, 455-458.
44. Lim P-Y, Behr MJ, Chadwick CM, Shi P-Y, Bernard KA, (2011). *Keratinocytes are cell targets of West Nile virus in vivo*. J. Virol. 85(10), 5197-5201.
45. Lim SM, Koraka P, Osterhaus AD, Martina BE, (2011). *West Nile virus: immunity and pathogenesis*. Viruses. 3(6), 811-828.
46. Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM, (2007). *Flaviviridae*. In *Fields virology*, vol 1, 5th ed. In Knipe DM, Howley PM, eds. (Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia). p. 1101-1113.
47. Lindenbach BD, Murray CI, Thiel HJ, Rice CM, (2013). *Flaviviridae*. *Fields Virology*, 6th Ed. In Knipe DM, Howley PM, eds. (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia). p. 712-746.
48. Lindsey NP, Staples JE, Lehman JA, Fischer M, (2010). *Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for human West Nile virus disease - United States, 1999-2008*. MMWR Surveill Summ. 59, 1-17.
49. Lvov DK, Butenko AM, Gromashevsky VL, Kovtunov AI, Prilipov AG, Kinney R, Aristova VA, Dzharfenov AF, Samokhvalov EI, Savage HM, Shchelkanov MY, Galkina IV, Deryabin PG, Gubler DJ, Kulikova LN, Alkhovsky SK, Moskvina TM, Zlobina LV, Sadykova GK, Shatalov AG, Lvov DN, Usachev VE, Voronina AG, (2004). *West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging and re-emerging situations*. Arch Virol Suppl. 18, 85-96.
50. Mackenzie JS, Williams DT, (2009). *The zoonotic flaviviruses of southern, south-eastern and eastern Asia, and Australasia: the potential for emergent viruses*. Zoonoses Public Health. 56(6-7), 338-356.

51. Marfin AA, Gubler DJ, (2001). *West Nile encephalitis: an emerging disease in the United States*. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 33(10), 1713-1719.
52. May FJ, Davis CT, Tesh RB, Barrett ADT, (2011). *Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas*. J Virol. 85(6), 2964-2974.
53. Meço O, (1975). *Güney Doğu Anadolu ve Doğu Karadeniz Bölgeleri Halkında Arbovirus Hemagglütinasyon-Inhibisyon Antikorlarının Araştırılması*. Doçentlik Tezi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara.
54. Meço O, (1977). *Güneydoğu Anadolu halkında Batı Nil ateşi hemagglütinasyon önlenim antikorlarının araştırılması*. Mikrobiyol. Bul. 11, 3-17.
55. Monath PT, Heinz XF, (1996). *Flaviviruses*. In: Fields NB, Knipe DM, Howley MP, Chanock RM, Melnick LJ, Monath PT, Poizman B, Strauss ES. *Field's Virology*, 3rd edition, Philadelphia, Lippincott-Raven. p. 961-1034.
56. Monath TP, Liu J, Kanesa-Thanan N, Myers GA, Nichols R, Deary A, McCarthy K, Johnson C, Ermak T, Shin S, Arroyo J, Guirakhoo F, Kennedy JS, Ennis FA, Green S, Bedford P, (2006). *A live, attenuated recombinant West Nile virus vaccine*. Proc Natl Acad Sci USA. 103, 6694-6699.
57. Monini M, Falcone E, Busani L, Romi R, Ruggeri FM, (2010). *West Nile virus: Characteristics of an African virus adapting to the third millennium world*. Open Virol. J. 22, 42-51.
58. Murgue B, Murri S, Triki H, (2001). *West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000*. Ann NY Acad Sci. 951, 117-126.
59. Murray KO, Mertens E, Despres P, (2010). *West Nile virus and its emergence in the United States of America*. Vet Res. 41, 67.
60. Murray KO, Walker C, Gould E, (2011). *The virology, epidemiology, and clinical impact of West Nile virus: A decade of advancements in research since its introduction into Western Hemisphere*. Epidemiol Infect. 139, 807-817.
61. Nosal B, Pellizzari R, (2003). *West Nile Virus*. CMAJ. 168, 1443-1444.
62. O'Leary DR, Marfin AA, Montgomery SP, Kipp AM, Lehman JA, Biggerstaff BJ, Elko VL, Collins PD, Jones JE, Campbell GL, (2004). *The epidemic of West Nile virus in the United States*. Vector Borne Zoonotic Dis. 4, 61-70.
63. Ozkul Aykut, Ergunay Koray, Koysuren Aydan, Alkan Feray, Arsava Ethem M., Tezcan Seda, Emekdas Gurol, Hacıoğlu Sabri, Turan Mahur, Us Durdal, (2013). *Concurrent occurrence of human and equine West Nile virus infections in Central Anatolia, Turkey: the first evidence for circulation of lineage 1 viruses*. International Journal of Infectious Diseases 17, 546-551
64. Petersen LR, Brault AC, Nasci RS, (2013). *West Nile Virus: Review of the Literature*. JAMA. 310(3), 308-315.
65. Petersen LR, Marfin AA, (2002). *West Nile Virus: A primer for the clinician*. Ann Intern Med. 137, 173-179.
66. Pierson TC, Diamond MS, (2012). *Degrees of maturity : the complex structure and biology of flaviviruses*. Curr Opin Virol. 2, 168-175.
67. Pletnev AG, Claire MS, Elkins R, Speicher J, Murphy BR, Chanock RM, (2003). *Molecularly engineered live-attenuated chimeric West Nile/dengue virus vaccines protect rhesus monkeys from West Nile virus*. Virology. 314, 190-195.
68. Reiter P, (2010). *West Nile virus in Europe: understanding the present to gauge the future*. Euro Surveill. 15, 19508.
69. Rossi S, Ross TM, Evans JD, (2010). *West Nile virus*. Clin. Lab. Med. 30, 47-65.
70. Sampath A, Padmanabhan R, (2009). *Molecular targets for flavivirus drug discovery*. Antiviral Res. 81, 6-15.
71. Sampathkumar P, (2003). *West Nile Virus: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis and prevention*. Mayo Clin. Proc. 78, 1137-1144.
72. Samuel MA, Diamond MS, (2006). *Pathogenesis of West Nile virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion*. J Virol. 80, 9349-9360.
73. Sanchez MD, Pierson TC, McAllister D, Hanna SL, Puffer BA, Valentine LE, Murtadha MM, Hoxie JA, Doms RW, (2005). *Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus*. Virology. 336(1), 70-82.
74. Savini G, Capelli G, Monaco F, Polci A, Russo F, Di Gennaro A, Marini V, Teodori L, Montarsi F, Pinoni C, Pisciella M, Terregino C, Marangon S, Capua I, Lelli R, (2012). *Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in northern Italy*. Vet. Microbiol. Aug 17. 158(3-4), 267-273.
75. Shi PY, Kramer LD, (2003). *Molecular detection of West Nile virus RNA*. Expert Review of Molecular Diagnostics. n3, 357-366.
76. Shimoni Z, Niven MJ, Pitlick S, Bulvik S, (2001). *Treatment of West Nile virus encephalitis with intravenous immunoglobulin*. Emerging infectious diseases. 7(4), 759.
77. Smithburn K, Hughes T, Burke AA, (1940). *neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda*. Am J Trop Med. 20, 471-492.
78. Spohn G, Jennings GT, Martina BE, Keller I, Beck M, Pumpens P, Osterhaus AD, Bachmann MF, (2010). *A VLP-based vaccine targeting domain III of the West Nile virus E protein protects from lethal infection in mice*. Virol J. 7, 146.
79. Taylor RM, Work TH, Hurlbut HS, (1956). *A study of the ecology of West Nile virus in Egypt*. Am J Trop Med. 5, 579-62013.
80. Tezcan S, Ülger M, Emekdas G, (2011). *Batı Nil Virüsü ve enfeksiyonu*. Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg. 4(3), 9-17
81. Tosun S, (2010). *Batı Nil virüsü enfeksiyonunda klinik ve tedavi*. III. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu, Ankara, Türkiye, 1-2 Kasım 2010, 161-165.
82. Weiss D, Carr D, Kellachan J, Tan C, Phillips M, Bresnitz E, Layton M, and West Nile Virus Outbreak Response Working Group (2001). *Clinical findings of West Nile Virus infection in hospitalized patients, New York and New Jersey 2000*. Emerg Infect. Dis. 7, 654-659.
83. www.cvma.net/publications/press-releases/west-nile-virus-in-dogs-cats/ Erişim Tarihi: 25.10.2016.
84. Yazıcı Z, (2005). *Batı Nil Virüsü enfeksiyonu*. İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection). 19 (1), 139-143.

Toksoplazmozis Kedilerde Davranışsal Değişikliklere Neden Olabilir mi?

Didem Pekmezci¹, Gökmen Zafer Pekmezci²

¹ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Samsun

² Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinik Öncesi Bilimler Bölümü Samsun

Geliş Tarihi / Received: 12.10.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 03.11.2016

Özet: Toksoplazmozis dünyada memeli ve kanatlı türlerini etkileyen ve *Toxoplasma gondii* tarafından oluşturulan son konağı kedigiller olan sistemik protozoon enfeksiyonudur. Dünya genelinde evcil kedilerde (*Felis catus*) seroprevalansın %30-40 arasında olduğu tahmin edilmektedir. İnsanlarda parazitin oluşturduğu problemler açıkça bilinmektedir. Bununla birlikte kedilerde parazitin beyin, spinal kord, göz, akciğer, karaciğer, kalp, iskelet kası, dil, adrenal bez ve böbrek gibi hayati organlarda lezyonlar şekillendirdiği ortaya konulmuştur. Ancak, parazitin kedilerde davranışsal değişikliğe neden olup olmadığı incelenmemiştir. Bu derleme ile *T. gondii*'nin kedilerde insanlardakine benzer davranışsal değişikliklere neden olup olmadığının araştırılması konusuna katkı sunulacağı kanaatindeyiz.

Anahtar kelimeler: Kedi, Toksoplazmozis, Davranışsal değişiklikler

Can Toxoplasmosis Make Behavioural Alterations in Cats?

Abstract: Toxoplasmosis is a protozoan infection, whose definitive host is cats, can affect mammals and avian population whole around the world. It is thought that the seroprevalence among the domestic cats (*Felis catus*) is 30-40% in all over the world. As an intermediate host, problems are all clearly reported in human beings. The parasite can make problems in brain, spinal cord, eyes, lung, heart, muscle, tongue, adrenal glands and kidneys in cats as both an intermediate and definitive host. But behavioral alterations are not investigated in cats. Within the present review it is aimed to guide researchers on new topics about possible roles of toxoplasmosis in behavioral alterations in cats same as seen in human beings.

Key words: Cat, Toxoplasmosis, Behavioural alterations

Giriş

Toksoplazmozis dünyada memeli ve kanatlı türlerini etkileyen ve *Toxoplasma gondii* tarafından oluşturulan sistemik protozoon enfeksiyonudur. Kediler ve diğer *Felidae* türleri *T. gondii*'nin hem ara hem de tek ve son konaklarıdır. Ara konak ise insan dâhil olmak üzere birçok memeli ve kanatlı hayvandır [15,43]. Kedilerde parazitin şizogoni ve gametogoni evrelerini geçirdiği intestinal form şekillenirken herhangi bir klinik bulgu dikkati çekmez. Kedilerde ancak konak direncinin zayıfladığı durumlarda ölümcül sistemik toksoplazmozis şekillenebilmektedir [15,28,29]. Konak parazit ilişkisini konak ve parazite ait genetik faktörler, konağın yaşı, etkenin gelişim aşamasına ait antijenik çeşitlilik ve enfeksiyon dozu gibi kriterler belirler [20]. Birçok konakta başarılı bir şekilde morfolojik formlarını oluşturabilen *T. gondii* ilk olarak Nicolle ve Manceaux tarafından 1908 yılında Kuzey Afrika'da yaşayan bir kemirgen olan *Gundii*'nin böbrek ve karaciğerlerin-

de bulunmuştur. Nicolle ve Manceaux tarafından *Toxoplasma* generu tanımlanmış ve tek tür olarak da *T. gondii* bildirilmiştir [11]. İlk insan olgusu 1923 yılında Prag'lı bir oftalmolog olan Janku tarafından konjenital hidrosefali ve mikroftalmili bir bebeğin retinasında kistlerin bulunması ile rapor edilmiştir. Türkiye'de ilk insan olgusu ise 1953 yılında Unat ve ark. tarafından saptanmıştır [52]. *Toxoplasma gondii* seksüel ve aseksüel üreme ile çoğalabilmektedir. Aseksüel üremeyle akut enfeksiyonun gelişmesinde önemli olan haploid (n kromozom sayılı) takizoitler ile kronik enfeksiyonun gelişiminden sorumlu olan haploid bradizoitler (doku kisti oluşturur) oluşmaktadır. Sadece kedi bağırsak enterositleri içerisinde seksüel üreme ile sporozoit içeren ookistler oluşmaktadır. Seksüel üreme sonucu oluşmuş diploid (2n kromozom sayılı) ookistler dışkı ile atıldıktan sonra sporogoni aşamasında mayoz bölünme geçirerek enfektif haploid sporozoitleri oluşturmaktadır. Daha sonra enfekte olan konaklarda, ookistlerdeki sporozoitler takizoitlere, takizoitler ise konak im-

mun sisteminden korunmak amacıyla bradizoitlere dönüşerek doku kistlerini oluşturmaktadırlar. Kesin konak kedigillerde, yukarıdaki yaşamsal evre dönüşümü dışında bradizoitler eşeyli üremeyi gerçekleştirecek olan merozoitlere dönüşmektedirler [23,48]. Kedigiller dış ortam koşullarına dirençli enfektif ookistleri dışkı içinde yaydıklarından hastalığın bulaşında anahtar konak kabul edilmektedir [19]. Günümüzde, 17 kedi türünün *T. gondii* ookistlerini oluşturabildiği belirlenmiştir [16, 40]. Kedi nüfusunun beslenme şekli, ev/sokak kedisi olması gibi faktörler toksoplazmozis seroprevalansında bölgesel değişikliklere neden olmaktadır. Dünya geneline bakıldığında evcil kedilerde (*Felis catus*) seroprevalansın %30-40 arasında olduğu tahmin edilmektedir [19]. Almanya, Fransa ve İtalya'da yapılan çalışmalarda kedilerde seropozitifliğin %9-46 arasında değiştiği izlenmiştir. Orta Amerika'da bu oranın %42-74 arasında değiştiği, Meksika, Brezilya, Şili, Arjantin gibi ülkelerin yer aldığı Güney Amerika'da da %18-73 arasında olduğu bildirilmektedir [19]. Yine Amerika da yapılan başka bir çalışmada klinik olarak hasta olan kedilerde toksoplazmozis seroprevalansı %31,6 (n: 12628) olarak bulunmuştur [39]. Tayvan, Japonya, Bangladeş, Singapur ve Kore gibi Asya ülkelerinde yapılan çalışmalarda seropozitiflik oranı %8-33 arasında bulunmuştur [17]. Mısır ve Etiyopya gibi Afrika ülkelerinde bu oranın %91-97 arasında olduğu belirtilmiştir [17]. Türkiye'de de kedilerde seroprevalans çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ankara'da yapılan bir çalışmada ev ve sokak kedilerinde Sabin-Feldman dye testi ile %40, indirekt floresan antikor testi ile %34,3, Niğde'de yapılan diğer bir çalışmada Sabin-Feldman dye testi ile %76 oranında seropozitiflik saptanmıştır [37,45]. Ankara'da yapılan diğer bir çalışmada Sabin-Feldman dye testi ile %43 oranında seropozitiflik gözlemlenmiştir [32]. Elazığ bölgesinde yapılan çalışmada ise Sabin-Feldman dye test ile %55 oranında seropozitiflik bildirilmiştir [2]. Benzer şekilde İzmir sokak kedilerinde yapılan bir seroprevalans çalışmasında ölmüş ve sağlıklı sokak kedilerinde sırasıyla %42-48 ve %33,4-34,4 oranında seropozitiflik tespit edildiği bildirilmiştir [8]. Aynı çalışmada ölmüş sokak kedilerinde toksoplazmozis seroprevalans oranları sağlıklı kedilere göre belirgin şekilde daha yüksek bulunmuştur [8]. Kars ili ve çevresinde ise evde yaşayan kedilerde *T. gondii* açısından seropozitiflik oranı %44,1 olarak tespit edilmiştir [21].

Kedilerde klinik

Toxoplasma gondii ile enfekte kedilerde belirgin bir klinik gelişmediği, nadiren enteroepital döngüde bazı problemlerin görülebileceği belirtilmiştir. Deneysel olarak doku kistleri ile ağızdan enfekte edilen kedilerin %10-20'sinde bir-iki hafta sürebilen ishal gelişebileceği ve bu duruma organizmanın enteroepitel çoğalmasının neden olduğu rapor edilmiştir. Son zamanlarda kedilerde yapılan çalışmalarda eozinofilik fibroz gastritis de tanımlanmıştır [42]. Primer enfeksiyon sonrası takizoitlerin aşırı intraselüler çoğalmasının ölümcül ekstraintestinal toksoplazmozise sebep olabileceği ve enfeksiyonun karaciğer, akciğer, beyin ve pankreatik dokulara da yayılabileceği bildirilmiştir. Kedilerde transplental bulaşma sonucunda ekstraintestinal toksoplazmozis gelişebileceği, genellikle akciğer veya karaciğer tutuluşuyla ölümle sonuçlanabileceği belirtilmiştir [39]. İmmun sistem bozuklukları bulunan kedilerde yaygın toksoplazmozis geliştiği gözlemlenmiştir [4]. Yaygın toksoplazmozisli kedilerde depresyon, iştahsızlık, ateş, peritoneal sıvı birikimi, sarılık ve nefes darlığı görüldüğü, kronik toksoplazmozisli kedilerde üveit, kutanöz lezyonlar, ateş, kaslarda aşırı hassasiyet, aritmi ile seyreden miyokardit, kilo kaybı, iştahsızlık, felç, ataksi, sarılık, diyare ve nefes darlığı da gelişebileceği bildirilmiştir [39]. *Toxoplasma gondii* için son konak olan kedilerde genellikle toksoplazmozis kliniği oluşmadığı, fakat kedinin yaşına, tekrar enfeksiyonun gelişmesi ve immunsupresyon durumuna bağlı olarak belirli patolojilerin meydana gelebileceği bildirilmiştir [16]. Dubey ve ark. (2010) tarafından yapılan başka bir çalışmada, konjenital olarak enfekte edilmiş yeni doğan kedilerde nekroza eşlik eden nötrofil ve makrofaj infiltrasyonunun vücudun çeşitli organlarına yayıldığı rapor edilmiştir. Bu organlar arasında akciğer, karaciğer, kalp, iskelet kası, dil, beyin, spinal kord, göz, adrenal bez ve böbrek bulunmaktadır. Karaciğerde litik hepatoselüler nekroz, hepatoselüler bölge kayıplarına sebep olmaktadır. Portal bölgeler lenfosit, plazma hücresi, makrofaj ve daha az sıklıkta nötrofiller içermektedir. Akciğerlerde tip II pnömositlerde, hiperplazi ve septal kapillerde tıkanmalar gözlenmiştir. Ayrıca alveollerin çok sayıda vakuollenmiş sitoplazmaya sahip makrofaj içerdiği saptanmıştır. Oküler lezyonlar vasküler alan ile sınırlandırılmış ve retinada da bulunmuştur [46].

Merkezi sinir sisteminde de benzer şekilde multifokal hafif gliosis ve hemoraji görülmektedir [14].

Diğer Hayvanlardaki patoloji

Gebelik sırasında toksoplazmoza yakalanan seroneгатif dişi koyunlarda abort meydana gelebilir [13]. Gebeliğin 110. gününden sonra bulaşma meydana gelirse klinik olarak normal ancak *T. gondii* doku kistlerini içeren yavrular meydana gelebilmektedir [3,6]. Sonuç olarak koyunlarda gebelik sırasındaki enfeksiyon embriyo ölümü, mummylaşma, abort, ölü doğum ve neonatal ölümlere yol açabilir [18]. Enfekte fötusların çoğu kuzulama dönemine yakın olarak atılır. Koyunlarda üst üste iki kez abort görülmesi düşük bir olasılıktır ancak koyunlara enterotoksemi aşısı uygulamasının ankiste haldeki *T. gondii* doku kistlerin etkinleşmesine yol açabileceği bildirilmiştir [43]. Bu nedenle koyunlarda *T. gondii* ookistleriyle çevresel kontaminasyonun, vertikal bulaşmaya göre daha az önem taşıdığı gösterilmiştir [7]. *Toxoplasma gondii* büyük ruminantlarda önemli düzeyde abort ve klinik hastalığa sebep olmaz ve gebe ineklerde deneysel oluşturulan hastalık modelleri haricinde, dokularda etken bulunmasına karşın hastalığa yol açmaz [12,43]. Domuzda pnömoni, ensefalitis ve abortla karakterize bulgular görülebilmektedir [34]. Tüm evcil hayvanlarda interstisyel pnömoni, multifokal hepatik nekroz, lenfadenitis, myokarditis ve nonsupuratif meningoensefalitis görülebilir [35,40].

İnsanlarda Toksoplazmozis

Ateş, gece terlemesi, karaciğer ve dalak büyümesi, kas ve baş ağrısı görülebilir [47]. Meydana gelen lenfadenopati ilk enfeksiyondan sonra farklı zamanlarda tekrar edebilmektedir [48]. Hodgkin lenfoma'lı hastalar, kollagen vasküler bozukluğu olanlar, organ transplantasyonu yapılanlar, ilaç bağımlıları ve AIDS'li hastalar toksoplazmoz açısından risk grubunda yer alır ve prognoz oldukça kötüdür [15]. Konjenital toksoplazmoz, hamilelik esnasında enfeksiyonun alınması dışında, latent haldeki enfeksiyonun immun sistemi baskılamasıyla tekrar akut hale gelmesi sonucu etkenin fötusa vertikal yolla bulaşmasından da ileri gelebilir [27]. Gebeliğin ilk 3 aylık döneminde düşük, ikinci üç aylık dönemde erken veya ölü doğum ve anomaliye son üç aylık dönemde ise sağlıklı doğum ancak erken bebek ölümlerine neden olabilir [38].

***Toxoplasma gondii* Enfeksiyonları ve Davranış Değişiklikleri Arasındaki İlişkiler**

Enfeksiyonlarla psikiyatrik hastalıklar arasında bir ilişki olduğu uzun yıllardan bu yana bilinmektedir. *Toxoplasma gondii* enfeksiyonu tüm dünya ülkelerinde yaygın seropozitiflik oranına sahiptir ve özellikle koyun, keçi tüketiminin yaygın olduğu Fransa, İngiltere, Avusturya gibi ülkelerde insan nüfusunun hemen yarısının *T. gondii* seropozitif olduğu tahmin edilmektedir [15]. Fransa gibi ülkelerde parazitlerin görülme sıklığının artması ise pozitifliğin sanitasyon kurallarının yanında çiğ ya da az pişmiş et ile beslenme alışkanlığı ile açıklanmaktadır [33]. Ülkemizin ise çeşitli bölgelerinde yapılan çalışmalar sonucunda *T. gondii* pozitiflik oranının %43-85 arasında değiştiği ve batı bölgelerinde bu oranın doğu ve orta Anadolu bölgelerine kıyasla daha düşük olduğu tespit edilmiştir [44,49,51,57,59]. Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda şizofren bireylerde *T. gondii* enfeksiyonunun daha fazla gözlemlendiği rapor edilmiştir [5,48,50]. Yine de şizofreni ile *T. gondii* enfeksiyonu arasında ilişkiye vurgu yapılırken, düşük sosyo-ekonomik ve sosyo-kültürel düzey, özbakımda azalma şizofrenik bireylerin enfeksiyona yatkınlığının artırması yönündeki etkilerinin de göz önünde bulundurulması gerekliliğinin de unutulmaması gerektiği vurgulanmaktadır. Toksoplazmozun şizofreni için, tek başına hastalık geliştirici bir etken olmaktan çok, konağa ait faktörlerle (immun sistem, psikiyatrik yatkınlık gibi) etkileşerek önemli bir risk oluşturduğu da öne sürülmektedir [36]. İnsanlarda görülen depresyon, Alzheimer, şizofreni gibi nörolojik hastalıklarda hipokampal bölgede anormal değişiklikler görülmektedir. Bu nedenle yapılan deneysel çalışmalarda kronik enfekte farelerde hipokampus sınırında perivasküler hücresel infiltrasyon varlığı oldukça önemli kabul edilmektedir [30]. Davranış değişiklikleri ile ilgili olarak, *T. gondii*'nin rodentlerde, özellikle kediye karşı duyarlılığa neden olduğu öne sürülmüştür. Rodentlerde *T. gondii*'nin öğrenmeye olumsuz etkisini gösteren çalışma sonuçları da bulunmaktadır [29]. *Toxoplasma gondii* ile enfekte kemiriciler, kedi idrarından korkmazlar. Kemiricilerin bu kokuyu feromon olarak algılayıp seksüel olarak ilgilerinin arttığına dair çalışmalar mevcuttur [54].

Dopamin (DA), vücutta doğal olarak üretilen bir kimyasaldır. Beyinde dopamin reseptörlerini ak-

tive ederek nörotransmitter olarak görev yapar. Dopamin ayrıca hipotalamustan da salgılanır ve kana karışarak nörohormon görevi yapar. Nörohormon olarak görevi hipofizinin ön lobundan prolaktin salgılanmasını baskılamaktır. Dopamin dikkat, bağımlılık gibi davranışları ayarlamakta ve hormonal düzenlemelerde fizyolojik olarak önemli rol oynamaktadır [9]. *Toxoplasma gondii* serebral hemisferler, bazal ganglionlar, serebellum ve beyin sapı başta olmak üzere merkezi sinir sistemi üzerine güçlü bir tropizm gösterir. Nöropatolojik çalışmalarda *T. gondii*'nin nöronlar, glial hücreler ve özellikle astrositler üzerine invitro selektif etkisi olduğu gösterilmiştir. Postmortem çalışmalarda şizofrenili hastaların beyinlerinde glial anormalliklerin mevcut olduğu ve özellikle astrositlerin sayısında azalma olduğu tespit edilmiştir [10]. *Toxoplasma gondii*'nin merkezi sinir sistemi üzerine bir diğer etkisi nörotransmitter yolağında yaptığı değişikliklerdir. Bu zorunlu hücre içi parazit dopamin, norepinefrin ve diğer nörotransmitter sentezini etkilemektedir [25,56]. Şizofreni hastalarında da özellikle dopamin, glutamat ve gamma aminobutirik asit gibi nörotransmitterler anormal düzeyde seyrederek [60]. Bir çalışmada, toksoplazma enfeksiyonu ile dopamin artışının arkasındaki mekanizmanın tam olarak bilinmemesine rağmen, interlökin-2 gibi sitokinlerin artışına bağlı inflamatuvar yanıt olarak dopaminin salınabildiği vurgulanmıştır [55]. *Toxoplasma* enfeksiyonu sırasında astrositler aktive olarak beyinde kinurenik asit üretimini arttırmaktadır. Beyinde artmış kinurenik asit seviyesi glutamin ve nikotin nörotransmitter reseptörlerini inhibe etmekte ve bunun da şizofrenideki kognitif semptomlara neden olduğuna inanılmaktadır [1]. Yapılan bir çalışmada *T. gondii*'nin katekolamin metabolizmasında anormalliklere neden olduğu ve bunun enfekte kemirgenlerde gözlenen psikolojik ve motor değişikliklerin nedeni olabileceği vurgulanmıştır [60].

Serotonin beyin sapında bulunan Raphe çekirdeği tarafından üretilen bir nörotransmitterdir. Birçok çalışmada serotoninin morfogenez, glial hücrelerin çoğalması, nöronal farklılaşma ve bağlantıların oluşmasında rol aldığı gösterilmiştir [24]. Serotonin diğer sistemlerin nörotransmitter salgılamalarını kontrol ederek değişik mizaç durumları, duygu durum, anksiyete, düşünce, oryantasyon, iştah, hiddet, dürtü (impuls) kontrolü ve seksüel

aktivitenin düzenlenmesinde etkili olup üretimi ve metabolizmasındaki değişiklikler bir çok farklı davranışların ortaya çıkmasıyla ilişkilendirilmektedir [31,58]. Depresyon, anksiyete, sosyal fobi, şizofreni, obsesif kompulsif şiddet ve saldırganlık, yeme bozuklukları, bulantı ve kusma gibi birçok bozukluğun etiolojisinde serotonin yer aldığı bildirilmiştir. Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) dürtü kontrolüyle yakından ilgili olduğu yapılan araştırmalarda ortaya konmuştur. Beyindeki serotonin düzeylerindeki azalmanın davranışın inhibisyonunu azalttığı belirtilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda ise beyinde serotonin eksikliğinin dürtüsel seçimlerin artışına yol açtığı bildirilmiştir. Bunun aksine serotonin düzeyinin artırılması ise dürtüsel seçim yapma davranışının azalmasına neden olmaktadır [31,53]. Parazitin etkilediği bir diğer yol triptofan metabolik yoludur. Triptofan esansiyel bir aminoasit olup serotonin ve melatonin gibi nörokimyasal medyatörlerin öncülüdür. *Toxoplasma gondii*'nin takizoid evresinde replikasyonun sağlanması için bu aminoasite gereksinim vardır [22]. Son çalışmalarda *T. gondii* genomunda, beyinde dopamin sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan tirozin hidroksilazı kodlayan iki gen mevcut olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular, toksoplazmanın dopamin ve serotonin üzerine etkisi ile konak davranışında değişiklik yapabileceğini desteklemektedir [26]. Öte yandan farelerde kronik *T. gondii* enfeksiyonun reaktivasyonu sonucunda dişi BALB/c farelerinde davranışsal değişikliklerin saptandığı en son çalışmada *T. gondii* enfeksiyonun reaktivasyon aşamasında triptofan katabolik şantın ve serotonin düzeylerinin tersine değişmesinin depresyon-benzeri davranışa neden olduğu kanıtlanmıştır [41].

Sonuç

1953 yılından günümüze kadar yapılan çalışmalar *Toxoplasma* enfeksiyonunun şizofreni gelişiminde anlamlı risk faktörü olduğunu güçlü bir şekilde desteklemektedir. Ayrıca antipsikotikler üzerine yapılan çalışmalar *T. gondii* üzerinde etkili olan azitromisin, trimetoprim sulfametaksazol ve primetamin sulfadiazin gibi antibiyotiklerin şizofreni tedavisinde yararlı olabilme olasılığını düşündürmektedir. Bu konuda daha çok çalışma yapılması, hem toksoplazmozis hem de şizofreni tedavisi için potansiyel yeni tedavi kombinasyonları ve tedavi modelleri geliştirilmesinde yol gösterici olacaktır.

İnsanlarda davranış değişiklikleri ile toksoplazmozis arasındaki ilişkiyi irdeleyen çalışmalar oldukça yeni olmakla beraber enfeksiyon için ara ve son konak olan kedilerde parazitin benzer değişiklikler yapıp yapmadığı henüz araştırılmış bir konu değildir. İnsanlarda parazitin yaratmış olduğu problemler açıkça bilinmektedir. Bununla birlikte kedilerde parazitin beyin, spinal kord, göz, akciğer, karaciğer, kalp, iskelet kası, dil, adrenal bez ve böbrek gibi hayati organlarda lezyonlar şekillendirdiği ortaya konulmuştur. Ancak, parazitin kedilerde davranışsal değişikliğe neden olup olmadığı incelenmemiştir.

Sonuç olarak sunulan bu derleme ile *T. gondii*'nin kedilerde insanlardakine benzer davranışsal değişikliklere neden olup olmadığının araştırılması konusuna katkı sunacağı kanaatindeyiz.

Kaynaklar

- Arias I, Sorlozano A, Villegas E, (2012). Infectious agents associated with schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Res.* 136, 128-136.
- Babür C, Aktaş M, Dumanlı N, Attaş MG, (1998). Elazığ yöresinde kedilerde sabin-feldman boya testi ile Anti-toksoplazma gondii antikorlarının araştırılması. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci.*14, 55-58.
- Baszler TY, Dubey JP, Löhr CV, Foreyt WJ, (2000). Toxoplasmic encephalitis in a free-ranging rocky Mountain bighorn sheep from Washington. *J Wildl Dis.* 36(4), 752-754.
- Beatty J, Barrs, V, (2003). Acute toxoplasmosis in two cats on cyclosporine therapy. *Aust Vet J.* 81, 339.
- Brown SA, (2008). The risk for schizophrenia from childhood and adult infections. *Am J Psychiatry.* 165, 7-10.
- Buxton D, (1990). *Ovine Toxoplasmosis: A Review.* J Roy Soc Med. 83(8), 509-511.
- Buxton D, Rodger SM, Marley SM, Wright SE, (2006). Toxoplasmosis: The possibility of vertical transmission. *Small Ruminant Research.* 62, 43-46.
- Can H, (2014). İzmir sokak kedilerinde toxoplasmosis: Toxoplasma gondii suşlarının Mikrosatellit genotiplendirilmesi ve Toxoplasmosis seroprevalansı. Doktora tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Çelik G, Tahiroğlu A, Avcı A, (2008). Ergenlik döneminde beynin yapısal ve nörokimyasal değişimi. *Klinik Psikiyatri.* 11, 42-47.
- Çetinkaya Z, Yazar S, Gecici O, Namli MN, (2007). Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in patients with schizophrania-preliminary findings in a Turkish sample. *Schizophr Bull.* 33, 789-791.
- Değirmenci A, (2009). Toxoplasma gondii canlı takozit üretiminde fare kullanımına alternatif: sürekli hücre kültürü. Doktora tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Dubey JP, (1986). A Review of Toxoplasmosis in cattle. *Vet Par.* 22, 177-202.
- Dubey JP, (1987). Serodiagnosis of postnatally and prenatally induced Toxoplasmosis in sheep. *AJVR.* 48(8), 1239-1243.
- Dubey JP, Mattix ME, Lipscomb TP, (1996). Lesions of neonatally induced toxoplasmosis in cats. *Vet Pathol.* 33(3), 290-295.
- Dubey JP, (2010). *Toxoplasmosis of Animals and Man.* Second Edition, CRC Pres, New York.
- Dubey JP, Prowell M, (2013). Ante-mortem diagnosis, diarrhea, oocyst shedding, treatment, isolation, and genetic typing of *Toxoplasma gondii* associated with clinical toxoplasmosis in a naturally infected cat. *J Parasitol.* 99(1), 158-160.
- Dubey JP, Darrington C, Tiao N, Ferreira LR, Choudhary S, Molla B, Saville WJ, Tilahun G, Kwok OC, Gebreyes WA, (2013). Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from tissues and feces of cats from Addis Ababa, Ethiopia. *J Parasitol.* 99(1), 56-58.
- Duru SY, Kul O, (2016). Toksoplazmozis. *J Vet Sci Intern Med-Special Topics* 2(1), 58-62.
- Elmore SA, Jones JL, Conrad PA, Patton S, Lindsay DS, Dubey JP, (2010). *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol.* 26(4), 190-196.
- Epiphanyo S, Sinhorini IL, Catao-Dias JL, (2003). Pathology of Toxoplasmosis in captive new world primates. *J Comp Pathol.* 129, 196-204.
- Erkılıç EE, Mor N, Babür C, Kırmızıgül AH, Beyhan YE, (2016). The Seroprevalence of Toxoplasma gondii in Cats from the Kars Region, Turkey. *Isr J Vet Med.* 71(3), 31-35.
- Fabiani S, Pinto B, Bruschi F, (2013). Toxoplasmosis and neuropsychiatric diseases: can serological studies establish a clear relationship? *Neurol Sci.* 34, 417-425.
- Ferguson DJ, (2004). Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int J Parasitol.* 34(3), 347-360.
- Fiş NP, Berkem M, (2009). Nörotransmitter sistemlerinin gelişimi ve psikopatolojiye yansımaları. *KPB.* 19, 312-321.
- Flegr J, (2013). Influence of latent toxoplasma infection on human personality, physiology and morphology: pros and cons of the toxoplasma-human model in studying the manipulation hypothesis. *J Exp Biol.* 216, 127-133.
- Hamidinejat H, Ghorbanpoor M, Hosseini H, (2010). *Toxoplasma gondii* infection in first-episode and inpatient individuals with schizophrenia. *Int J Infect Dis.* 14, 978-981.
- Harma M, Gungen N, Demir N, (2004). Toxoplasmosis in pregnant woman in Sanliurfa, South eastern Anatolia city in Turkey. *J Egypt Soc Parasitol.* 34, 519-525.
- Hazıroğlu R, Altın Saat S, Atasever A, Akın G, (1988). Kedilerde fatal Toksoplazmozis. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 35(2-3), 330-340.

29. Hazıroğlu R, (1993). An ultrastructural study of *Toxoplasma gondii* developmental stages in the lungs of the Cat. *Isr J Vet Med.* 48, 65-68.
30. Hermes G, Ajioka WJ, Kelly AK, Mui E, Roberts F, Kasza K, Mayr T, Kirisits MJ, Wollmann R, Ferguson JPD, Roberts CW, Hwang JH, Trendler T, Kennan R, Suzuki Y, Reardon C, Hickey WF, Chen L, Mcleod R, (2008). Neurological and behavioral abnormalities, ventricular dilatation, altered cellular functions, inflammation, and neuronal injury in brains of mice due to common, persistent, parasitic infection. *J Neuroinflammation.* 5-48.
31. Işıloğlu B, (2006). Anksiyete ve depresyon tanısı ile izlenen evli kadınlarda aile içi şiddetin sosyodemografik faktörler, çift uyumu ve hastalıkla ilişkisi. Uzmanlık Tezi, T.C Sağlık Bakanlığı Bakırköy Prof. Dr. Mahzar Osman Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi 12. Psikiyatri Birimi, İstanbul.
32. İnci A, Budak C, Dinçer Ş, (1996). Ankara'da kedilerde Sabin-Feldman boya testi ile anti-*Toxoplasma gondii* antikorlarının araştırılması. *T Parazitoloj Derg.* 20(3-4), 407-411.
33. Jeannel D, Niel G, Costagliola D, Danis M, Traore BM, Gentilini M, (1988). Epidemiology of toxoplasmosis among pregnant women in the Paris area. *Int J Epidemiol.* 17, 595-602.
34. Jones TC, Hunt RD, King NW, (1996). Toxoplasmosis. In: *Veterinary Pathology 6th Copyright by Williams and Wilkins. USA,* p: 521-555.
35. Jubb KVF, Keneddy PC, Palmer N, (2007). *Pathology of Domestic Animals. 5th Edition Vol. 2, California: Academic Press.* p: 308-310.
36. Karabulut N, (2013). Toksoplazma ve Şizofreni. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 43(2), 39-44.
37. Karatepe B, Babür C, Karatepe M, Kiliç S, Dündar B, (2008). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies and intestinal parasites in stray cats from Niğde, Turkey. *Ital J Anim Sci.* 7, 113-118.
38. Kravetz JD, Federman DG, (2005). Toxoplasmosis in pregnancy. *Am J Med.* 118(3), 212-216.
39. Lappin MR, (2010). Update on the diagnosis and management of *Toxoplasma gondii* infection in cats. *Topics in Companion An Med.* 25(3), 136-141.
40. Lukešová D, Literák I, (1998). Shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by Felidae in zoos in the Czech Republic. *Vet Par.* 74, 1-7.
41. Mahmoud ME, Ihara F, Fereig RM, Nishimura M, Nishikawa Y, (2016). Induction of depression-related behaviors by reactivation of chronic *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Behav Brain Res.* 298, 125-133.
42. McConnell JF, Sparkes AH, Blunden AS, Neath PJ, Sansom J, (2007). Eosinophilic fibrosing gastritis and toxoplasmosis in a cat. *JFMS.* 9(1), 82-88.
43. Milli ÜH, Hazıroğlu R, (2000). *Veteriner Patoloji.* Medipress, Malatya.
44. Ocak S, Zeteroglu S, Ozer C, Dolapcioglu K, Gungoren A, (2007). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, rubella and cytomegalovirus among pregnant women in southern Turkey. *Scan J of Infec Diseases.* 39, 231-234.
45. Özkan AT, Çelebi B, Babür C, Lucio-Forster A, Bowman DD, Lindsay DS, (2008). Investigation of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cats of the Ankara region of Turkey using the Sabin-Feldman dye test and an indirect fluorescent antibody test. *J Parasitol.* 94(4), 817-820.
46. Paul M, (1999). Immunoglobulin G avidity in diagnosis of Toxoplasmic lymphadenopathy and ocular Toxoplasmosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 514-518.
47. Schwartzman JD, (2001). Toxoplasmosis. Gillespie SH, Pearson RD. eds. *Principles and Practice of Clinical Parasitology.* p. 113-138.
48. Sibley LD, Asis K, James WA, Rosenthal BM, (2011). Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Phil Trans Biol Sci.* 364(1530), 2749-2761.
49. Tamer GS, Dundar D, Caliskan E, (2009). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, rubella and cytomegalovirus among pregnant women in western region of Turkey. *Clin Invest Med.* 32(1), 43-47.
50. Tanyüksel M, Uzun Ö, Araz E, Koru Ö, Babür C, (2010). Possible role of toxoplasmosis in patients with first-episode schizophrenia. *Turk J Med Sci.* 40(3), 399-404.
51. Tekay F, Özbek E, (2007). The seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in women from Sanliurfa a province with high a raw meatball consumption. *T Parazitoloj Derg.* 3, 176-179.
52. Unat EK, (1983). *Toxoplasma gondii*'nin ve Toksoplazmozis'in tarihçesi: Toksoplazmozis. *T Parazitoloj Derg.* 3, 1-8.
53. Uzbay T, (2004). Anksiyete ve depresyonun nörobiyolojisi. *Klinik Psikiyatri.* Ek 4, 3-11.
54. Vyas A, Kim SK, Giacomini N, Boothroyd JC, Sapolsky RM, (2007). Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Neuroscience.* 104(15), 6442-6447.
55. Wang T, Tang ZH, Li JF, Li XN, Wang X, Zhao ZJ, (2013). A potential association between *Toxoplasma gondii* infection and schizophrenia in mouse models. *Exp Parasitol.* 135, 497-502.
56. Webster JP, Lamberton PHL, Donnelly CA, Torrey EF, (2006). Parasites as causative agents of human affective disorders? The impact of anti-psychotic, mood-stabilizer and anti-parasite medication on *Toxoplasma gondii*'s ability to alter host behaviour. *Proc Biol Sci.* 273, 1023-1030.
57. Yazar S, Altunoluk B, Akman AA, Sahin I, (2000). Investigation of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in women during pregnancy. *T Parazitoloj Derg.* 24, 343-345.
58. Yazıcı K, Yazıcı AE, (2010). Dürtüsellüğün nöroanatomik ve nörokimyasal. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar.* 2(2), 254-280.
59. Yılmaz M, Altındis M, Cevrioglu S, (2004). Toxoplasma, cytomegalovirus, rubella, hepatitis B and hepatitis C seropositivity rates in pregnant women who live in Afyon region. *The Medical Journal of Kocatepe.* 5, 49-53.
60. Yolken RH, Dickerson FB, Fuller TE, (2009). Toxoplasma and schizophrenia. *Parasite Immunol.* 31, 706-715.