

ISSN 1016-3573



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



ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ

JOURNAL OF ETLİK VETERINARY MICROBIOLOGY
ANKARA – TURKEY

Cilt/Volume 28 ♦ Sayı/Number 1 ♦ 2017

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi
Cilt/Volume 28 ♦ Sayı/Number 1 ♦ 2017
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*

Yrd.Doç.Dr. Enes ATMACA	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fak. Klinik Öncesi Bilimler
Dr. Orhan AYLAN	Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Hayvan Sağlığı ve Karantina Daire Başkanlığı
Doç.Dr. Metin ÇENESİZ	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fak. Temel Bilimler
Doç.Dr. Alper ÇİFTÇİ	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fak. Klinik Öncesi Bilimler
Yrd.Doç.Dr. Ahu DEMİRTAŞ	Mehmet Akif Ersoy Üniv. Veteriner Fak. Temel Bilimler
Prof.Dr. Suat DİKEL	Çukurova Üniv. Su Ürünleri Fak. Su Ürünleri Yetiştiriciliği
Doç.Dr. Önder DÜZLÜ	Erciyes Üniv. Veteriner Fak. Klinik Öncesi Bilimler
Prof.Dr. Semra GÜMÜŞOVA	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fak. Klinik Öncesi Bilimler
Dr. Elçin GÜNAYDIN	VKMAE Yetiştirme Hastahıkları Teşhis Laboratuvarı
Yrd.Doç.Dr. Gökhan İNAT	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fak. Besin Hijyeni ve Teknolojisi
Dr. Güzin İPLİKÇİOĞLU ÇİL	Ankara Üniv. Veteriner Fak. Besin Hijyeni ve Teknolojisi
Yrd.Doç.Dr. H. Kaan MÜŞTAK	Ankara Üniv. Veteriner Fak. Mikrobiyoloji AD
Doç.Dr. Ertan Emek ONUK	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fak. Klinik Öncesi Bilimler
Doç.Dr. Serap SAVAŞAN	Adnan Menderes Üniv. Veteriner Fak. Klinik Öncesi Bilimleri ü
Prof.Dr. Kezban ŞAHNA	Fırat Univ. Veteriner Fak. Klinik Öncesi Bilimler
Prof.Dr. Emine ATAĞIŞI	Kafkas Univ. Veteriner Fak. Biyokimya AD
Yrd.Doç. Dr. İlknur UÇAK	Niğde Ömer Halisdemir Üniv. Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fak. Hayvansal Üretim ve Teknolojileri
Doç.Dr. Banu YARDIMCI	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fak. Klinik Öncesi Bilimler
Prof.Dr. Hasret YARDİBİ	İstanbul Üniv. Veteriner Fak. Temel Bilimler, Biyokimya AD
Prof.Dr. Alparslan YILDIRIM	Erciyes Üniv. Veteriner Fak. Klinik Öncesi Bilimleri, Parazitoloji AD

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

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

Copyright © Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2017, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

Basım Tarihi / Publishing Date: Haziran / June 2017, Baskı adedi / Circulation: 500

Tasarım ve Baskı / Printing



Medisan Yayınevi Ltd.Şti.

Çankırı Cad. 45 / 347 Ulus - Ankara, Türkiye

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

İçindekiler / Contents

Derleme / Review Article	Sayfa
<hr/>	
<i>Escherichia coli</i> Patotiplerinin Virülens Faktörleri	
Virulence Factors of <i>Escherichia coli</i> Pathotypes	
Mehmed Omerovic, H. Kaan Müştak, İnci Başak Kaya.....	1
Melatonin, Etkileri ve Kullanım Alanları	
Melatonin, its Effects and Uses	
Ayris Salt, Metin Çenesiz, Sena Çenesiz.....	7
Balıkların Önemli Viral Hastalıkları	
Important Viral Diseases of Fish	
Ali Küçük, Yakup Yıldırım.....	13
Tatlı Su Balıklarının <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> Enfeksiyonunda Aşı Çalışmaları	
Vaccination Studies on <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> Infection in Freshwater Fishes	
Coşkun Aydın, Gökmen Zafer Pekmezci.....	23
Kemik Dokusunun Fizyolojisi	
Physiology of Bone Tissue	
Burcu İnsal, İlksin Pişkin.....	28
<hr/>	
Araştırma Makalesi / Research Article	
Akut Tolüen Maruziyetinin Tavşan Beyin Korteksinde Yol Açtığı Toksik Etkiler	
Toxic Effects That Induced Acute Toluene Exposure In Rabbit Brain Cortex	
Mustafa Çiçek, Turgay Şişman.....	33
Samsun ili ve ilçelerinde yetiştirilen Anadolu mandalarının dışkı örneklerinde <i>Escherichia coli</i> O157:H7'nin tespiti	
Determination of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in Anatolian buffaloes' feces in and around Samsun	
Çağatay Nuhay, Timur Gülhan.....	39
Etsiz Çiğ Köftelerde Patojen <i>Candida</i> spp. Varlığının Tespiti	
Detection of Pathogen <i>Candida</i> spp. in Cig Kofte-Meatless Raw Meatball	
Özen Kurşun Yurdakul, Seval Sevgi Kırdar, Erhan Keyvan.....	46

Evaluation of Different PCR Systems for the Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in Chicken Trachea

Farklı PCR Sistemlerinin Tavuk Trakeasından *Mycoplasma gallisepticum* Tespiti için Değerlendirilmesi
Serpil Kahya Demirbilek51

Çörek Otu (*Nigella sativa*) Yağının Gökkuşuğu Alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) Karaciğer Yağ Asidi Profiline Etkisi

Effect of Black Cumin Oil (*Nigella sativa*) on Liver Fatty Acid Profile of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)
Mustafa Öz.....55

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayım Koşulları

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Teşekkür bölümü, gerekli görülüyorsa kaynaklardan hemen önce belirtilmelidir.

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

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

Kaynak yazımı ve sıralaması aşağıdaki gibi yapılmalıdır;

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 Yayım Komitesi'nin basıma ilişkin kararı, yazar(lar)ına bildirilir.

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

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

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

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

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

14. Dergiye gönderilen yazılar geliş tarihine göre yayımlanır.

15. Yayımlanmayan yazılar, yazarına iade edilmez.

Journal of Etlik Veterinary Microbiology Publication Conditions

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgements must be indicated before references if necessary.

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

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

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

For articles:

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

For books:

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

Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi
Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi - Ankara

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

Yayının adı:

Yazar/ların ad/ları:

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

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

Yazar ad/ları	İmza	Tarih
---------------	------	-------

Yazışma Adresi:

Copyright Release

Journal of Etlik Veterinary Microbiology Ankara - TURKEY

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

Title of paper:

Authors names:

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

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

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

To be signed by all author/s

Authors names	Signature	Date
---------------	-----------	------

Correspondence Address:

Escherichia coli Patotiplerinin Virülens Faktörleri

Mehmed Omerovic, H. Kaan Müştak, İnci Başak Kaya

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06110, Dışkapı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 27.03.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 26.05.2017

Özet: *Escherichia coli*, Enterobacteriaceae ailesinde yer alan Gram negatif, fakültatif anaerob, hareketli, spor oluşturmeyen çomak şeklinde bir bakteridir. Patojenik *E. coli*'ler oluşturduğu hastalığın türüne ve sahip olduğu virülens özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. *E. coli* suşları bağırsak dışı enfeksiyonlara (ekstraintestinal) ve bağırsak enfeksiyonlarına (intestinal) neden olanlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Diyarejenik *E. coli* patotipleri; enterotoksijenik *E. coli*, enteropatogenik *E. coli*, Vero- veya Shiga-toksin üreten *E. coli*, enterohemorajik *E. coli*, enteroagregatif *E. coli*, enteroinvaziv *E. coli* ve diffüz aderent *E. coli*'dir. Ekstraintestinal patojenik *E. coli*'ler; septisemik patojenik *E. coli*, üropatojenik *E. coli*, avian patojenik *E. coli*, meme patojenik *E. coli* ve rahim enfeksiyonlarına neden olanlar, endometriyal patojenik *E. coli*'dir. Bu makalede, yukarıda adı geçen patotiplerin virülens faktörleri ve bu virülens faktörlerin hastalık oluşumundaki rollerinden bahsedilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Escherichia coli*, patotip, virülens faktörü

Virulence Factors of *Escherichia coli* Pathotypes

Abstract: *Escherichia coli* is a Gram negative, facultative anaerobic, motile, non-spore-forming multimodal bacterium located in the family Enterobacteriaceae. Pathogenic *E. coli* strains are classified according to their type and virulence characteristics. *E. coli* strains are divided into those that cause extraintestinal infections and intestinal infections. Diarrhegenic *E. coli* pathogens; enterotoxigenic *E. coli*, enteropathogenic *E. coli*, Vero- or Shiga-toxin producing *E. coli*, enterohemorrhagic *E. coli*, enteroagregatory *E. coli*, enteroinvasive *E. coli* and diffuse adherent *E. coli*. Extraintestinal pathogenic *E. coli*; septicemic pathogenic *E. coli*, uropathogenic *E. coli*, avian pathogenic *E. coli*, breast pathogenic *E. coli*, and those causing uterine infections are endometrial pathogenic *E. coli*. In this article, the virulence factors of the above-mentioned pathogens and the roles of these virulence factors in the pathogenesis are mentioned.

Keywords: *Escherichia coli*, pathotype, virulence factor

Giriş

Escherichia coli, Enterobacteriaceae ailesine ait ve *Escherichia* cinsi içerisinde yer alan bir bakteridir. *Escherichia* cinsi içerisinde yedi tür vardır. Bunlar: *E. coli*, *E. adecarboxylata*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulnaris*, *E. blattae* ve *E. alberti* [2]. *Escherichia coli*, Gram negatif, fakültatif anaerobik, hareketli, spor oluşturmeyen bir çomaktır. Sıvı kültürlerde hızlı üreyerek, tek başına ya da çiftler halinde görülür [8].

E. coli'nin alt türlerinin sınıflandırılması, bakterilerin yüzeyindeki antijenik yapıların çeşitliliğine dayanır. Serotiplendirme için ilk şemayı Kaufmann geliştirmiştir ve bu serotiplendirme *E. coli*'nin somatik (O), flagellar (H) ve kapsül (K) antijenlerine göre yapılır [13]. O antijeni dış hücre zarını oluşturan lipopolisakkarit yapıda, ısıya dirençli yüzey antijenidir. O antijeni, beş ya da daha fazla sayıda

farklı polisakkarit grubu tarafından oluşturulmaktadır. Bu yüzden bugüne kadar 180'den fazla farklı O grubu izole edilmiştir. 1945 yılında Kauffmann ve Vahlne kapsül antijenini göstermek için bir sembol olarak K antijeni kavramını ortaya atmıştır. K antijeni depolisakkarit (N-asetil neuramik asit) yapıdadır. Toplamda 60 farklı K antijeni olduğu kabul edilmektedir [12]. H antijenleri flagellanın bir parçasıdır ve bu yüzden hareketli *E. coli* suşlarında bulunur. Çevreden ilk izole edilen *E. coli*'nin suşlarının çoğu hareketsiz veya kısmen hareketlidir. Bu yüzden H antijenine bağlı serotiplendirme güvenilir değildir. Bugüne kadar 56 H antijeni tespit edilmiştir [2]. Bir diğer antijen olan fimbrial (F) antijenler, proteinöz moleküler yapılar bilinmeden önce K antijenleri olarak tanımlanmıştır, fakat kendi yapılarının ortaya çıkmasıyla K antijen profilinden ayrılmıştır. F antijeni ise tek tek suşları tanımlanmak için kullanılmaktadır [20].

***Escherichia coli* patotipleri**

Patojenik *E. coli*'ler oluşturduğu hastalığın türüne ve sahip olduğu virülens özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Ancak patojenik suşlarla, patojenik olmayan suşları ayırmak için kullanılan tek özellik virülens genleri değildir. Bu genlerin fenotipik olarak ifadesinin seviyesi daha önemlidir. *E. coli* suşları bağırsak dışı enfeksiyonlara (ekstraintestinal) ve bağırsak enfeksiyonlarına (intestinal) neden olanlar olarak ikiye ayrılmaktadır [6].

İntestinal *Escherichia coli* patotiplerinin temel özellikleri

Bağırsak enfeksiyonlarına neden olan *E. coli* suşlarının ortak adı, ishal yapan (diyarejenik) *E. coli* (DEC)'dir. İntestinal patotipler: enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Vero- veya Shiga-toksin üreten *E. coli* (VTEC veya STEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) ve diffuz aderent *E. coli* (DAEC)'dir [6].

Enterotoksijenik *Escherichia coli* (ETEC)

ETEC, evcil hayvanlarda ishalin en yaygın nedenidir. ETEC enfeksiyonlarının patogenezinde birincil rol oynayan iki adet virülens faktörü vardır. Bunlar, bağırsak epiteline yapışmayı sağlayan fimbriyal, afimbriyal adezinler ve enterotoksinlerdir [16].

ETEC'in fimbriyal ve afimbriyal adezinleri: Bu virülens faktörleri, başka bir hücreye ya da yüzeye yapışmada veya yapışmanın kolaylaştırılmasında rol oynar. Bazı hayvan türleri için önemli fimbriyal ve afimbriyal adezinler: K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6), F17, F18, F41 ve AIDA – I (Adezin Involved in Diffuse Adherence-I; afimbriyal adezin) [17].

ETEC'nin enterotoksinleri: ETEC suşları termolabil (LT) ve termostabil (ST) olmak üzere iki farklı toksin grubundan en az birini salgılamaktadır [17].

a) Termolabil enterotoksin: Yüksek molekülülü bir toksin olup 15 dk, 60°C'de inaktive olmaktadır. Termolabil enterotoksin LT-I ve LT-II olmak üzere 2 ana gruba ayrılır. Bunlar arasında immunolojik çapraz reaksiyon yoktur. İnsanlar ve hayvanlar için patojen olan *E. coli* LT-I salgılayan, LT-II özellikle hayvandan elde edilen *E. coli*'ler tarafından salgılanır ve çok nadir olarak insan izolatlarından izole edilenler tarafından salgılanır [17].

b) Termostabil enterotoksin: Düşük molekül ağırlıklı bir toksindir ve 100°C'de 15 dk içinde inaktive olmaktadır. Yapı ve etki mekanizmasına göre iki sınıfa ayrılmaktadır. Birincisi, ST-I. Bu toksin sadece ETEC suşlarınınca salgılanmaz, ayrıca *Yersinia enterocolitica* ve non-O1 *Vibrio cholerae* gibi diğer Gram negatif bakterilerce de salgılanır. Bu grupta, iki alt grup vardır, ST-Ia (STp) domuzlardan, ST-Ib (STh) insanlardan izole edilmiştir. İkincisi, ST-II, esas olarak domuzlardan izole edilen ETEC suşları ile bağlantılı, iken bazı insanlardan izole edilen ETEC'lerce salgılanan ST-II toksini de tanımlanmıştır [17].

Enteropatojenik *Escherichia coli* (EPEC)

Escherichia coli'nin ilk tanımlanan patotipi EPEC'dir. *E. coli*'nin enteropatojenik suşları, tüm hayvanlarda ve insanlarda ishale neden olabilmektedir. EPEC'in temel özelliği bağırsak mukoza-sındaki belirli hücrelere yapışmasıdır. Membran mikrovilluslarında lezyonlara ve epitel hücrelerine yapışarak çeşitli bozukluklara neden olur. Adezyon süreci ve lezyonların oluşmasında anahtar faktör ve ana virülens faktör, plazmid tarafından kodlanan, EPEC adezyon faktörü (EAF)'dür. Diğer bir adezyon faktörü olan "intimin" ise adezyonun son aşamasında rol oynar [25].

Önceleri EPEC suşları O ve H serotipleri temelinde tanımlanırken bugün, LEE (locus of enterocyte offacement) olarak bilinen 35 kb'lık bir patojenite adasının varlığı ve Shiga toksin kodlayan genlerin yokluğuna göre tanımlanır ve sınıflandırmaları da buna göre yapılmaktadır [25]. Bunun yanı sıra yaklaşık 80 kb'lık bir aderens faktör plazmidini (EAF) üzerinde kodlanan ve bakteriler arası etkileşim ile mikrokoloni formasyonundan sorumlu olan BFP (bundle-forming pili) ve LEE bölgesi içeren izolatlar, tipik EPEC (tEPEC) olarak tanımlanırken, LEE-pozitif, BFP-negatif izolatlar atipik EPEC (aEPEC) olarak sınıflandırılır. Hem tEPEC hem de aEPEC ishal ile ilişkilendirilir [3].

Vero veya Shiga toksin üreten *Escherichia coli* (VTEC/STEC/EHEC)

Shiga toksin üreten *E. coli* ilk kez 1977 yılında keşfedilmiştir. İnsan ve hayvanlarda hastalık oluşturan *E. coli* patotiplerinden birisidir. STEC'in rolü sadece domuzların endemik hastalığında belirlenmişken

kuzu, buzağı ve köpeklerde hastalık oluşumundaki rolleri açık değildir. *E. coli*'nin STEC olarak adlandırılmasının nedeni, salgıladığı sitotoksinin, *Shigella dysenteriae* tarafından üretilen Shiga toksin ile genetik ve protein yapısı olarak büyük ölçüde benzer olmasıdır. STEC için başka adlandırmalar kullanılmaktadır. Bunlar, VTEC (Verotoksin üreten *E. coli*) ya da EHEC (Enterohemorajik *E. Coli*)'dir [1].

STEC'in virülens faktörleri

a) Shiga / Vero toksin (Stx): Ana virülens faktördür ve STEC suşlarını tanımlar. Bu güçlü sitotoksin, STEC enfeksiyonlarında birçok semptomun ve ölümün nedeni olan faktördür. Stx içinde iki adet immunoreaktif alt grup vardır. Bunlar Stx1 ve Stx2'dir. Bir STEC suşu, sadece Stx1 ya da sadece Stx2 veya her iki toksini birden üretebilir. STEC'in Stx1 toksini, *S. dysenteriae* 1 Shiga toksini ile aynıdır [18].

b) Yapışma (adezin): STEC patojenik suşları bağırsak hareketliliğine karşı, bağırsak mukozasına sıkıca tutunarak kendini korumalıdır. Yapışmada tek potansiyel faktörün intimin olduğu ve bağırsak kolonizasyonunda rol oynadığı kanıtlanmıştır. İntimin, bakteri hücrelerinin dış yapı proteindir, 94-97 kDa büyüklüğündedir ve eaf geni ile kodlanır. Bağırsak mukozasında yapışmaya bağlı ve mukozal dejenerasyonuna ilişkin tipik lezyonlara neden olmaktadır [11].

c) Plazmid ile kodlanan faktörler: STEC suşları 70-100 kDa boyutunda plazmidler içerebilirler. STEC içinde birkaç plazmid ile kodlanan faktörler vardır. Fakat plazmidlerin hastalık patogenezindeki rolü hala tam olarak anlaşılabilmiş değildir [17]. Bu faktörler arasında Enterohemolizin (Ehx) plazmidle kodlanmış önemli faktörlerden biridir. 18-24 saatlik 37°C'deki inkubasyondan sonra kanlı agar da küçük hemolizli alanlar oluşturur. Bu karakteristiktir. Bir diğer plazmid ile kodlanan faktör ise katalaz-peroksidaz (KatP) enzimi olup bu enzimin iki fonksiyonu vardır. Virülensteki rolü ise belirsizdir. Ancak konak savunma mekanizmasından korunmak için bakteriyeye yardımcı olduğu ve ısı stresi oluşturarak vücudun iyileşmesine katkıda bulunduğu iddia edilmektedir. Serotipe göre değişmektedir. Ekstraselüler serin-proteaz (EspP) faktörü ise KatP'da olduğu gibi, STEC içinde EspP dağılımı uniform değildir ve serotipe bağlıdır. Hastalığıdaki rolü bilinmemek-

tedir. EspP, kanın pıhtılaşmasını engelleyebilmekte ve hastalıklarda kanamanın uzamasına rol açabilmektedir [5].

Enteroagregatif *Escherichia coli* (EAEC)

EAEC ilk kez 1987 yılında tanımlanmıştır ve genellikle ishal ile bağlantılıdır. A.B.D., Santiago'da, Nataro ve ark. [17] *E. coli*'nin Hep-2 (human epitelial tip 2) hücrelerine yapışma özelliğini incelemişlerdir. Yapılan araştırmalar sırasında, araştırmacılar yapışmayı iki kategoriye ayırmışlardır. Birincisi agregatif, ikincisi diffuz (gerçek) yapışmadır. Deneysel olarak yapılan çalışmalarda, agregatif yapışmada Hep-2 hücre kültürü kullanılmadığında, bakteri hücrelerinin birbirlerine karşılıklı yapışması sonucu yığılmış tuğlalar şeklinde dizildiği görülmüş, Hep-2 hücre kültürünün kullanıldığı çalışmada ise bakteri hücreleri, Hep-2 hücrelerine yapışarak küçük toplanmalar göstermiş ve Hep-2 hücrelerinin yokluğunda dağılmışlardır. Burada da diffuz yapışma gözlemlenmiştir. Agregatif özelliği bulunan *E. coli*'leri tanımlamak için, araştırmacılar enteroadherence-aggregative *E. coli* (EaggEC) adını önermişlerdir ve kısaltılmış olarak enteroagregatif *E. coli* (EAEC) olarak isimlendirmişlerdir [17].

Enteroinvazif *Escherichia coli* (EIEC)

EIEC suşları bağırsağın ince ve kalın bağırsağın mukoz membranına tutunmak için, mukoz membranın iç kesimlerinde kan yolu üzerinden enterositlere penetre olur. Lenfatik ve kan sisteminde çoğalmaları ile oluşan endotoksinler koliseptisemiye neden olur. Patojeniteleri, fagositoz ve aktive edilmiş komplement sisteminden kapsülleri aracılığıyla kurtulmalarına dayanır. EIEC suşları biyokimyasal, genetik ve patojenik olarak *Shigella* spp. ile yakın ilişkilidir ve EIEC suşları lizin dekarboksilaz negatif, hareketsiz, laktoz negatif suşlardır [4].

Diffuz Agregatif *Escherichia coli* (DAEC)

Diffuz agregatif *E. coli* orijinal olarak; Hep-2 adeziv kullanarak mikrokolonileri oluşturmayan *E. coli*'lerden köken almaktadır. EAEC keşfiyle birlikte birçok araştırmacı DAEC'i potansiyel bağımsız bir kategori olarak tanımlamaktadır. Yamamoto ve ark. [26] DAEC suşlarının Hep-2 hücreleri yüzeyinden uzanan parmak şeklindeki uzantılara girebildiğini kanıtlamıştır [7].

Ekstraintestinal patojenik *E. coli* patotiplerinin temel özellikleri

Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC)'ler, komensal olarak sağlıklı hayvanların bağırsak florasında bulunan fakültatif patojen bakterilerdir. ExPEC grubunda, septisemik patojenik *E. Coli* (SEPEC), üropatojenik *E. coli* (UPEC) ve avian patojenik *E. coli* (APEC) vardır. Son yıllarda, bu gruba iki yeni hayvan patojen grubu daha eklemiştir: meme bezinin enfeksiyonuna neden olan meme patojenik *E. coli* (MPEC) ve rahim enfeksiyonlarına neden olan endometriyal patojenik *E. coli* (EnPEC) [6].

Septisemik *Escherichia coli* (SEPEC)

Septisemik suşlar konaklarında septisemiden sorumludur. Hastalık sürecinin her adımında alternatif virülens faktörlerinin olduğu ve özellikle invaziv suşların patojeniteleri için bu virülens faktörlerinin kombinasyonlarını kullanabildikleri belirlenmiştir. İnvazyon sürecindeki ilk adım bağırsak yüzeyine tutunmadır. Tutunma fimbrial adhezinler aracılığıyla olabilir. ETEC suşlarında F5 gibi, diğer taraftan uzun polar fimbria ya da non-fimbrial bağlanma buna örnektir. Septisemik suşlar, Colicin V'yi kodlayan bir Col V plasmidi taşır. Bu plasmid, tip IV pilusu kodlar ki bu pilusun *Salmonella typhi*'de invazyon ve tutunma için önemli olduğu görülmüştür. Ek olarak, bu plazmid serum direncini ve aerobaktin demir alım sistemini düzenler, her ikisi de *E. coli* suşlarının hayatta kalması için önemli rol oynar [14].

Üropatojenik *Escherichia coli* (UPEC)

Escherichia coli daha çok köpek, kedi ve insanlarda idrar yolu enfeksiyonlarına (UTI) neden olan bir patojendir. Enfeksiyon köpeklerde kedilere nazaran daha yaygındır ve genellikle sistit olarak görünse de aynı zamanda üretrit, piyelonefrit ve prostatit olarak da görülebilir [25]. Patojenik *E. coli* suşlarının virülens genlerinin çoğunluğu, patojenite adaları adı verilen büyük multigenik kromozomal segmentler taşımaktadır. UPEC suşları iki büyük patojenite adası içerir; PAI-I (70 kb) ve PAI-II (190 kb) [10].

UPEC'nin virülens faktörleri

a) Adezinler (fimbrialar): UPEC suşları da çeşitli genler tarafından kodlanan fimbrialara sahiptir. Sık rastlanan mannoz duyarlı Tip I ve mannoz dirençli P, SF1C ve Dr fimbriyalardır. Bunlar UPEC enfeksiyonu ile ilişkilidir.

UPEC'in fimbriaları, reseptor spesifitesine ve adezyon özelliklerine göre sınıflandırılırlar [10].

Tip I fimbrialar, mannoz duyarlı fimbriyalardır. UPEC'lerin en sık rastlanan virülens faktörleridir. *E. coli* fimbriaları ve Tip I fimbrialar fim geni tarafından kodlanır. Tip I fimbrialar genellikle sistitis ve piyelonefritis olgularından izole edilmektedir [20].

P fimbrialar (pyelonefrit-ilişkili fimbria, PAP), mannoz dirençli fimbriyalardır. P fimbria, patojenik adacığında bulunan pap geni tarafından kodlanır. Bu adeziv üst üriner sistem enfeksiyonlarında önemli rol oynar ve ikinci en sık rastlanan virülens faktördür. Özellikle piyelonefritis olgularının patogeneğinde önemli role sahiptir. P fimbrialar Gal-Gal reseptörleri ile üriner sistem epitelyum hücrelerine bağlanırlar [10].

b) Hemolizin: Çoğu hemolitik *E. coli* suşları tarafından salgılanan sitolitik protein yapılu toksin, alfa hemolizin olarak bilinir. Ayrıca beta hemolizinde vardır. Hemolisin hly geni tarafından kodlanır. Hemolizinin üretimi ve taşınması için dört gen (hlyA, hlyB, hlyC, hlyD) gerekmektedir [24].

c) Aerobaktin: İki lizin ve bir sitrat molekülünden oluşmuş küçük bir moleküldür. Son zamanlarda sistit ve pyelonefrit nedeni olan *E. coli* suşları ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu, bir demir ayırma ve transport sistemi olup bu sistem *E. coli*'nin demirin az bulunduğu çevrelerde büyüyebilmesine olarak sağlar. Aerobaktin determinantları plazmid ve kromozomlarda bulunmaktadır [25].

d) Sitotoksik Nekrotizan Faktör 1 (CNF-1): Sitotoksik nekrotizan faktör 1 (CNF-1) 115 kDa'lık bir toksindir. UPEC'lerin en iyi tanımlanmış virülens faktörlerinden biridir. Genel olarak CNF-1 üretimi üriner sistem enfeksiyonunu tetiklemekte, ayrıca konak hücre fonksiyonlarında ve morfolojisinde bozukluklara, hücre siklusunun durdurulmasına ve hücre lizisine neden olmaktadır [24].

Avian patojenik *Escherichia coli* (APEC)

Avian patojenik *E. coli* (APEC) suşları ekstraintestinal kanatlı hastalığına sebep olup, yüksek mortalite ve morbitide ile tavuklarda ve hindilerde belirgin ekonomik kayıplara neden olurlar. Koliseptisemisi APEC suşlarının neden olduğu en önemli hastalıktır. Broylerlerde selülitis ile ilişkili lezyonlar kanatlı

sektöründe karkasın kabul edilmemesi sonucu ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bazı çalışmalar APEC ve insan ExPEC suşları arasında ilişki olduğunu ve esas olarak UPEC ve “newborn meningitis-causing *E. coli*” (NMEC)’nin sebep olduğu yeni doğan meningitis hastalığında APEC suşlarının potansiyel zoonotik etken olabileceğini ortaya koymaktadır [15].

APEC Virülens Faktörleri

a) Adezinler: Bu adezinler yapışmayı sağlar ve konağın epitel hücreleri ile yakın ilişki içerisindedir. Kanatlılarda üst solunum sistemi UPEC’ler arasında Tip-1 fimbria adezyonlarını içermektedir [26].

Tip-1 fimbria üst solunum yolunda kolonizasyonda görev alır. P fimbria diğer organlarda da derin bakteriyel kolonizasyonda mevcut olabilir. Ancak APEC suş patojenitesinde P fimbrianın rolü tam olarak çözülememiştir. *E. coli* hücrelerinin yüzeyinde bulunan kıvrık fimbria, ekstraselüler matrisin proteinlerine bağlanmasından sorumlu olup aynı zamanda dış çevre koşullarına da dayanıklılığı sağlamaktadır [19].

b) Sıcaklık Duyarlı Hemaglutinin: Sıcaklık duyarlı hemaglutinin (TSH) tavuk eritrositleri varlığında APEC suşları tarafından eksprese edilen bir proteindir ve hemaglutinasyon aktivitesi 26°C de olup 42°C’de baskılanmaktadır [9].

c) Demir Kazanım Sistemi: APEC suşları özellikle konak içinde düşük demirli ortamlarda yaşama ve büyümeye demir kazanım sistemi sayesinde devam edebilirler. Bakteriyel demir kazanç sistem mekanizması sideroforların üretimini sağlar ki bunlar da konakta demir şelatları görevi görürler. Bilinen 2 tip siderofor vardır: fenolat ve hidroksamat. Aerobaktin, plasmid tarafından kodlanan bir hidroksamat siderofordur. Bu siderofor ayrıca mantarlar, enteroinvaziv *E. coli* ve APEC suşları arasında bulunmaktadır. APEC suşları arasında demir kazanım sistemi plasmid genleri veya kromozomal patojenite adaları tarafından sağlanmaktadır [23].

d) Kolisinler: *Escherichia coli* tarafından eksprese edilen bu proteinler ilgili veya benzer türlerde bakteriyel büyümeyi inhibe ederler. Kolisinler 2 alt üniteden oluşurlar. Birincisi bakteriyel hücre lezyon oluşumunu sağlarken diğeri bakteriyi kendi kolisinlerine karşı korur. Kolisinler plasmidde lokalize

olan farklı genler tarafından kodlanabilir ve sıklıkla Col plasmidi olarak adlandırılırlar. APEC suşlarının çoğu Colisin V plasmidine sahiptir [26].

e) Serum Direnci: APEC suşlarında bakterinin direncini, yüzeyindeki LPS, kapsül, Col V kolisin ve diğer membran proteinleri sağlamaktadır [14]. Pfaff-McDonough ve ark. [21] serotip, kanatlı türü ve lezyon orjinine rağmen APEC patojenitesinin Iss faktör (Artmış serum süresi) ile ilgili olmasını ıss geninin non-patojenik suşlara kıyasla patojenik suşlarda bulunmasına bağlamaktadırlar [21].

f) Toksinler: Bazı APEC suşları LT ve ST enterotoksinleri gibi toksin sentezler, bazıları da Shiga-toksin (Stx) gibi verotoksin sentezler. APEC suşlarının Vero hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi Fantinatti ve ark. [9] tarafından gözlenmiştir. Stx genini selülitisi, septisemili ve şişkin baş sendromlu tavuk ve hindilerden izole edilen farklı *E. Coli* suşlarından tanımlanmıştır [8].

KAYNAKLAR

1. Anonim; Erişim Adres: <http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html#what-are-shiga-toxin> Erişim Tarih: 06.11.2015
2. Bergey’s manual of systematic bacteriology, (1984); Ørskov F. In N.R. Krieg. and Holt J.G. (eds): vol 1., Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A. 420-423
3. Bieber, D., Ramer S. W. et al., (1998); Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 280, 2114-2118.
4. Brenner D. J., Fanning G. R., Miklos G. V., Steigerwalt A. G., (1973); Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species, *Int.J.Syst.Bacteriol* 23: 1-7
5. Brunder W., Schmidt H., Karch H., (1997); EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V, *Molecular Microbiology*, 24, 767-778
6. Carlton L. G., John F. P., Glenn S., Charles O. T., (2010); Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, p.267 – 307
7. Dho M., Lafont J.P. (1984); Adhesive properties and iron uptake abilities in *E. coli* lethal and non-lethal for chicks. *Avian Dis.* 28:1016-1025
8. Ewers C., Janssen T., Kiessling S., Philipp H.C., Wieler L.H. (2004); Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet. Microbiol.* 104:91-101
9. Fantinatti F., Silveira W.D., Castro A.F. P. (1994); Characteristics associated with pathogenicity of avian septicemic *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.* 41:75-86
10. Jann K., Jann B.J. (1977); Capsules of *Escherichia coli*, p.113-143. In: Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli*:

- Mechanisms of virulence. Cambridge University Press, Cambridge, UK
11. Kariyawasam S., Johnson T.J., Nolan L.K. (2006); The pap operon of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1 is located on a novel pathogenicity island. *Infect. Immun.* 74:744-749
 12. Kauffmann F., G. Vahlne (1945); Ueber die Bedeutung des serologischen Formenwechsels fMr die Bakteriophagenwirkung in der Coli-Gruppe. *Acta Pathol. Microbiol.Scand.* 22:119-137
 13. Kostakioti M., Stathopoulos C. (2004); Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun.* 72:5548-5554
 14. Moulin-Schouleur M., Répérant M., Laurent S., Brée A., Mignon-Grasteau S., Germon P., Rasschaert D., Schouler C. (2007); Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J. Clin. Microbiol.* 45: 3366-3376
 15. Nagy B., Fekete P.Z., (2005); Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol;* 295(6-7):443-54
 16. Nataro J. P., Kaper J.B., (1998); Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Clinical Microbiology Reviews*, Vol 11, No.1, 142-201
 17. Nataro J. P., Kaper J. B., Robins B. R., Prado V., Levine M. M., (1987); Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells, *Pediatric Infection Diseases Journal* 6: 829-831
 18. Olivier C., Julia K. C., Erick D., David M. G., (2013); The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups, *Environmental Microbiology Reports*, 58-65
 19. Orskov F., Orskov I. (1992); *Escherichia coli* serotyping an disease in man and animals. *Can. J. Microbiol.*, 38, 699–704
 20. Parreira V.R., Gyles C.L. (2003); A novel pathogenicity island integrated adjacent to the thrW tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infect. Immun.* 64:3118-3126
 21. Provence D.L., Curtiss III R. (1994); Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* 62:1369-1380
 22. Sabri M., Leveillé S., Dozois C.M. (2006); A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. *Microbiol.* 152:745-758
 23. Sansonetti P. J., (1992); *Escherichia coli*, *Shigella*, antibiotic-associated diarrhea, and prevention and treatment of gastroenteritis, *Curr. Opin. Infect. Dis.* 5: 66-73
 24. Sussman M., (1997); *Escherichia coli* – Mechanisms of virulence, Cambridge University Press, U.K.
 25. Vanessa S., Carlyn J. H., (2015); Enteroherrhagic *E. coli* and Other Shiga Toxin – Producing *E. coli*, p.23.
 26. Yamamoto T., Kaneko M., Changchwalit S., Ijuin S., Echeverria P., (1994); Actin accumulation associated with clustered and localized adherence in *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea, *Infect. Immun.* 62: 2917-2929.

Melatonin, Etkileri ve Kullanım Alanları

Ayris Salt¹, Metin Çenesiz², Sena Çenesiz¹

¹ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Samsun

² Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Samsun

Geliş Tarihi / Received: 21.02.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 21.03.2017

Özet: Melatonin günlük ve mevsimsel değişiklik gösterebilen pineal bezden salgılanan ve suprakiazmatik nukleus tarafından endojen ritmi düzenleyen bir hormondur. Günümüzde tıp ve veteriner hekimlikte ekzojen kullanım alanlarının genişlemesi bu hormonun önemini arttırmıştır. Hücresel kompartmanlara kolayca geçebilen bu hormon güçlü bir antioksidan özellik göstermekle beraber, sirkadyen ritmi düzenleyerek vücutta homeostazisi sağlar. Bağışıklık sistemi üzerine de olumlu etkileri bulunmaktadır. Bazı hayvan türlerinde de üreme siklusunu başlatıcı ya da inhibe edici etki gösterir. Yapılan çalışmalarla melatoninin antikanserojenik etkinliği ortaya koyulmuştur. Bu derlemede melatoninin biyokimyasal özellikleri ile kullanım alanları anlatılmaktadır.

Anahtar kelimeler: Antikanserojenik etki, Antioksidan etki, Melatonin

Melatonin, its Effects and Uses

Abstract: Melatonin is a hormone which is secreted from the pineal gland and may show a daily-seasonal variations that regulates endogenous rhythm by effecting the suprachiasmatic nucleus. Nowadays, expansion of exogenous usage areas has increased the importance of this hormone in medicine practice. Although this hormone is a powerful antioxidant that can easily pass through cellular compartments. Melatonin regulates the circadian rhythm of the body and maintains homeostasis. There is a beneficial effects on the immune system and has activatory or inhibitory effects on reproductive cycle in some animal species. The studies show that melatonin has also anticarcinogenic activity. In this review we present the biochemical properties of melatonin.

Key words: Anticancer activity, Antioxidant activity, Melatonin

Giriş

Melatonin (5-metoksi-N-asetilriptamin), 232 moleküler ağırlıklı bir indolamindir. Karanlıkta epifizden salgılır. Uyku, reproduksiyon, sirkadyen ritim ve bağışıklık gibi biyolojik olayların regüle edilmesini sağlar [15,47]. Melatonin seviyesi, gün içinde ve farklı mevsimlerde değişiklikler gösterir. Örneğin gün içinde melatonin seviyesi en düşükken gece boyunca yüksek olup kış aylarında da yaz aylarına göre daha sürekli [33,45].

Biyosentezi ve salgılanmasının regülasyonu

Dolaşımda bulunan triptofan amino asidi pineal beze gelerek triptofan hidroksilaz ile hidroksillenir. Oluşan 5-OH triptofandan L-aromatik dekarboksilaz ile karboksil grubu ayrılır ve serotonin meydana gelir. Pinealositler içinde serotonin Serotonin-N-asetil transferaz (NAT) tarafından N-asetil serotonine, ardından da Hidroksiindol-O-metil transferaz

(HIOMT) enziminin yardımıyla N-asetil serotonin, melatonine dönüştürülür [6,23]. Melatoninin epifizde sentezi, suprakiazmatik nukleus (SCN)'un 24 saatlik karanlık/aydınlık döngüsüne göre ayarlanır. Sentez ve salgınım geceleri yani karanlıkta artar ve ışık ile inhibe olur [24]. Melatoninin epifiz bezi ve koroidal pleksusta depo edildiği düşünülmektedir. Tüm organlara geçebilmektedir ve %70'i albümine bağlıdır [15]. Postgangliyonik sempatik nöronlar aracılığıyla pinealositlere gelen sinirsel impulslar, sirkadyen melatonin ritminin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. SCN'nin elektriksel aktivitesi geceleri melatonin sentezinin artmasına neden olur [32].

Sentezinin sinirsel uyarımı

Memelilerde epifiz bezinin, elektriksel impulsları hormonal sekresyonlara dönüştüren nöroendokrin transformatör görevi vardır. Melatonin sentezi ve salgınının ışıktan etkilenmesi sebebi ile gece bo-

yunca yüksek konsantrasyondadır. Karanlıkta uyarıyor sempatik gangliyondan β -adrenerjik post-gangliyonik sempatik fibriller aracılığıyla gelen uyarı sentezini artırırken, aydınlıkta sentez engellenmektedir [15].

Reseptörleri

MT₁, MT₂ ve MT₃ olmak üzere 3 reseptör tipi vardır: MT₁ ve MT₂ G-protein aracılı etki gösterir. MT₁ yüksek affiniteli, MT₂ ise düşük affinitelidir. Ca-kalmodulin reseptörleri sitoplazmada, retinoid Z ve O reseptörleri çekirdektedir. 3 reseptör tipi de moleküler yapılarına ve kromozomal yerleşimlerine göre alt tiplere ayrılırlar. Bu reseptör çeşitliliği sayesinde farklı dokularda farklı işlevler gösterebilen bir nörohormondur [21,38,45].

Melatonin'in patofizyolojisi

Tamamen karanlıkta, melatonin ritmi belirgin bir şekilde artar [5]. Yine de tamamen kör hastalarda sirkadyen ritimle birlikte ışıkla indüklenen melatonin supresyonu devam eder [9]. Üveitisle ilgili olan retinal değişikliklerde melatonin pikinin düştüğü gözlemlenmiştir [41]. Anormal melatonin seviyeleri başka oküler hastalıklarla ve ışık algısıyla ilişkili olabilir. Pineal bölgede ki tümöral oluşumlar histolojik tipine göre melatonin salgısını etkiler [6]. Pineal beze infiltrate germinoma hücreleri melatonin sekresyonunu azaltırken, parenkimal tümörler düzensiz bir melatonin artışına neden olur. Bu nedenle pineal bez tümörlerinde melatonin seviyesi diyagnostik bir parametre değildir [6].

Çocuklarda görülen, özellikle genetik olan nörolojik hastalıklarda, davranış ve uyku bozukluklarına, anormal melatonin seviyeleri eşlik eder [6]. İskemik felçli hastalarda nokturnal melatonin ritmiyle birlikte hücre aracılı bağışıklıkta bozulma gözlenmiştir [11]. Beyin kökü, 3. ventrikül veya lateral ventrikülde görülen hemorajik lezyonlarda gece yükselmesi yapmadan çok düşük melatonin seviyeleri gözlenmiştir [6]. Düşük melatonin seviyeleri bazı epilepsi formlarında da gözlenmektedir ve insan çalışmaları melatoninin bu hastalarda antikonvülzan etkinlik ve nöbetlerin sıklığında ve EEG izlemelerinde iyileştirme gösterdiğini ortaya koymuştur [6,19]. Depresyondaki hastaların melatonin seviyelerinin düştüğü; bunun yanı sıra bipolar

hastalarının manik ve depresif durumdayken yükselen melatonin seviyesinin duruma göre değişken olduğu gösterilmiştir [6,26]. Antidepresanların, melatonin miktarını arttırdığı bildirilmiştir [47].

Uyku ve sirkadyen ritim üzerine etkileri

Melatonin, endojen bir düzenleyici olarak homeostazisi sağlar. SCN'den gelen uyarılarla günlük, aylık, yıllık salgılanma farklılıklarıyla tüm hücrelere bilgi verir. Bu hormon, hücrelerdeki saat genlerini (clock genes) epigenetik olarak kontrol eder [7,40]. Ayrıca melatonin, nokturnal sıcaklık düşüşünü artırır ve uykuya dalmayı kolaylaştırır [7].

Kardiyovasküler sistem üzerine etkileri

Serebral arterlerde vazokonstriksiyon, periferde ise vazodilatasyon etkileri ile birlikte harici alımında kan basıncının düştüğü ve kalp hızının azaldığı rapor edilmiştir [10,18,27,36]. Kan basıncındaki bu düşüş postsinaptik α -1 adrenerjik reseptör blokajına ve sempatik sistem inhibisyonuna bağlı olabileceği düşünülmüştür [14]. Koroner arter hastalarında gece melatonin salınımının değişmediği fakat melatonin seviyesinin düştüğü bildirilmiştir [2].

Bağışıklık sistemi ve kanser üzerine etkileri

Pinealektomi yapılan ratlarda timusun yapısının modifiye olduğunu ve farelerde melatonin tedavisinin timüs involüsyonunu engellediği ortaya konulmuştur [13,30]. Ayrıca melatoninin immun sistem hücrelerinin günlük ve mevsimlik düzenlenmesini de sağlar [37]. *İn vivo*, yüksek doz melatonin, genel bir immun sistem stimülasyonu sağlar. T hücre aktivasyonunu, lenfosit büyümesini, humoral cevabı artırır ve yaşla oluşan timüs involüsyonunu inhibe eder [37]. *İn vitro* çalışmalarda, melatoninin yardımcı T hücresi ve NK hücreleri aktivitesini, IL-2 ve IFN γ üretimini, insan monositinde IL-1 mRNA ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir [37]. Ayrıca viral enfeksiyonların tedavileri sırasında yaşanan çaresizlikler göz önünde bulundurulduğunda melatoninin birçok viral enfeksiyonun tedavisinde destekleyici olarak görev alabileceği bildirilmiştir [22].

Göğüs ve prostat kanser hücrelerinde MT1 melatonin reseptörlerinin sürekli bir şekilde aktif olduğu ve bunun sonucunda da kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ortaya konulmuştur [17].

Melatonin, kanser hücrelerinin büyüme için ihtiyaç duyduğu maddelerden olan linoleik asitin kanser hücrelerine girmesini sağlayan reseptörleri azaltarak, Ca-kalmodulin kompleksi üzerinden kanser hücrelerini uyutur ve tümörün büyümesini yavaşlatarak saf antikanserijenik etki gösterir [40].

Melatoninin endokrin ve reproduktif sistem üzerine etkileri

Melatoninin antigonadotropik etkileri vardır. Erişkin dişilerde kronik melatonin uygulaması sonucunda ovaryum boyutlarının küçüldüğü ve östrus sıklığında azalma gözlemlendiği bildirilmiştir [46]. Yüksek doz melatonin gonadotropin seviyelerini düşürürken prolaktin ve growth hormon seviyelerini arttırmaktadır [15]. Melatonin, mevsimsel üreme gösteren hayvanlarda reproduktif aktiviteyi kontrol eder [20]. Kısa günlerde reproduktif aktivite gösterenlerde koyun, keçi, geyik gibi hayvanlarda gonadları stimüle edici, uzun günlerde reproduktif aktivite gösterenlerde at, hamster, deve gibi hayvanlarda ise inhibe edici etki yapmaktadır [42].

Kısrakların östrus siklusunda melatoninin görevi

Kısraklar, mevsimsel poliöstriktir. Östrus siklusu kış ortasından sonra başlar ve sonbahara kadar devam eder. Günışığı süresinin uzaması siklusun başlamasının başlıca nedenidir. Kısraklarda gebeliğin 11 ay sürmesiyle taylorın doğumunun ve hayatlarının ilk birkaç ayının, havanın sıcak ve yiyeceğin bol olduğu zamana denk gelmesi sağlanmış olur [8]. Gün ışığı farklılıkları melatonin ve progesteron sentezi üzerinden hipotalamus, hipofiz ve ovaryumları kontrol eder [1]. Kışın karanlık saatlerin artmasıyla melatonin sentezi artar. Melatonin, Hipotalamus-hipofiz-gonadal aksisi'ni (HHGA) bloke eder. GnRH salınımı çok düşük amplitüd ve frekansta pulsatil hale gelir. Bu durum FSH, LH ve gonadotropinlerinin salgılanmasını uyarmaya yetmez [35]. Yazın ve ilkbaharda aydınlık süresinin uzamasıyla melatonin salgısı azalır, hipotalamustan GnRH salgısı artar. GnRH, hipotalamik-pitüiter portal vasküler sisteme girerek adenohipofize taşınır. Adenohipofizden, FSH ve LH salgısı artar. FSH ve LH Hipotalamus-hipofiz aksisi (HHA) feedback mekanizmaları ile kontrol eder. Her iki gonadotropinde kan ile ovar-

yuma taşınarak fonksiyon gösterir. FSH, granüloza hücrelerinde, preovulatrör follikülün büyüme-olgunlaşmasını ve östrojen biyosentezini uyarır. LH, teka hücrelerinde oosit olgunlaşması, ovulasyon, korpus luteum oluşması ve gelişimini sağlar. Progesteron sentezini uyarır [35].

Melatoninin kısraklarda reproduktif aktivite regülasyonunda kullanımı

Melatonin tedavisinin, hipotalamustaki GnRH içeriğini azalttığı gösterilmiş olmasına rağmen, GnRH veya gonadotropinlerin salgılanmasında akut etkilere sahip olmadığı bildirilmiştir [29,44]. Melatonin tedavisi uygulanan kısraklarda üreme mevsiminin geciktiği gözlenmiştir [28].

Koyunların östrus siklusunda melatoninin görevi

Koyunlarda gün uzunluğu azaldığında reproduktif nöroendokrin fonksiyonlar uyarılır, uzadığında baskılanır. Sonbaharda gün uzunluğunun kısılmasıyla birlikte artan melatonin hipotalamus üzerinden GnRH salgısını uyarır [42]. Artan GnRH gonadotropinleri uyararak seksüel siklusu başlatır [5].

Melatoninin koyunlarda reproduktif aktivite regülasyonunda kullanımı

Östrus senkronizasyonunda, pratikte melatonin hormonu; tek başına veya progestagenler, östrojenler, prostaglandin F2 α (PGF2 α) ve analogları, gebe kısrak serumu gonadotropini (PMSG), gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), human koryonik gonadotropin hormon (HCG) gibi hormonlarla kombine şekilde kullanılmaktadır. Anöstrusta melatonin uygulaması ile reproduktif aktivite uyarılabilir, hipotalamustan GnRH salınımı üstünden LH uyarılması sağlanır [25]. Alan ve ark.'nın yaptığı çalışmada melatonin implant uygulamasının, östrüs ve ovulasyonların normal üreme sezonuna göre 2-2.5 ay erkene alınabileceğini ve yüksek oranda gebelik elde edilebileceğini göstermiştir [42].

Kedilerin östrus siklusunda melatoninin görevi

Evcil kediler, reproduktif aktiviteleri aydınlık süresinden etkilenir. Gün uzunluğunun 8 saatten kısa olması dişilerde folikülogenezisi inhibe eder. Gün uzunluğunun 8-14 saat olduğunda 12-26 günde bir siklus tekrar eder [16].

Antioksidan etkileri

Melatonin, direkt ve indirekt mekanizmalarla antioksidan özelliği gösterir. Direkt olarak yüksek oksidan etkili $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{H}_2\text{O}_2$, $\cdot\text{O}_2$, $\cdot\text{HOCl}$, $\cdot\text{NO}$, ONOO gibi radikalleri doğrudan temizleyerek biyomolekülleri koruyabildiği bildirilmiştir [4,30]. Melatonin içindeki pirol halkası ona antioksidan özellik kazandırır; $\cdot\text{O}_2$ varlığında pirol halkası 2, 3-dioksijenaz (IDO) ile enzimatik olarak ya da hemin ile nonenzimatik olarak yıkımıyla yüksek reaktif N^1 -asetil- N^2 -formil-5-metoksikinüramin (AFMK) oluşur [13]. H_2O_2 varlığında da AFMK oluştuğu ve bu melatonin metabolitinin de radikal tutucu olarak davrandığı bildirilmiştir [31]. AFMK oluşumunun bir diğer nedeni ise melatoninin $\text{OH}\cdot$ radikaline yüksek affinite ile bağlanıp indolil katyon radikalini oluşturması ardından bu radikalinde $\text{O}_2\cdot$ 'i yakalayarak N^1 -asetil- N^2 -formil-5-metoksikinüramin (AFMK)'ye dönüşmesidir. Daha sonra Arilamin formamidazın (AFA) katalizörlüğünde N^1 -asetil-5-metoksikinüramine (AMK) çevrilmektedir. Ayrıca $\cdot\text{HO}$ varlığında indolil radikalinin oluşturduğu 3-hidroksi melatoninin idrarda ki düzeyleri, radikal üretiminin göstergesidir [47].

İndirekt olarak SOD, GPx, GR, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve γ -glutamilsistein sentetaz gibi antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını veya aktivitelerini artırarak antioksidan etki gösterir. Melatonin, Nitrik oksit sentetaz (NOS) enziminin pro-enziminin sentezini inhibe eder, lipid peroksidasyonunu baskılayarak MDA miktarını azaltır [6,34,47,12]. Ayrıca bu nörohormonun, DNA, lipidler ve proteinler üzerinde koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir [35]. Melatoninin, zincir reaksiyonlarını kırarak etki gösteren askorbik asit, α -tokoferol ve GSH gibi antioksidanlardan farklı lipid peroksidasyonunun yayılmasını peroksil radikalini yakalayarak durdurmasıdır [47]. Melatoninin diğer antioksidanlardan ayıran bir diğer özelliği ise diğer antioksidanlar serbest radikalleri yakaladıktan sonra onlardan daha az toksik olan prooksidanlara dönüşürlerken, melatoninin antioksidan etkisini gösterdikten sonra yine antioksidan etkili ara ürünlere dönüşmesidir. Bu yüzden terminal antioksidan olarak değerlendirilirler [40].

Melatoninin Jetlag'da kullanımı

Yapılan araştırmalar, transmeridyen yolculukların uyku, günlük ritm ve günlük aktivite üzerine etkisi

olduğunu ortaya koymuştur [39]. Uçuş disritmisi bilinen adıyla jetlag, gündüz yorgunluğu, uyanamama hali, gece uykusuzluğu, iştahsızlık, sindirim problemleri, depresif ruh hali, zayıf psikomotor koordinasyon, zayıf idrak gibi semptomlarla kendini gösterir [39,43]. Jetlag semptomlarının giderilmesinde özellikle batıdan doğuya olan uçuşlarda; en etkili tedavi melatonin uygulaması olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [39].

Melatoninin uykusuzluk problemlerinde kullanımı

Uyku saatinden önce günde bir kere uygulanan (0,5-5mg) melatoninin, uyku kalitesini ve gündüz uyanıklığını arttırdığı gözlenmiştir [39]. Yapılan çalışmalarda, yaşlılarda görülen uyku bozukluklarında melatonin uygulamalarının uykuyu iyileştirdiği bildirilmiştir [48]. Melatoninin kronobiyotik özellikleri fizyolojik uykuyu regüle eder ve uykularını kaydırarak uyku siklusunu yeniden düzenler [3].

Bütün bu etkilere bakıldığında melatonin hormonunun canlılarda çok önemli fonksiyonları olduğu ve ekzojen kullanımının da çeşitli hastalıklarda, üreme siklusu düzenlemede sağaltım protokolüne girdiği ileri sürülebilir.

Kaynaklar

1. Alkan S, Horoz H, Kaşıkçı G, Sönmez C, Ak K, (2003). Kısırlıklarda Üreme Mevsiminin Farklı Dönemlerinde Vaginal Progesteron Uygulamalarının Fertilitateye Etkisi. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fak Derg. 29(1), 111-17.
2. Altun A, Yaprak M, Vardar A, Aktöz M, Özbay G, (2001). Decreased nocturnal melatonin secretion in coronary artery disease (abstr). J Coronary Artery Dis. 4: 108.
3. Bendz LM, Scates AC, (2010). Melatonin Treatment for Insomnia in Pediatric patients with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. Ann Pharmacother. 44(1), 185-91.
4. Beyer CE, Steketee JD, Saphier D, (1998). Antioxidant properties of melatonin--an emerging mystery. Biochem Pharmacol. 56(10), 1265-1272.
5. Canoğlu E, Sarıbay K, (2012). Koyun ve keçilerde doğum ve jinekoloji. Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A, Köker A. eds. Çiftlik hayvanlarında doğum ve jinekoloji. Malatya, Medipres Maatbacılık, Malatya. p.521-649.
6. Claustrat B, Brun J, Chazot G, (2005). The basic physiology and pathophysiology of melatonin. Sleep Med Rev. 9: 11-24.
7. Claustrat B, Geoffriau M, Brun J, Chazot G, (1995). Melatonin in humans: a biochemical marker of the circa-

- dian clock and an endogenous synchronizer. *Neurophysiol Clin.* 25(6):351-359.
8. Crowell-Davis SL, (2007). Sexual behavior of mares. *Horm Behav.* 52, 12–17.
 9. Czeisler CA, Shanahan TL, Klerman EB, Martens H, Brotman DJ, Emens JS, Klein T, Rizzo JF 3rd (1995). Suppression of melatonin secretion in some blind patients by exposure to bright light. *N Engl J Med.* 332(1), 6–11.
 10. Dubocovich ML, Markowska M, (2005). Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine.* 27, 101-110.
 11. Fiorina P, Lattuada G, Silvestrini C, Ponari O, Dall'Aglio P, (1999) Disruption of nocturnal melatonin rhythm and immunological involvement in ischaemic stroke patients. *Scand J Immunol.* 50(2), 228–231.
 12. Ghosh D, Paul S, Naaz S, Bhowmik D, Dutta M, Ghosh AK, Firdaus SD, Chattopadhyay A, Reiter RJ, Bandyopadhyay D, (2016). Melatonin protects against lead acetate induced oxidative stress-mediated changes in morphology and metabolic status in rat red blood cells: a flow cytometric and biochemical analysis. *J Pharm Res.* 10(6) ,381-402.
 13. Hardeband R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan D-X, (1993). The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev.* 17, 347-357.
 14. K-Laflamme A, Wu L, de Champlain J, (1998). Impaired basal sympathetic tone and alpha 1-adrenergic responsiveness in association with the hypotensive effect of melatonin in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 11, 219-29.
 15. Koçak A, Çolak A, (1996). Melatonin ve Santral Sinir Sistemi. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi.* 3(3), 237-244.
 16. Kutzler MA, (2015). Alternative methods for feline fertility control: Use of melatonin to suppress reproduction. *J Feline Med Surg.* 17, 753–757
 17. Liu J, Clough SJ, Hutchinson AJ, Adamah-Biassi EB, Gorevski MP, and Dubocovich ML, (2016). MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56, 361-383.
 18. Lusardi P, Preti P, Savino S, Piazza E, Zoppi E, Fogari R, (1997). Effect of bedtime melatonin ingestion on blood pressure of normotensive subjects. *Blood Press Monit.* 2, 99- 103.
 19. Molina-Carballo A, Muñoz-Hoyos A, Reiter RJ, Sánchez-Forte M, Moreno-Madrid F, Rufo-Campos M, Molina-Font JA, Acuña-Castroviejo D, (1997). Utility of high doses of melatonin as adjunctive anticonvulsant therapy in a child with severe myoclonic epilepsy: two years'experience. *J Pineal Res.* 23(2), 97–105.
 20. Nagy P, Guillaume D, Daels P, (2000). Seasonality in mares. *Anim Reprod Sci.* 60-61, 245-262.
 21. Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrance P, Canet E, Boutin JA, (2000). Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem.* 275 (40), 31311–31317.
 22. Okur Gümüşova S, Memiş YS, (2014). Bazı Viral Enfeksiyonlarda Melatoninin Etkileri. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* 9(1), 50-54.
 23. Özgüner F, Özcankaya R, Delibaş N, Koyu A, Çalışkan S, (1995). Melatonin ve klinik önemi. *SDÜ tıp fakültesi Dergisi.* 2(4), 1-6.
 24. Öztürk L, Darıyerli N, (2000). Melatonin ve Uyku Fizyolojisi. *Türkiye Tıp Derg.* 7(2), 104-109.
 25. Özyurtlu N, Bademkiran S, (2010). Koyunlarda Östrus Senkronizasyonu ve Östrusu Uyarma Yöntemleri. *Dicle Üniv Vet Fak Derg.* 1(1), 17-22.
 26. Pacchierotti C, Iapichino S, Bossini L, Pieraccini F, Castrogiovanni P, (2001). Melatonin in Psychiatric Disorders: A Review on the Melatonin Involvement in Psychiatry. *Front Neuroendocrinol.* 22(1), 18-32.
 27. Paulis L, Simko F, (2007). Blood pressure modulation and cardiovascular protection by melatonin: potential mechanisms behind. *Physiol Res.* 56, 671-684.
 28. Peltier MR, Robinson G, Sharp DC, (1998a). Effects of melatonin implants in pony mares. 2. Long-term effects. *Theriogenology.* 49(6), 1125-1142.
 29. Peltier MR, Robinson G, Sharp DC, (1998b). Effects of melatonin implants in pony mares. 1. Acute effects. *Theriogenology.* 49(6), 1113-1123.
 30. Provinciali M, Di Stefano G, Bulian D, Tibaldi A, and Fabris N, (1996). Effect of melatonin and pineal grafting on thymocyte apoptosis in aging mice. *Mech Ageing Dev.* 90(1), 1–19.
 31. Reiter RJ, (1991a). Neuroendocrine effects of light. *Int J Biometeorol.* 35, 169-175.
 32. Reiter RJ, (1991b). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Reviews.* 12(2), 151–80.
 33. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E, (2000). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci.* 7, 444-458.
 34. Rios ER, Venâncio ET, Rocha NF, Woods DJ, Vasconcelos S, Macedo D, Sousa FC, Fonteles MM, (2010). Melatonin: Pharmacological Aspects and Clinical Trends. *Int J Neurosci.* 120(9), 583-590.
 35. Satué K, Gardón JC, (2013). Review of the Estrous Cycle and the Neuroendocrine Mechanisms in the Mare. *J Steroids Horm Sci.* 4(2),115.
 36. Sewerynek E. Melatonin and the cardiovascular system. *Neuro Endocrinol Lett.* 23 Suppl 1, 79-83.
 37. Simonneaux V, Ribelayga C, (2003). Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters. *Pharmacol Rev.* 55(2), 325-395.
 38. Slangenaupt SA, Roca AL, Liebert CB, Altherr MR, Gusella JF, Reppert SM, (1995). Mapping of the gene for the Mel1a-melatonin receptor to human chromosome 4 (MTNR1A) and mouse chromosome 8 (Mtnr1a). *Genomics.* 27(2), 355–357.

39. Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Cardinali DP, (2008). Jet lag: Therapeutic use of melatonin and possible application of melatonin analogs. *Travel Med Infect Dis.* 6(1-2), 17-28.
40. Topal T, Korkmaz A, (2009). Melatonin ve kanserle ilişkisi. *Genel Tıp Derg.* 19(3), 137-143.
41. Touitou Y, Le Hoang P, Claustrat B, Attye T, Auzeby A, Brun J, Bogdan A, Touitou C, (1986). Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patients with a functional alteration of the retina in relation with uveitis. *Neurosci Lett.* 70(1), 170–174.
42. Uyar A, Alan M, (2008). Koyunlarda Erken Anöstrüs Döneminde Melatonin Uygulamalarının Ovulasyon ve Gebelik Üzerine Etkisi. *YYÜ vet fak derg.* 19(1), 47-54.
43. Waterhouse J, Reilly T, Atkinson G, Edwards B, (2007). Jet lag: trends and coping strategies. *Lancet.* 369, 1117–1129.
44. Williams GL, Thorson JF, Prezotto LD, Velez IC, Cardoso RC, Amstalden M, (2012). Reproductive seasonality in the mare: neuroendocrine basis and pharmacologic control. *Domest Anim Endocrinol.* 43(2), 103-115.
45. Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka MJ, Firestine S, Melan MA, (2003). Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci.* 72, 2183–2198.
46. Wurtman RJ, Axelrod J, Chu EW, (1963). Melatonin, a pineal substance: Effect on the rat ovary. *Science.* 141, 277-278.
47. Yazıcı C, Köse K, (2004). Melatonin: karanlığın antioksidan gücü. *E.Ü. Journal of Health Sciences.* 13(2), 56-65.
48. Yonei Y, Hattori A, Tsutsui K, Okawa M, Ishizuka B, (2010). Effects of Melatonin: Basics Studies and Clinical Applications. *Anti-Aging Medicine.* 7(7), 85-89.

Balıkların Önemli Viral Hastalıkları

Ali Küçük¹, Yakup Yıldırım¹

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

Geliş Tarihi / Received: 15.08.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 18.12.2016

Özet: Dünya var olduğundan beri insan, çevresinde bulunan besin maddelerinden yararlanmayı amaçlamıştır. Bu doğrultuda su ürünleri, özellikle balıklar besin kaynağı olarak kullanılmıştır. Gerek avcılıktan gerekse yetiştiricilikten elde edilen bu ürünler insan tüketimine sunulmaktadır. Bu ihtiyaçtan doğan sektörün günbegün büyümesi su ürünleri üretimini veya avcılığını olumsuz yönde etkileyen, verimini düşüren ve üretimde istikrarsız bir tablo oluşturulmasına sebep olan olguların bilimsel yönden araştırılması zorunluluğunu ortaya çıkarmıştır. Bu olumsuzlukların en önemli sebeplerinden biri olarak kabul edilen viral hastalıklar, dünya sularındaki balıklarda yüksek mortalite ve morbidite oranı ile sektöre büyük bir darbe vermektedir. Bu derlemenin amacı, yetiştiriciliği veya avcılığı yapılarak tüketime sunulan balıkların viral hastalıkları hakkında bilgi vermektir.

Anahtar kelimeler: Balık, viral infeksiyon

Important Viral Diseases of Fish

Abstract: Ever since the world begun, human have aimed to nutrients around. Accordingly, fisheries, especially fish, have been used as a nutritional source. These products either by hunting or breeding are offered for human consumption. Day by day growing of this sector from necessity is provided the scientific need to search the facts affecting the breeding or hunting of water products, decreasing its productivity and causing an unsteady statement in production. Viral diseases are one of the most important reasons for these negations deal a major blow in the sector with high mortality and morbidity rates for all fish in world waters. The purpose of this review is to provide information about viral diseases of fish offered for consumption by means of breeding or hunting.

Key words: Fish, viral infection

Giriş

Yaklaşık %71'lik bölümünün sulak alanlarla kaplı olan yerkürede sayıları ve ekosistemdeki işlevleri tespit edilememiş sucul milyonlarca canlı türü yaşamaktadır. İnsanlar tarih boyunca başta balıklar olmak üzere diğer su canlılarından besin kaynağı olarak yararlanmışlardır. Bu sebeple, dünya ülkeleri imkanları dahilinde ellerinde bulunan su varlıklarını olabilecek en akılcı biçimde kullanmaya hatta mevcut su varlığını azami seviyeye çıkarmanın çabasını göstermişlerdir [61].

Toplam üretimi 2012 yılında yaklaşık 158 milyon ton, 2013 yılında ise yaklaşık 163 milyon tona ulaşan dünyadaki balık üretiminin büyük çoğunluğunu: Çin, Hindistan, Endonezya ve Amerika Birleşik Devletleri tarafından yapılmaktadır. En son verilerde Çin'in Dünya balık üretimindeki %37.2 olan payının %71'nin kültür balıkçılığında karşıladığı açıklanmıştır. Diğer ülkelerin payları ise sırasıyla Hindistan %5.8, Endonezya %5.6, Amerika

Birleşik Devletleri %3.5 ve AB ülkeleri %3.7'dir. Kalan payı ise diğer dünya ülkeleri üretmektedir [16].

Bu derlemenin amacı, yetiştiriciliği veya avcılığı yapılarak tüketime sunulan balıkların viral hastalıkları hakkında bilgi vermektir.

Balıkların Viral Hastalıkları

İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis (IPN)

İlk olarak Amerika'da görülen [15] infeksiyöz pankreatik nekrozisin (IPN) etkeni *Birnaviridae* familyasının *Aquabirnavirus* genusuna ait *İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis Virustur (IPNV)* [19]. Etken, UV'ye karşı dirençli olmasına karşın, klorin ve iodin ile inaktive olur, alkali pH'a duyarlı iken asidik pH'ya az da olsa dirençlidir [32]. Horizontal ve vertikal yollar ile bulaşan etken genellikle salmon balık yetiştiriciliğinin yapıldığı yerlerde gözlenmektedir. Latent enfekte balıklar enfeksiyonu uzun

süreler boyunca idrar ve dışkı ile yayabilirler [15]. Birnavirus, sayısız sucul canlıyı enfekte etmektedir, Reno (1999) tarafından sucul canlılar için en yaygın patojen olarak bildirilmiştir. Türkiye’de ilk kez 2002 yılında rapor edilen etken gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliğini 1990’dan bu yana büyük ölçüde etkilenmiş ve yavrularda yüksek mortalite ile seyretmiştir [10, 62].

Enfeksiyonun inkubasyon süresi gökkuşağı alabalığı ve dere alabalığı yavrularında 4-7 gün iken, Atlantik somon yavrularında 10-14 gündür ve yavrularda % 90’a varan bir mortalite oranı rapor edilmiştir [62]. Klinik olarak dış bakıda; renkte kararırma, abdomende şişkinlik, zig-zag çizerek yüzmeye gibi semptomlar gözlenir [28]. Bunun dışında, pseudofeçes, eksophtalmus, kafa bölgesinde ufak şişlikler gözlenebilmektedir [32]. Histopatolojik muayenede; bağırsaklarda patolojik bozukluklara rastlanırken, klinik enfekte balıklarda kataral enterite de rastlanmaktadır. IPNV aynı zamanda salgı üreten dokularda yangı ve nekrozla bütünleşmiş pankreatite yol açar. Böbrek ve karaciğer bu enfeksiyondan çok fazla etkilenmemesine karşın gastrointestinal sistem yoğun şekilde etkilenir [32].

Polivalan bir anti-IPN virus serumu kullanılarak yapılan serum nötralizasyon testi ile hücre kültüründe izolasyon ve identifikasyonu gerçekleştirilebilen [40] etkenden korunmanın yolu enfekte yada enfekte olduğu düşünülen balık yumurtalarını almak yerine sertifikalı yumurtaların alınması, kaynak sularında üretim yapılması ve enfekte kuluçkahanelerin kapatılmasıdır [32].

Enfeksiyöz Hematopoetik Nekrozis (IHN)

İlk olarak Kuzey Amerika’da rastlanılan etken, daha sonra Avrupa ve Asya’ya sıçramıştır. WAHID-OİE verilerine göre hastalığa 9 ülkede (Avusturya, Çin, Çek Cumhuriyeti, Almanya, İtalya, Japonya, Hollanda, Polonya, Slovenya) yetiştiriciliği yapılan balıklarda, 2 ülkede (Fransa, ABD) hem vahşi hem yetiştiriciliği yapılan balıklarda, 1 ülkede de (Kanada) sadece vahşi ortamdaki balıklarda rastlanıldığı rapor edilmiştir. Türkiye’de yapılan eski çalışmalarda ise virusun yetiştiriciliği yapılan balıklarda görüldüğü saptanmıştır [14]. *Rhabdoviridae* familyasındaki *Novirhabdovirus* generisi içerisinde yer alan etken [48], asit, eter ve ısıya duyarlıdır. 4°C-20°C’de replikasyon yapabilen virusun opti-

mum replikasyon sıcaklığı 15°C’dir [32]. Birincil olarak horizontal yolla bulaşan hastalık, enfekte yumurta, kanemici parazitler, balıkçıl kuşlar, kontamine çiftlik aletleri, solungaç, dışkı ve idrar ile yayılır [32].

IHN salmon ve alabalık yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara yol açar, tatlı su yetiştiriciliğinden daha çok denizde yetiştirilen salmon ve alabalıklar üzerinde deniz suyunun tuzluluk oranından kaynaklanan, ozmatik basınçtan dolayı yüksek mortaliteye sebep olan enfeksiyonlara sebep olmaktadır [28]. 15°C’nin altındaki sular IHN’nin ortaya çıkması için uygun sıcaklıktaki sulardır. Hastalığı atlatan alabalıklar, herpesvirus enfeksiyonlarında olduğu gibi yaşamları boyunca latent enfekte olarak kalırlar [2].

Virus kapillar damar hücrelerine, hematopoetik organ/dokulara ve nefronlara yerleşir. Virusun replike olduğu dokularda, klinik olarak, hemoraji ve ödem göze çarpar. Erişkin balıkların dirençli oldukları enfeksiyona, genç balıklar daha duyarlıdır [28]. Omurgada deformasyona yol açan hastalık, visceral organlarda anemi, gastrointestinal sistemde mukus benzeri sıvı birikimine sebep olur [32]. IHN, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı’nın yayımlanmış olduğu 1 Nisan 2004 tarihli 2004/14 sayılı tebliğinden beri ihbarı zorunlu hastalık olarak kabul edilmiştir [29]. Ayrıca, “Avrupa Birliği ülkelerindeki işletmelerde tespit edilebilen, önemli maddi kayıplara yol açan, tedavi ve aşısı bulunmayan ve belirlenen çiftliklerin tespiti zorunlu hastalıklar” listesinde yer alır [52].

Nötralizasyon tekniği ve hematopoetik dokulardaki değişikliklerin saptanmasıyla ayırt edilebilen virustan korunmak için yumurtalar iodoform ile dezenfekte edilmeli, virusun tespit edildiği kaynaklar imha edilmeli ve hastalıkla enfekte olan çiftlikler veya kuluçkahaneler terk edilmelidir [32].

Viral Hemorajik Septisemi (VHS)

Gökkuşağı alabalıklarının en önemli viral hastalıklarından biri olan VHS’nin [45] etkeni *Rhabdoviridae* familyasında bulunan *Novirhabdovirus* türüdür [28]. 4 farklı genotipe sahip olan etken [45] eter, gliserol, kloroform, formalin, sodyum hipoklorit, UV ışınları ve 56°C-60°C’de inaktif olur [32]. VHS, Kuzey Yarımkürede’ki pek çok bölgede bulunan tatlı su ve deniz balıklarını enfekte eden sucul bir patojendir [22,56]. Viral hemorajik septisemi, OİE’nin 2010

yılında yayımlanmış olduğu listede bildirilmesi gereken dokuz balık hastalığından biridir ve hastalığa ilk kez 1949 yılında Danimarka'da rastlanmıştır [27, 60].

VHS virusunun taşıyıcıları, klinik veya subklinik infekte kültür yada doğal balıklardır. Etken genellikle idrarla yayılır [28]. 4°C-14°C arasındaki su sıcaklıklarında görülen hastalığın, düşük su sıcaklıklarında (1°C-5°C) kronik formuna rastlanılabilir. Hastalığın kronik formunun görülmesi halinde toplu ölümlere yol açtığı belirlenmiştir. 15°C-18°C arası su sıcaklıkları ise ölüm oranlarını aşağı çekmektedir. Yılın her mevsimi gözlemlenebilen bu hastalığa özellikle su sıcaklıklarının artmaya başladığı ilkbahar aylarında daha fazla rastlanır [23].

VHS genellikle 40 günlük ya da daha büyük olan küçük balık türlerinde görülür [40]. Klinik bulguları arasında yüzgeç diplerinde peteşiler, hemorajiler, çok soluk yüzgeçler, periocular hemorajiler, laterji, anormal bir yüzüş şekli gösterilebilir. Virusun metabolizmadaki ilk hedefi böbrek ve dalak endotel hücreleridir ve bu organlar 1-4 gün içinde enfekte olur. Enfeksiyondan hemen sonra bu organlarda nekrosis ve dejenerasyonlara rastlanır. Deneysel enfekte edilen bir balığın karaciğerinde 4-7 gün içerisinde multifokal dejenerasyon alanlara rastlanılmıştır. Hastalıklı balıkların vücutları siyaha yakın bir renk alır, hastalığı atlatan balıklarda dönerek yüzme gibi sinirsel semptomlar baş gösterebilir [34, 40].

Hastalıklı hayvanlardan alınan örneklerle uygulanan real time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) testinden elde edilecek pozitif sonuçlar etkenin varlığını göstermektedir. Enfeksiyondan korunmak amacıyla kontrol protokollerine uyulmalı ve şüpheli kaynaklardan yumurta alınmamaya dikkat edilmelidir [20]. Hastalık, 3285 Sayılı Hayvan Sağlığı Zabıtası Kanunu (HSZK) kapsamında 1 Nisan 2004 tarih ve 2004/14 sayılı tebliğinden itibaren ihbarı mecburi balık hastalığı olarak tanımlanmıştır [8].

Sazanların Bahar Viremi (SBV)

Avrupa'da kendine son derece geniş bir yayılma alanı bulan etken *Rhabdoviridae* familyasının *Vesikulovirus* genusu içerisinde yer almaktadır [1]. Dünya genelindeki sazan balıkları üzerinde yüksek kontagiyöz karakterli ve ciddi enfeksiyona yol açan

SBV virusu OIE'nin 2011 yılında yayımladığı listede bildirilmesi gerekli bir patojen olarak rapor edilmiştir [44]. Virus, eter, ısı ve aside duyarlıdır [1]. Optimal replikasyon pH'si 7.0-10.0'dur [56]. Su sıcaklıklarının 10°C-17°C olduğu bahar aylarında ölüm oranı çok daha fazla gözlenirken, enfekte balıkların yüksek sıcaklıklarda ürettiği humoral antikorlar yayılmayı durdurabilir ve bu immunité sayesinde re-enfekte olmaktan korunabilirler [1]. SBV virusu, horizontal yolla yayılmaktadır [50].

Ölümcül bir enfeksiyon oluşturan etken, kapillar endotel hücrelere, nefronlara ve hematopoetik yapılara affinite gösterir. Virusun dokular üzerindeki klinik bulguları genel olarak hemorojik oluşumlar ve ödemdir [28]. Balıkların üretim çiftliklerindeki havuzların girişinde yoğunlaşmaları SBV'nin primer belirtilerinden sayılabilir. Laterji, dengesiz ve sebepsiz yüzme davranışsal semptomlardır, sudan çıkarılan balığın anal bölgesinden asidik kanlı bir sıvı gelir [32].

SBV virusu, diğer tatlı su balıklarını da enfekte edebilmesine karşın asıl etkisi sazanlar (*C. carpio*) üzerinedir. Dış bakıda, deri üzerinde ve gözde hemorajiler, eksophthalmus, abdominal gerginlik gözlenirken, iç bakıda; Peritonitis, ascites, kataral ve hemorajik enteritis, iskelet kaslarında ve yüzme keselerinin çeperlerinde peteşiyel hemorajiler izlenebilmektedir. Etken enfekte balıkların böbrek ve dalaklarından da izole edilmiştir [1, 44].

Enfeksiyonun tanısı klinik bulgular yardımıyla yapılabilir bunun yanı sıra indirekt floüresan antikor testi (İFAT) ve Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testleri de izolasyon ve identifikasyonda kullanılmaktadır [58]. Etkenden korunmak için hastalıkla kontamine balık çiftlikleri karantınaya alınmalı ve bölgedeki balık hareketleri durdurulmalıdır [41]. Ülkemizde, Hayvan Sağlığı Zabıtası Kanununa (HSZK) göre ihbarı mecburi bir hastalıktır [8].

Yellowtail Asites Virus (YAV) Enfeksiyonu

Balık, kabuklu ve yumuşakçalarda enfeksiyon meydana getiren bu virus, *Birnaviridae* familyasının *Aquabirnavirus* genusundadır. Güneydoğu Asya'daki balıklarda epizootik ülseratif sendroma yol açan viral ajan da bu genus içerisinde yer almaktadır [18]. Virus pH 3-11 arasına, etere ve kloroforma dirençlidir. 56°C de 30 dakika boyunca

etkin kalabilir, replikasyonu idoksuridine ile inhibe edilemez [59]. YAV'ın viral replikasyon ve protein sentezinin Japon inci istiridyesinde meydana geldiği elektron mikroskobu ve indirekt florasan anti-kor testi ile doğrulanmıştır [26]. Bununla birlikte, YAV'ın sebep olduğu hastalıkların baskılanması ve sucul çevrede YAV salgınlarının azaltılması için virusun bir konakçıdan diğerine bulaşma yolunun gün yüzüne çıkarılması gerekmektedir [26].

Genellikle su sıcaklıklarının 18°C-25°C arasında olduğu Nisan ve Ekim ayları arasında hastalığın meydana gelme sıklığı artarken daha sonraki aylarda bir düşüşe geçmektedir. YAV salgını, sekonder enfeksiyon etkenlerinin etkisiyle daha da ağır bir prognoz gösterebilir, bu durum hastalığın teşhisini güçleştirir [25, 49]. Hastalıktan etkilenen yavrularda; anorexia, letarji ve tirbişon şeklinde yüzme hareketleri gözlenir. Abdomen şişkin, intestinal sistem hemorojik ve baş bölgesinde kızarıklıklar görülür. En önemli karakteristik bulgu ise akut kataral enteritistir [11].

İnaktif aşilar kullanılarak hastalıktan korunmaya çalışılmaktadır. Fakat bu tür aşiların doku kültürlerinde veya özel canlı türlerinde üretilmesi için çok miktarda aktif virusa gereksinim duyulmaktadır ki bu da üretim maliyetlerini artırmaktadır. Bununla birlikte attenüe canlı aşılarda balıklar üzerinde enfeksiyöz olgu yaratma korkusundan dolayı tercih edilmemektedir. Günümüzde gelişen teknoloji ile birlikte virus proteininden üretilen subunit aşilar inaktif aşılara göre daha güvenlidirler. Tüm bu sebepler subunit aşı geliştirme çalışmalarını cazip hale getirmektedir [57].

Hirame Rhabdovirus (HIRRV)Enfeksiyonu

Hirame Rhabdovirus (HIRRV), *Rhabdoviridae* familyasının *Novirhabdovirus* genusu içerisinde yer alır [6]. Etken negatif polariteli, tek iplikçikli, lineer morfolojiye sahip bir RNA virusudur [9]. 5°C ila 20°C arasındaki su sıcaklıklarında replike olabilen Hirame Rhabdovirusun optimum replikasyon sıcaklığı 15°C-20°C arasındadır. 80 x 180 nm boyutlarında ve mermi şeklinde olan virusun, pH 3'e, etere ve ısıya (50°C 2 dk) duyarlı olduğu bilinmektedir [35]. Diagnostik testler etkenin Avrupa'da bilinen *Novirhabdovirus* türleri ile ilişkili olmadığı sonucunu ortaya çıkarmıştır [7]. Etken öncelikli olarak Japon pisi balığını (*Paralichthys olivaceus*), çipu-

rayı (*Spondyliosoma cantharus*) ve gökkuşağı alabalığını (*Oncorhynchus mykiss*) enfekte etmektedir [63]. Polonya'da yapılan bir araştırmada [7] tatlı su kültür balıkçılığı yapılan iki çiftliğe hastalığın bulaşmasında Asya'dan gelen ve yem olarak beslemede kullanılan dondurulmuş balıkların yol açtığı ortaya konulmuştur. Etkenin, su ve yumurtalar yolu ile taşındığı bilinmektedir [13].

HIRRV enfeksiyonu genellikle gonadlar, yüzgeçler ve iskelet kaslarında yoğunlaşmaktadır [6]. Hasta balıkların genellikle lateral kas sistemlerinde hemorajilere rastlanmakta, dalakta ve hematopoetik dokularda nekroz odakları gözlenmektedir.

Bu semptomlar VHSV ile benzerlik göstermektedir [26].

Nötralizasyon testi ile identifikasyonu mümkün olan etkenden korunmak amacıyla DNA aşısı geliştirme çalışmaları yapılmaktadır [42, 55].

Viral Nervous Nekrozis (VNN) Enfeksiyonu

Viral ensefalopati ve retikülopati olarak da bilinen viral nervous nekrosis enfeksiyonunun etkeni *Nodaviridae* familyasında *Betanodavirus*'tur [11]. Çift iplikçikli genoma sahip etken pozitif sarmallı RNA taşır [11]. VNN'nin Amerika ve Afrika kıtaları dışında dünya genelinde de yavru ve larvalarda ciddi hastalıklara yol açtığı bilinmektedir. Günümüzde bu hastalığa 11 familyadan 22 balık türünde rastlanmaktadır [47].

Anaç balıklar virusun en önemli kaynağıdır ve etken, vertikal yol ile yavrulara taşınır [8, 20]. Retina ve beyin dokularında vakuolleşmeler ile karakterize olan bu hastalık balık populasyonlarında yüksek mortalite oranlarına sebep olmaktadır [43]. Hastalıkta genç balıklarda, ergin balıklara göre daha ciddi lezyonlar meydana gelir [47].

Enfeksiyon sırasında iştah kaybı, anormal yüzüş ve beden renginde koyulaşma, alışılmışın dışında tirbişon tarzı yüzme gibi klinik bulgular görülebilir. Ayrıca yüzme keselerinde yoğun yangı ve beyinde ciddi konjesyonlar oluşur [11]. Hastalık temel olarak beyin, spinal cord ve retinada gözlemlense de virus balığın gonadlarında veya sindirim kanalında replike olabilir ve bu replikasyon sonucunda yumurtalar veya larvalar kontamine olabilir [11].

Hastalıktan korunmanın en başarılı yolu yumurtaların dezenfeksiyonudur [28], enfeksiyonun

tanısında ise hasta balıkların beyin ve retinalarında rastlanılan vakuolleşmeler karakteristik bir özellik taşımaktadır [43]. Bunun yanı sıra enfekte retina ve beyin dokularından yapılan preparatların elektron mikroskopuyla incelenmesi ile de virus tanımlanabilir [47]. Enfeksiyona karşı etkin bir tedavi yöntemine literatür araştırmalarında rastlanılamamıştır. Fakat hastalığın başlangıç safhasında enjeksiyon veya immersiyon yolu ile uygulanabilecek aşı çalışmaları hala devam etmektedir [12].

Snakehead Rhabdovirus (SHRV) Enfeksiyonu

Snakehead Rhabdovirus *Rhabdoviridae* familyasının *Novirhabdovirus* genusu içerisinde yer almaktadır [3]. Virusun optimum replikasyon sıcaklığı 15°C ile 25°C arasındadır. Etken, 37°C’de replikasyonunu gerçekleştirememektedir. Virus, infektivitesini kaybetmeksizin 10°C’ de 30 gün, 8°C’de 10 gün muhafaza edilebilir [38]. Güneydoğu Asya’daki sıcak su balıklarını etkilemektedir [31]. SHRV hakkında Sri-Lanka’da yapılan bir araştırmaya [17] göre hastalığın enfektif alanda yaşama, etkeni barındıran su ile temas ve hastalıklı balıkların popülasyonda bulundurulması ile bulaştığı gösterilmiştir.

Karakteristik olarak nekrotik ülserasyona yol açan SHRV pek çok balık türünde enfeksiyona sebep olmaktadır. Bu balık türlerinin en yaygın olarak bilinenleri; Snakehead (*Ophicephalus striatus*), yayın balığı (*Clarias bratachus*) ve kum kayabalığıdır (*Oxyeleotus marmoratus*) [30]. Süspanse hücre kültüründe %2’lik formalin ile 5 dakika boyunca muamele edilen vürusun %99.9’u, 30 dakika içinde de tamamı inaktive olmaktadır [17]. Etken elektron mikroskopisi, ELISA ve çapraz nötralizasyon tekniği ile identifiye edilebilir [33].

Channel Catfish Virus (CCV) Enfeksiyonu

Channel catfish virus (CCV), *Herpesviridae* familyasının *Gammaherpesvirinae* alt ailesinin *Ictalurivirus* genusu içerisinde yer almaktadır [28]. Virusun, %20’lik eter veya %5’lik kloroform uygulaması ile enfektivite oranında %20’lik bir düşüş yaşanır, ayrıca 60°C’ de 1 saatte ve ultraviyole ışığına maruz kalma durumunda etken inaktive olur [53]. Klinik ve subklinik enfekte balıklar hastalığın rezervuarları olarak kabul edilmektedir. Etkenin, deneysel amaçla enfekte edilen balıkların bulunduğu sudan izole edilmesine rağmen virusun nasıl

saçıldığı anlaşılamamıştır, vertikal ve horizontal bulaşma tespit edilmiştir fakat vertikal bulaşmanın mekanizması çözülememiştir [28]. 18°C-20°C sıcaklıktaki sulara bulunan 10-30 günlük balıklarda herpesvirus enfeksiyonuna bağlı mortalite oranı %80-90 civarına yaklaşmaktadır. Enfekte balıklarda; deride ve yüzgeçlerde epidermal hiperplazilere, donuklaşmış yüzgeçlere, melanizme rastlanılabılır. Ayrıca nadir de olsa asites gözlemlenmektedir. Asites semptomu gösteren balıkların renal tubulleri dilate olmuştur ve tubular epitelyaları ile karaciğer hücreleri atrofiye haldedir [11].

Etken, nötralizasyon, immunflorasan, ELISA, PZR gibi testler ile teşhis edilebilir [47]. Enfeksiyonu atlatan balıklarda nötralizan antikor seviyesi yüksektir. Bu dönemden sonra virusa ait yapılar tespit edilemese de erişkin balıklarda özellikle üreme dönemi stresiyle birlikte re-enfeksiyonlar oluşabilir [28].

Oncorhynchus masou Virus (OMV) Enfeksiyonu

Herpesviridae familyasında bulunan virüse geçici olarak *Oncorhynchus masou* virüs (OMV) adı verilmiştir [36]. OMV’nin optimum replikasyon sıcaklığı 15°C civarlarıdır. Etken, ısıya, etere ve aside (pH 3) karşı duyarlıdır. UV ışığı ile tamamen inaktive olan OMV’nin viral replikasyonu primidin analoglarıyla, fosfoasetat ve asiklovir gibi kimyasallarla inhibe edilebilir [64]. OMV’nin konakçıları klinik enfekte ve bir kültürden diğerine gizlice geçiş yapan vahşi balıklar olarak belirlenmiştir. Enfeksiyon dışkı, idrar, seksüel sıvılar ve deri mukusu ile yayılabilmektedir. Su büyük bir abiyotik rol üstlenirken yumurta yüzeylerinin teması da horizontal bulaşmaya sebep olabilmektedir [50]. OMV onkojenik bozukluklarla birlikte deride ülseratif dejenerasyonlara neden olur [28].

Klinik muayenede ödem ve hemorajilerle ilişki halinde ilk olarak sistemik ve çoğunlukla ölümcül enfeksiyonlar şeklinde görülür [50]. Virus endotelial kan kapillar hücrelerinde ve hematopoetik dokularda enfeksiyon meydana getirir. Bazı vakalarda karaciğerde beyaz odaklanmalara rastlanılabılır [37]. Klinik enfeksiyonu atlatan pek çok balıkta 4 ay sonra ağız kenarlarında, 1 yıl sonra caudal yüzgeçte, operkulumda ve vücudun farklı bölgelerinde neoplaziler meydana gelmektedir [28]. Klinik semptomların incelenmesiyle ve laboratuvar analizlerinden

IFAT ve PZR yöntemi ile etkenin tespit edilmesi mümkündür, korunmada ise formalin ile inaktive edilmiş OMV aşısı kullanmanın yavrular üzerinde çok etkili bir koruma sağladığı bilinmektedir [50].

Salmonid Alphavirus (SAV) Hastalığı

Etken, *Togaviridae* familyasının *Alphavirus* genusu içerisinde yer alır, 55- 65 nm büyüklüğünde ve zarlı olan SAV tek iplikçikli RNA taşır [51]. Bugün için salmonid balıklarda görülen alphavirusları 6 alt tipe ayırabiliriz [24, 64]. Bunlardan alt tip 1 ve alt tip 3-6 pankreas hastalığına (PD), alt tip 2 sleeping hastalığına (SD) sebep olmaktadır. SAV-1 ve SAV-4 öncelikli olarak deniz Atlantik somonlarından, SAV-3 Norveç'te denizde yetiştirilen gökkuşuğu alabalıklarından izole edilmiştir [64]. Su sıcaklığının 8°C-15°C arası olduğu durumlarda akut halde olan enfeksiyon, su sıcaklığının 8°C altına düştüğü sıcaklıklarda kronikleşmektedir [64].

Salmonid Alphavirus; enfekte balıklar, kontamine su ve su gereçleri ile bulaşır. Hasta balık etkeni 6-12 hafta boyunca yayabilir ve hatta deniz suyunda 2 yıl boyunca salgınlar gözlenebilir [46], virus deniz suyunda uzun süre enfektivitesini korumaktadır [51]. Salgın sürüde gözlenmeden bir veya iki hafta önce iştahta düşüş yaşanır. Salgın sırasında balık yüzeye yakın, kafesin köşelerinde yüzerken ya da kafesin veya tankın dibinde dinlenirken gözlemlenebilir [51].

Makroskobik değişiklikler farklı olmakla birlikte karşılaşılan en yaygın bulgu sarı mukoid intestinal dokudur. Kimi balıklarda pylorik kesede peteşilere, hemoperikardiyumda ruptura neden olabilir. Ayrıca dolaşım problemlerine işaret olan eksoptalmusla, asitesle veya ödematoz oluşumlarla karşılaşılabilmektedir. Histopatolojik olarak, pankreas ekzokrininde, iskelet ve kalp kaslarında değişikliklere yol açar [51].

Serum nötralizasyon testi ve real-time PZR tekniği ile teşhisi mümkün olan enfeksiyondan korunmak için [51], stres faktörlerinin azaltılması, canlı balık transferlerinden kaçınılması, balık yetiştiriciliğine uygun malzeme kullanılması, kalifiye personel ile çalışılması gibi önlemler alınmalıdır [51].

Koi Herpesvirus Hastalığı (KHVH)

Etken, Herpesvirus üstfamilyasının *Alloherpesvirus* genusunun *Cyprinid Herpes Virus-3* (CyHV-3) tü-

rüdür. Sekans analizleri CyHP-3 etkenin CyHP-1 ve CyHP-2 etkenleri ile yakın ilişkili olduğunu göstermiştir [41]. Toplu Koi Sazan'ı ölümleri ilk olarak 1998 yılında Amerika Birleşik Devletleri ve İsrail'de rapor edilmesine karşın yapılan örnek analizlerinde 1996 yılından beri Birleşik Krallık' ta doğal yaşamdaki sazanlarda bu etkene rastlanıldığı bildirilmiştir. Günümüzde ise, Güney Amerika, Kuzey Afrika ve Avustralya hariç dünyanın geri kalanında CyHV-3'e rastlanılmaktadır [58]. CyHV-3 enfekte olmuş balık ile direkt temas yoluyla, enfekte balığın vücut sıvıları yolu ile enfekte çamur, su gibi faktörler ile taşınmaktadır. Etken balıklara birincil olarak deriden bulaşır [21]. KHV enfeksiyonu su sıcaklıklarının 16°C-25°C arası olduğu tipik bahar aylarında görülür ve inkübasyon süresi su sıcaklıklarına bağlı olarak 7-21 gün arasında değişmektedir. Deneysel çalışmalar etkenin, 28°C civarı su sıcaklığında mortaliteyi artırdığını ortaya koymuştur. CyHP-3, sıcak sularda soğuk sulara karşın daha hızlı bir enfeksiyon tablosu oluşturur [21].

Morbidite %100, mortalite %80-90 seviyesine sahip [48] ve her yaşta sazanda görülebilen KHV hastalığı balıkların solungaçlarında inflamasyonlara, hiperpilazilere, hematopoetik dokularda ise nekrozlara sebep olabilmektedir [20]. KHV enfeksiyonu sırasında en fazla etkilenen organlar arasında yüzgeçler, böbrekler ve dalak sayılabilmektedir [48]. Enfeksiyonun tanısı tipik klinik bulgular incelenerek konulabilir. Bununla birlikte histolojik bakıda solungaç epitellerinde büyük hücre proliferasyonlarına rastlanılır. Etken, KF-1 hücre kültürlerine yapılan ekimler sonucunda izole edilse de PZR yöntemi bu yöntemden çok daha etkilidir [54]. Güvenli ve efektif bir aşılama şu an için mevcut olmasa da balıkların korunmasında attenüe aşılarda kısmi olarak kullanılabilir. Aşı virusa karşı bir antikor oluşumu sağlamasına rağmen aşının koruma süresi belirsizdir. OIE 2009 çalışmasına göre inaktif KHV içeren lipozom bazlı aşılarda ağızdan uygulamaları ile enfeksiyona karşı koruma sağlandığı gözlemlenmiştir [48]. Türkiye'de Hayvan Sağlığı Zabıtası Kanununa (HSZK) göre hastalığın ihbarı mecburidir.

Lenfokist Hastalığı (Lymphocystis Disease, LCD)

Taksonomik olarak etken, *Iridoviridae* familyasının *Lymphocystivirus* genusu içerisinde yer almaktadır

[4]. Enfeksiyon genellikle kalkan, pisi ve dil balığı gibi yassı balıklarda görülmekle birlikte tatlı su levrğinde de gözlenmiştir. Bilinen bulaşma şekli kontamine materyal ve enfekte sular yolu ile [15]. Lymphocystis virus balıklar üzerinde en kolay belirlenebilen viral etkenlerden biridir. Hastalık balıkların derilerinde büyük hipertrofilerle karakterizedir [62]. Virusla enfekte hücreler normal boyutlarından çok daha büyük boyutlara ulaşabilirler (1mm) [15]. Hastalık deride, solungaçlarda, kuyrukta ve yüzgeçlerde siğil benzeri yapılar oluştuktan sonra spontane bir şekilde iyileşmektedir. LCD virusu tatlı ve tuzlu sulardan nehir ağızlarına kadar pek çok habitatta yaşayan 140'dan fazla balık türünden izole edilmiştir [62].

Lymphocystis tanısı, klinik olarak tipik büyümüş hücrelerin gözlemlenmesiyle konulabilir [11]. Hastalığın kontrolü için en iyi yol mümkün olan en kısa zamanda çiftliği enfekte balıklardan arındırmak ve çapraz kontaminasyonu önlemektir [4].

Yüzme Kesesi Yangısı (Swim Bladder Inflammation, SBI)

SBI, sazanların ilkbahar viremsi ve eritrodermatitis ile birlikte enfeksiyöz hidrops kompleksini oluşturan bir hastalıktır [15]. Etken sazanların ilkbahar viremsisine yol açan *Rhabdoviridae carpio* ile aynı serolojik yapıyı taşımaktadır. Bu etken de tıpkı diğer rhabdoviruslarda olduğu gibi mermi benzeri bir morfolojiye sahiptir [23].

Enfeksiyon direkt ve indirekt yolla yayılır, yüzme kesesinde genetik anomaliden kaynaklanan anatomik bozukluk bulunan balıklar hastalığa predispozitedir [15].

Genel muayenede karın bölgesinde şişlik, yüzme bozuklukları, reflekslerde yavaşlama, ekzoftalmus ve deride hiperpigmentasyona rastlanır [15]. Nekropsi bulgularında ise, peteşiyel kanamayı takiben hava kesesinin ön ve arka duvarları kalınlaşmıştır. Nekroza bağlı olarak meydana çıkan yangısal reaksiyonlar sonucu peritonitis ile karşılaşılabilir. Hava kesesinin arkasında kanlı sarı bir iltihaplanma oluşur, son dönemlere doğru ise kese işlev göremez hale gelir ve kistik bir duruma geçer. Anüste prolapsus meydana gelir [10]. Enfeksiyonun tanısında klinik ve histopatolojik bulgular ile nekropside elde edilen veriler kullanılabilir, ayrıca günümüzde ge-

lişen teknoloji ile birlikte moleküler yöntemlerden faydalanılır [15].

Çiçek Hastalığı (Fish Pox)

Poxviridae familyasında bulunan ve DNA genomuna sahip etken, sazanlardan elde edilen hücre kültürlerinde kolaylıkla üretilir [15, 58]. Sporadik seyreden hastalık *cyprinid* türlerinde yaygın olarak görülmektedir ve mortalitesi çok düşüktür. Virus vücut yüzeyindeki portantrelerden girerek enfeksiyonun sebep olur [15]. Genellikle lokal ve kronik olan lezyonlar epidermal hiperplaziler doğurur. Açık renkli kabarıklar ve lekeler papillomlara sebep olur [58]. Mikroskopik incelemede; vakualizasyon ve multinükleer dev hücreler görülebilir. Nekropside iç organlarda herhangi bir değişikliğe rastlanılmamaktadır. Histopatolojik muayenede dermisin hiperplazisi en önemli bulgulardan biridir [15]. Çiçek hastalığının klinik olarak tanınması mümkünse de diğer tümöral ve paraziter hastalıklarla karıştırılabilmektedir. Bundan dolayı histopatolojik muayene ile hastalığın varlığı doğrulanmalıdır [15]. Mortalitesi düşük olan bu hastalıktan korunmak için genel korunma prensipleri takip edilmelidir [15].

Stomatopapilloma

Enfeksiyonun etkeni DNA genomu barındıran *Papoviridae* familyasının *Stomatopapilloma virusudur*. [15] Karnıbahar hastalığı olarak bilinen stomatopapilloma ilk olarak 20. Yüzyılda Avrupa'da rapor edilmiştir. Her yaşta ve boyda yılanbalığı enfekte olabilmektedir. Genellikle kafa bölgesinde bening epidermal neoplazilerle karakterize olan bu hastalıkta lezyonlar vücudun diğer bölgelerinde de görülebilmektedir. Papillomlar, fibro-epitelyal yapıdadır, doku proliferasyonlarının sebebi ise tam olarak bilinmemektedir [5].

Turna Balıklarının Kızıl Hastalığı

Turna balıklarındaki (*Exos lucius*) bu enfeksiyona, *Rhabdoviridae* familyasından *Vesiculovirus* genusundan *Pike fry rhabdovirus* sebep olmaktadır [39]. Akut bir enfeksiyona sebep olan bu hastalık genç bireylerde hidrosefalus oluştururken yaşlı bireylerde kızıl hastalığına sebep olmaktadır. Etken Avrupa'da geniş bir şekilde yayılmıştır ancak diğer kıtalarda rapor edilmemiştir. Hidrasefalus evresinin klinik bulgularının ilk dönemlerinde laterjiye ve anormal

yüzmeye rastlanmaktadır, en önemli bulgulardan biri ise hidrasefalusa bağlı olarak eksoftalmusla birlikte seyreden kafanın dorsalinde gözlerin hemen arkasında bir ödem oluşmasıdır. Hemorajik (kızıl) formunda ise abdominal bölgede ve pelvik yüzgeçlerde kırmızı ve şişkin alanlara rastlanmaktadır. Abdominal boşlukta asites oluşur, Etkenin identifikasyonu ELISA, nötralizasyon testi, PZR, IFAT ile mümkündür [46].

Kaynaklar

- Ahne W, Björklund HV, Essbauer S, Fijan N, Kurath G, Winton J R, (2002). *Spring viremia of carp*. Dis. Aquat. Org. 52, 261-272.
- Albayrak H, Özcan E, (2010). *Gökkuşluğu alabalıklarında (Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792) enfeksiyöz pankreatik nekrosis ve enfeksiyöz haemopoietic nekrosis virus enfeksiyonlarının varlığının araştırılması*. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 57, 125-129.
- Alonso M, Carol H K, Johnson M C, Pressley M, Leong J, (2004). *The NV Gene of Snakehead Rhabdovirus (SHRV) Is Not Required for Pathogenesis and a Heterologous Glycoprotein Can Be Incorporated Into The SHRC Envelope*. J. Virol. 78, 5875-5887.
- Alvarez-Pellitero P, Barja J L, Basurco B, Berhat F, Toranzo A E, (2004). *Report About Fish Viral Disease*, Options Mediterraneennes: Serie B. Etudes et Recherches. 49, 91-102.
- Andor Doszpoly, Zoltán L. Tarján, Róbert Glávits, Tamás Müller, Mária Benkő. (2014). Full genome sequence of a novel circo-like virus detected in an adult European eel *Anguilla Anguilla* showing signs of cauliflower disease. Dis. Aquat. Org. 109, 107-115.
- Borzym E, Matras M, Maj J, Sandomierska A, Olesen N J, Eliassen M, Baud M, Talbi C, Bigarre L, (2012). *First Detection of Hirame Rhabdovirus (HIRRV) in Europa*. 16. Annual Meeting of the National Reference Laboratories for fish Diseases Aarhus/Denmark.
- Borzym E, Matras M, Maj-Paluch J, Baud M, De Boisseson C, Talbi C, Olesen N, Bigarre L, (2014). *First Isolation of Hirame Rhabdovirus from Freshwater Fish in Europa*. J. Fish. Dis. 37, 423-430.
- Buket Ö.Ö, (2016). *Türkiye'de İhbarı Mecburi Balık Hastalıkları*. Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Bornova/İzmir.
- Caiping C, Hirono I, Aoki T, (2003). *In Vitro İnhibition of Fish Rhabdoviruses by Japanese Flounder, Paralichthys olivaceus Mx*. Virology. 317, 373-378.
- Candan A, (2002). *First report on the diagnosis of infectious pancreatic necrosis (IPN) based on reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in Turkey*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 22, 45-48.
- Castric J, (1997). *Viral Diseases in Fish Mariculture*, Eur. Assoc. Fish Pathol. 17(6) , 220.
- Chiu-li C, Han-You Lin J, Chen M, Yang H, (2007). *An oral nervous necrosis virus vaccine that induces protective immunity in larvae of grouper (Epinephelus coioides)*. Aquaculture. 268, 265-273.
- Dietzgen RG, Kuzmin I, (2012). *Rhabdoviruses: Molecular Taxonomy, Evolution, Genomics, Ecology, Host-Vector Interactions, Cytopathology and Control*. British Library Cataloguing in Publication Data. p. 18.
- Dixon P, Paley R, Alegria-Moran R, Oidtmann B. (2016). *Epidemiological characteristic of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) : a review*. Vet. Res. 47, 1-26.
- Erer H, (1995). *Balık Hastalıkları*, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi. Konya, Yayın No:994/008, p. 54-67.
- FAO, (2015) *Global Aquaculture Production statistics database updated to 2013 Summary information In March 2015* (www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en). Erişim Tarihi: 21.12.2015.
- Frerichs GN, (1990). *Efficacy of Chemical Disinfectants Against Snakehead Rhabdovirus*. J. Appl. Ichthyol. 6, 117-123.
- Gn Frerichs, (1995). *Viruses Associated with Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS) of Fish in South-east Asia*. BMC Vet. Res. 26(5-6), 449-454.
- Gürçay M, Turan T, Parmaksız A, (2013). *Türkiye'de kültürü yapılan gökkuşluğu alabalıklarında (Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792) enfeksiyöz Pankreatik Nekrosis Virus varlığının tespiti üzerine bir araştırma*. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 19(1), 141-146.
- Hanson L, Dishon A, Kotler M, (2011). *Herpesvirus that Infect Fish*. Viruses. 3, 2160-2191/V 3112160.
- Hartmann KH, Yanong PER, Pounder DB, Petty BD, Francis-Floyd R, Riggs AC, Waltzek TB, (2004). *Koi Herpes Virus Disease (KHVD)*. VM-149, University of Florida.
- Hawley L, Garver K, (2008). *Stability of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in freshwater and seawater at various temperatures*. Dis. Aquat. Org. 82, 171-178.
- Hill BJ, (1975). *Phsico-chemical and Serological Characterization of Five Rhabdovirus Infecting Fish*. J Gen Virol. 27, 369-378.
- Hodneland K, (2006). *Salmonid Alphavirus (SAV) Genetic characterisation of a new sub type , SAV-3, and implementation of a novel diagnostic method*. University of Bergen, Norway p. 27-28.
- Inaba M, Kimura T, Kikukawa R, Iwasaki M, Nose M, Suzuki S, (2007). *Annual dynamics of marine birnavirus (MABV) in cultured Japanese flounder Paralichthys olivaceus and sea water*. Fisheries Sci. 73, 615-622.
- Isshiki T, Nagano T, Suzuki S, (2001). *Infectivity of Aquabirnavirus Strains to Various Marina Fish Species*. Dis. Aquat. Org. 46, 109-114.
- Isshiki T, Nishiziwa T, Kobayshi T, Nagano T, Miyazahi T, (2001). *An Outbreak of VHVS (Viral Hemorrhagic Septisemia Virus) İnfection in Farmed Japanese Flounder Paralichthys olivaceus in Japan*. Dis. Aquat. Org. 47, 87-99.

28. Işidan H, (2006). *Önemli bazı viral balık hastalıkları-I*. SÜMAE Yunus Araştırma Bülteni. 6, 10-13.
30. Işidan H, Bolat Y, Özdarendeli A, Albayrak H, Kutlu İ, Türe M, (2010). *Karadeniz Bölgesinde Kültürü Yapılan Ve Doğal Balıklardan Viral Hemorajik Septisemi Virüs (VHSV) İzolasyon Çalışmaları Ve Elde Edilecek İzolatların Patojenitesini Belirleyen Genetik Yapı Üzerine Çalışmalar*. Proje Sonuç Raporu Kitabı. Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü.
31. Johnson MC, Maxwell JM, Loh PC, Leong JC, (1995). *Molecular characterization of the glycoproteins from two warm water rhabdoviruses. Snakehead rhabdovirus (SHVR) and rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS)/Spring viremia of carp virus (SVCV)*. Virus Res. 64, 95-106.
32. Johnson MC, Simon BE, Kim CH, Leong JC, (2000). *Production of Recombinant Snakehead Rhabdovirus: The NV protein is not required for viral replication*. J. Virol. 74, 2343-2350.
33. Kalaycı G, Özkan B, (2016). *İhbari Mecburi Viral Balık Hastalıkları*. Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. <http://www.bornovavet.gov.tr/pdf/ihbarimecburi.pdf>, Erişim tarihi: 28.04.2016.
34. Kasonchandra J, Engelking HM, Lannan CN, Rohovec JS, Fryer JL, (1992). *Characteristics of three rhabdoviruses from snakehead rhabdovirus *Ophicephalus striatus**. Dis. Aquat. Org. 13, 89-94.
35. Kim R, Faisal M, (2011). *Emergence and resurgence of the viral hemorrhagic septicemia virus (Novirhabdovirus, Rhabdoviridae, Mononegavirales)*. Journal of Advanced Research. 2, 9-23.
36. Kimura T, Yoshimizu M, Gorie S, (1986). *A New Rhabdovirus Isolated in Japan from Cultured Hirame (Japanese Flounder) *Paralichthys olivaceus* and ayu *Plecoglossus altivelis**. Dis. Aquat. Org. 1, 209-217.
37. Kimura T, Yoshimizu M, Tanaka M, Sannohe H, (1981). *Studies on a New Virus (OMV) from *Oncorhynchus masou* Characteristics and Pathogenicity*. Fish Pathol. 15(3/4), 143-147.
38. Kubilay A, Nurcan N, (2009). *Gökkuşluğu (*Oncorhynchus mykiss*)'nda İnfeksiyöz Pankreatik Nekrosis (IPN) Virüsü ve Teşhis Metotları*. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Isparta.
39. Lio-po GD, Traxler GS, Albright LJ, Leano EM, (2000). *Characterization of a Virus Obtained from Snakeheads *Ophicephalus striatus* with Epizootic Ulcerativ Syndrome (EUS) in Philipinnes*. Dis. Aquat. Org. 43, 191-198.
40. M Vicenova, S Reschova, D Pokorova, J Hulova, T Vesely, (2011). *First detection of pike fry-like rhabdovirus in barbel and spring viraemia of carp virus in sturgeon and pike in aquaculture in the Czech Republic*. Dis. Aquat. Org. 95, 87-95.
41. Meyer F, Warren J, Garey T, (1983). *A guide of integrated fish health management in the great lake basin*. Bullock G. L. eds. Special publication No.83-2, Great Lakes Fishery Commission 1451 Green Road Ann Harbor, Michigan 48105. p. 170-176.
42. Michel B, Fournier G, Liefbrig F, Costes B, Vanderplassen A, (2010). *Cyprinid Herpesvirus 3*. Emerging Infect. Dis. 16, 1835-1843.
43. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ, (1999). *Veterinary Virology*. 3. Edition. Academic Press. p. 442.
44. Nguyen HD, Mekuchi T, Imura K, Nakui T, Nishizawa T, Murago K, (1994). *Occurrence of Viral Nervous Necrosis (VNN) in Hatchery-Reared Juvenile Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus**. Fisheries Sci. 60, 551-554.
45. Nicholas B. D. Phelps, Anibal G. Armien, Sunil K. Mor, Sagar M. Goyal, Janet V. Warg, R. Bhagyam, Monahan T. (2012). *Spring Viremia of Carp Virus in Minnehaha Creek, Minnesota*. J. Aquat. Anim. Health. 24, 232-237
46. Nishizawa T, Savaş H, Işidan H, Üstündağ C, Ivamoto H, Yoshimizu M, (2006). *Genotyping and pathogenicity of viral hemorrhagic septicemia virus from free-living turbot (*psetta maxima*) in a Turkish coastal area of the black sea*. Appl Environ Microbiol. 72, 2373-2378.
47. Noga JE, (2010). *Fish disease: diagnosis and treatment, Second Edition-2*. Wiley-Blackwell p. 294.
48. OIE Fish Diseases Commission, (2000). *Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases Third Edition*. Office International Des Epizooties. p. 104. Erişim tarihi: 28.04.2016.
49. OIE, (2009). *Manuel of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. Chapter 2.3.6, Erişim tarihi: 06.04.2016.
50. OIE, (2009). *Spring Viremia of Carp. Manuel of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. Chapter 2.3.8, Erişim tarihi: 06.04.2016.
51. OIE, (2012). *Oncorhynchus masou Virus Disease. Manuel of Diagnostic Tests for Aquatic Animal., Chapter 2.3.10*, Erişim tarihi: 18.04.2016.
52. OIE, (2013). *Aquatic Animal Disease Cards. 12 rue de prony 75017, Paris/France*, Erişim tarihi: 12.04.2016.
53. Özer S, (2004). *Viral hemorajik septisemi virüsü ve infeksiyöz hematopoetik nekrosis virüsünün moleküler epidemiyolojisi*. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi. 21(1-2), 173-179.
54. Plumb JA, (1986). *Channel Catfish Virus Disease*. Erişim adresi: <http://digitalcommons.unl.edu/usfwspubs/144>, Erişim tarihi: 06.11.2016.
55. Pokorova D, Vesely T, Piackova V, Reshova S, Hulova J, (2005). *Current knowledge on koi herpesvirus (KHV): a review*. Vet. Med. Czech. 50, 139-147.
56. Roberts RJ (2012). *Fish Pathology Fourth Edition*, Wiley-Blackwell. p. 279.
57. Sanders EG, DVM, Batts NW, Winton JR, (2003). *Susceptibility of zebrafish (*Danio reiro*) to a model pathogen, Spring Viremia of Carp Virus*. Comparative Medicine by the American Association for Laboratory Animal Science. 53, 514-521.
58. Sato H, Nakajima K, Maeno Y, Kamaishi T, Kamata T, Mori H, Kamei K, Takano R, Kudo K, Hara S, (2000). *Expression of YAV Proteins and Vaccination Against Viral*

- Ascites Among Cultured Juvenile Yellowtail*. Bioscience, Biotechnology, Biochemistry. 64, 1494-1499.
59. Smith KM, Lauffer MA, (1966). *Advances in Virus Research*, Academic Press Inc., 12th Edition, 111 Fifth Avenue, NY 10003. p. 83-84.
60. Sorimachi M, Huna T, (1985). *Characteristic and Pathogenicity of a Virus Isolated from Yellowtail fingerlings showing ascites*. J. Fish Pathol. 19, 231-238.
61. Thompson TM, Batts WN, Faisal M, Bowser P, Casey JW, Phillips K, Garver KA, Winton J, Kurath G. (2011). *Emergence of Viral hemorrhagic septicemia virus in the North American Great Lakes region is associated with low viral genetic diversity*. Dis. Aquat. Org. 96, 29-43.
62. Tekelioğlu N, Kumlu M, Yanar M, Erçen Z, (2007). *Türkiye'de Su Ürünleri Üretimi Sektörünün Durumu ve Sorunları*. Ulusal Su Günleri, 16-18 Mayıs, Antalya.
63. Woo PTK, Leatherland FJ, Bruno DW, eds., (2011). *Fish Diseases and Disorders Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections 2nd Edition*. CAB International. p. 281.
64. Yingjie S, Min Z, Hong L, Zhiqin Y, Xiaocong Z, Zhe W. (2011). *Analysis and characterization of the complete genomic sequence of the Chinese strain of hirame rhabdovirus*. J. Fish Dis. 34, 167-171.
65. Yin-Ka L, (2004). *Current Trend in the Study of Bacterial and Viral Fish and Shrimp Diseases*. Leung Ka Yin eds. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. p. 70-71.

Tatlı Su Balıklarının *Ichthyophthirius multifiliis* Enfeksiyonunda Aşı Çalışmaları*

Coşkun Aydın¹, Gökmen Zafer Pekmezci²

¹ Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü, Samsun

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

Geliş Tarihi / Received: 12.04.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 13.05.2017

Özet: Tatlı su balıklarında çok tehlikeli olan “Beyaz Benek Hastalığı” eski zamanlardan beri bilinmektedir. Hastalığın etkeni siliatalı bir protozoon olan *Ichthyophthirius multifiliis*’dir. Parazit doğal yaşam alanı ile kuluçkahane ve kafeslerde yetiştirilen her yaş ve boydaki tatlı su balıklarında enfeksiyona neden olur. Hastalığın Avrupa’da her yıl alabalık çiftliklerinde 140 milyon dolar zarara neden olduğu bilinmektedir. Ülkemizde hastalığın neden olduğu zararın ekonomik boyutunun ne olduğu tam olarak bilinmemektedir. Ama alabalık işletmelerin üretim potansiyellerine zarar verdiği bilinen bir gerçektir. Bu derlemede koruyucu hekimlik açısından *I. multifiliis* enfeksiyonlarında aşı yaklaşımları hakkında güncel veriler sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: *Ichthyophthirius multifiliis*, İmmunite, Aşı

Vaccination Studies on *Ichthyophthirius multifiliis* Infection in Freshwater Fishes

Abstract: The “White Spot Disease” that is a very dangerous disease in freshwater fishes has been known since ancient times. *Ichthyophthirius multifiliis* is a ciliated protozoan. Parasite causes infection in freshwater fishes of all ages and sizes grown in habitats and hatcheries and cages. It is known that the disease is causing \$ 140 million loss in trout farms every year in Europe. It is not exactly known what the economic dimension of the harm is caused by the disease in Turkey. But, it is a fact that trout farms are *damaging* to their production potential. In this review, current vaccine approaches in *I. multifiliis* infections are presented in terms of preventive medicine.

Key words: *Ichthyophthirius multifiliis*, Immunity, Vaccine

Giriş

Tatlı su ekosisteminde yaşayan balıklarda çok tehlikeli bir hastalık olan Ichthyophthiriosis çok eski zamanlardan beri bilinmektedir. Hastalığın etkeni siliatalı protozoon olan *Ichthyophthirius multifiliis*’dir. Etken Oligohymenophorea sınıfında ve *Ichthyophthirius* cinsinde yer alan tek türdür. Parazit doğal yaşam alanı ile kuluçkahane ve kafeslerde yetiştirilen her yaş ve boydaki tatlı su balıklarında enfeksiyona neden olur. Salgınlar sonucunda balıklardaki ölüm oranları %100’lere ulaşabilmektedir. Parazit solungaç filamentleri, deri ve yüzgeçlerin epidermis tabakasına penetre olur. Bu tabakada derin olarak yerleşir ve oluşan beyaz renkli veziküllerin içerisinde gelişmesine devam eder. Enfeksiyonda deri, yüzgeç ve solungaçlarda 1 mm çapına ulaşan beyaz noktalar/benekler halinde veziküler lezyonlar görülmektedir. Karakteristik

olan bu lezyonlar nedeni ile hastalık “Beyaz Benek Hastalığı” olarak isimlendirilir. Parazit kozmopolit bir türdür ve tüm dünyada yaygındır. Etken balık popülasyonlarında çeşitli faktörlerin etkisi ile salgınlara ve sonuçta ölümlere neden olmaktadır. Salgınların olmadığı zamanlarda parazit, balık popülasyonlarında hafif enfeksiyon düzeyinde persiste halde beklemektedir. Kuluçkahane ve kafes sistemlerinde kalabalık barındırma, yoğun stoklama ve stres koşulları (düşük oksijen seviyesi, su sıcaklığı, suyun kimyasal kirliliği vb.) hastalığın seyri- ni olumsuz yönde etkileyip, enfeksiyonun hızlı bir şekilde yayılmasına ve salgınların ortaya çıkmasına neden olur. Enfeksiyonun ortaya çıkmasında ve salgınlar sonucu mortalitenin şekillenmesinde su sıcaklığı çok önemlidir. Parazitin yaşam döngüsü ile su sıcaklığı arasında yakın bir ilişki bulunmaktadır. Enfeksiyon genellikle su sıcaklığının artmasına bağlı olarak özellikle ilkbahar aylarında patlak verir

*Bu derleme birinci yazarın Yüksek Lisans seminerinden özetlenmiştir.

Yazışma adresi / Correspondence: Gökmen Zafer Pekmezci (ORCID: 0000-0002-7791-1959), Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Su Ürünleri Hastalıkları AD, Samsun, Türkiye E-posta: zpekmezci@omu.edu.tr

[17, 18, 24, 26]. Avrupa'da her yıl alabalık çiftliklerinde hastalık 140 milyon dolar zarara neden olmaktadır [16]. Ülkemizde hastalığın neden olduğu ekonomik zararın boyutunun ne olduğu bilinmemekle beraber işletmelerin üretim potansiyeline zarar verdiği bilinen bir gerçektir.

Bu derlemede koruyucu hekimlik açısından *I. multifiliis* enfeksiyonlarında aşı yaklaşımları hakkında güncel veriler sunulmuştur.

İmmünite ve Antijenik Yapı

Ichthyophthirius multifiliis enfeksiyonlarında mukozal immün yanıt ile sistemik antikor yanıtı ön plana çıkmaktadır. Parazite karşı immün sistemi uyarılmış *Ictalurus punctatus*, *Cyprinus carpio* ve *Salmo gairdneri* balıklarının serum ve mukusunda bulunan antiparazitik faktörler invitro koşullarda theront ve trofontları hareketsiz (immobilize) hale getirmiş ve aglitüne etmiştir. Bu immobilizasyon aktivitesinin parazite karşı gelişen spesifik antikorlara bağlı olduğu ve antikorların parazitin membran yüzeyinde bulunan silier antijenlerine bağlanarak therontların mukus tabakasına penetrasyonlarının engellendiği görülmüştür. Hafif enfeksiyonlarda mukus immobilizasyon titresinin serum titresine göre fazla olduğu, hastalık semptomları kaybolduktan sonra serum titresinin arttığı ve bu artışın uzun bir süre yüksek kaldığı bilinmektedir. Enfeksiyon sonrası balıklarda koruyucu immün yanıt gelişmekte ve bellek B lenfositler uzun süre humoral yanıtı aktif halde tutmaktadır. Bu durum enfeksiyona karşı koruyucu aşılamanın mümkün olduğunu göstermiş ve aşılamanın geliştirilmesi yönünde büyük çaba harcanmasına katkı sağlamıştır [2, 16-18].

Ichthyophthirius multifiliis'in tüm yüzeyi membran proteinleri ile kaplıdır. Bu proteinler immobilizan antijen (i-antijen) olarak ifade edilmektedir. Balıklarda oluşan immün yanıtın birinci derece hedefi bu i-antijenlerdir. I-antijenler doğal olarak enfekte balıklarda güçlü humoral yanıtın oluşmasını sağlar [5, 13, 17, 18, 22]. *Ichthyophthirius multifiliis*'in trofont, tomont ve enfektif theront evrelerinde farklı düzeylerde i-antijenleri eksprese ettikleri bilinmektedir [1]. Suşların serotipik olarak ayrımında, parazitin yüzey immobilizan antijenlerini hareketsiz kılan suşlara spesifik antiserumlar kullanılarak 5 farklı serotip (A, B, C, D, E) identifiye edilmiştir [9,

14, 15]. Bu serotipler arasında çapraz bağışıklığın gözlenmediği ve bağışıklığın sero-spesifik olduğu bilinmektedir [31]. G5 suşunun (serotip D) en yaygın suş olup, Çin'den ABD'ne kadar yaygın olduğu bildirilmiştir. G5 suşundan sonra, G1 suşunun (serotip A) en iyi şekilde moleküler olarak karakterize edildiği ve suşun sadece Georgia (ABD) ve New York (ABD) kökenli olduğu belirtilmiştir [16-18, 22]. Parazitin G5 ve G1 suşları haricinde ARS-6, G15, NY3, NY4, NY7, Ark5, Ark7, Ark9 ve Ark10 suşları da bilinmektedir. Bu suşların orijini Amerika Birleşik Devletleri'dir [16, 25, 35].

Aşı Çalışmaları

Parazite karşı korunmada etkili aşılamanın geliştirilmesinde i-antijenlerin kodladığı proteinlerin farklılığı son derecede önemlidir. Bu nedenle *I. multifiliis*'in farklı suşlarının i-antijen genlerinin moleküler karakterizasyonları ve klonlanma çalışmaları başarılı bir şekilde yapılmıştır [12, 16, 22, 35]. *Ichthyophthirius multifiliis*'in i-antijenleri glicosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) yapısındadır. I-antijenlerin SDS-PAGE ve Western Blots analizlerinde ~37-60 kilodalton (kDa) arasında molekül ağırlığına sahip olduğu gözlenmiştir [8-11, 22, 35]. Parazitin i-antijenleri hastalıktan korunmak için potansiyel aşı adaylarıdır. G1 (serotip A) suşunun ~48 kDa, ARS-6 suşunun ~37 kDa ve G5 (serotip D) suşunun ~52/55 kDa ağırlığında i-antijenlerini eksprese ettikleri çok net olarak kanıtlanmıştır [10, 11, 22, 35]. Bugüne kadar parazitin sadece en yaygın suşu olan ABD orijinli G5 suşu ile yine ABD orijinli G1 ve ARS-6 suşlarının i-antijenlerini kodlayan gen bölgeleri klonlanmış ve moleküler karakterizasyonları yapılarak Genbank veri kayıtları girilmiştir. Klonlanan izolatlarda i-antijenlerin ekspresyonu sabit kaldığı için, bu antijenler *I. multifiliis*'in serotiplerinin/suşlarının ayrımında da kullanılmaktadır [10, 11, 14, 22, 35]. Bu suşlardan G1'in ~48 kDa ağırlığındaki protein kodlayan i-antijen gen bölgesinin (IAG48[G1]) 1329 baz ve 442 aminoasit (aa) dizilimine sahip olduğu bilinmektedir [10]. G5 suşunun ~52/55 kDa ağırlığındaki i-antijenini eksprese eden iki farklı gen bölgesi (IAG52A[G5] ve IAG52B[G5]) karakterize edilmiştir. Genbank'a AF324424 erişim numarası ile kayıtlı olan protein kodlayan IAG52A[G5] gen bölgesi 1407 baz ve 468 aa dizilimine, AF405431 erişim numarası ile

kayıtlı olan protein kodlayan IAG52B[G5] gen bölgesi 1383 baz ve 460 aa dizilimine sahiptir. Bu gen bölgelerinden 52B'nin 52A'ya göre 100 kat daha fazla transkripsiyon düzeyine sahip olduğu ispatlanmıştır [22]. Ayrıca ARS-6 suşunun Genbank'a FJ012354 erişim numarası ile kayıtlı olan ~37 kDa ağırlığındaki protein kodlayan i-antijen gen bölgesi 1358 baz ve 452 aa dizilimine sahiptir [35].

Ichthyophthirius multifiliis'in rekombinant proteinlerinin elde edilmesinde prokaryotik (bakteri) ve ökaryotik (*Tetrahymena thermophila*, memeli hücresi) hücre sistemlerinde protein ekspresyonları yapılmıştır [6, 19]. *Ichthyophthirius multifiliis* non-standart genetik kodlara sahiptir [7]. Siliatalı protozoonların (*I. multifiliis*, *Cryptocaryon irritans* vb.) glutamin aminoasitini kodlayan UAA ve UGA kodonları, diğer organizmalar (bakteri, maya vb.) tarafından terminal (stop) kodon olarak algılanır. UAA ve UGA kodonları cDNA içinde TAA ve TGA olmak üzere üçlü nükleotid dizilimleri ile kodlanır. DNA mutasyon tekniği ile TAA ve TGA dizilimlerinin, *E. coli* gibi prokaryotik sistemlerde glutamin aminoasitini kodlanması için sırası ile CAA ve CAG nükleotid dizilimlerine modifiye edilmesi gerekir [21, 23, 28]. *Ichthyophthirius multifiliis*'in dünyada en yaygın olduğu bilinen ABD orijinli G5 suşu tüm genomu sekanslanan ilk balık parazitidir. Bu genom çalışması sırasında G5 suşunda 17 adet yeni i-antijen geni tanımlenmiştir. Bu antijenik determinantların karakterize edilmesi sonucunda yeni aşı proteinlerinin elde edilebileceğini bildirilmiştir [12].

Ichthyophthirius multifiliis'in immunojen olduğu ve spesifik bağışıklık oluşturduğu bilinen bir gerçektir. Balıklarda immunizasyon denemelerinde canlı theront, inaktive theront, canlı tomit, inaktive trofont ve sonike trofontlardan natif (doğal) olarak elde edilen antijenler deneysel olarak immersiyon ve intraperitoneal yolla balıklara uygulanmış ve enfeksiyona karşı kısmi derecede koruma sağlanmıştır [3, 27, 29, 32-34]. Fakat parazitin antijenik determinantlarının gen düzeyinde moleküler olarak belirlenmesi koruyucu immun yanıt için hayati derecede önem arz etmektedir. Türkiye'de canlı theront, sonike trofont, ısı ile inaktive adjuvantlı theront aşılama Gökkuşluğu alabalıklarında *I. multifiliis*'e karşı oluşan humoral immun yanıt ve koruma düzeyleri araştırılmıştır. Araştırma sonucun-

da doğal yolla elde edilen antijenler ile balıklarda kısmi koruma şekillendiği belirlenmiştir [27]. Bu aşı denemelerinde antijenlerin (theront, trofont vb) elde edilmesinde canlı balıklar kullanılarak pasajlama yöntemlerine gidilmektedir. Bu nedenle işletmelerin üretim kapasiteleri dikkate alındığında antijenlerin hazırlanması ve inaktivasyonu için optimizasyonun sağlanmasının zor, zaman alıcı ve çok maliyet gerektirmesi nedeni ile ticari olarak lisans alması çok zordur. Bu nedenle rekombinant subunit aşılama, konvansiyonel antijenler ile hazırlanan aşılarla göre daha fazla üstünlükleri vardır. Su ürünleri sektöründe hem bakteriyel hem de viral hastalıklara karşı rekombinant proteinlerden ticari olarak üretilmiş ve sahada kullanılan rekombinant subunit aşılar bulunmaktadır [4, 16]. *Ichthyophthirius multifiliis*'e karşı bu güne kadar herhangi bir ticari aşı üretilip ruhsat almamıştır, ancak hastalığa karşı ilk ticari aşının çok yüksek ihtimalle rekombinant protein aşısı olacağı kanısı hâkimdir [16].

Rekombinant subunit protein aşılımları balıklarda immunizasyon çalışmaları yapılmıştır. İlk olarak G1 suşunun 442 aa dizilimine sahip 48 kDa'luk i-antijeninin sadece 316 bazlık küçük fragmentinin kodladığı 105 aa içeren GST-füzyon protein bölgesi (repeat I) immunizasyon için hedef seçilmiştir [20]. Bu küçük gen bölgesi primerler ile çoğaltılmış ve sonrasında klonlanmıştır. Klonlanan gen bölgesinin kodon optimizasyonu yapıldıktan sonra *E. coli* bazlı protein ekspresyon sisteminde başarılı şekilde rekombinant proteinleri elde edilmiştir. Elde edilen proteinler ile *Carassius auratus*'lar intraperitoneal yolla immunize edilmiştir. Sonrasında immunize balıkların ölümcül dozda canlı parazitler ile çelinç enfeksiyonları yapılmıştır. İmmunize balıkların kontrol grubuna göre %50' sinde yoğun enfeksiyon görülmesine rağmen, balıkların %95 oranında hayatta kaldığı görülmüştür. Araştırmacılar elde edilen rekombinant proteinin *I. multifiliis* enfeksiyonlarına karşı potansiyel aşı olarak kullanılabileceği bildirmişlerdir [20]. Başka bir çalışmada, G5 suşunun ~52/55 kDa ağırlığındaki i-antijen proteini immunizasyon denemelerinde kullanılmıştır. G5 suşunun 1407 baz ve 468 aa içeren tüm gen bölgesi karakterize edildikten sonra rekombinant proteinleri bakteriyel ekspresyon sistemlerinde başarı bir şekilde elde edilmiştir. İntraperitoneal yolla immunize edilen kanal yayın balıkları ölümcül dozda G5 therontla-

rı ile çelinç edildikten sonra, balıkların %72'sinin hayatta kaldığı görülmüştür. Araştırmacılar *I. multifiliis*'in i-antijenlerine karşı oluşan antikörlerin spesifik olduğunu ve akvaryum ile gıda değeri olan balıkların bu rekombinant antijenler ile immunize edilerek aşılanabileceğini bildirmişlerdir [6]. Bu araştırmalar ile i-antijen geninin küçük bir fragmentinin kodladığı protein ile tüm gen fragmentinin kodladığı proteinlerin balıklarda oluşturduğu koruma düzeylerinin farklı olduğu görülmektedir.

Oncorhynchus mykiss'lerde enfeksiyona karşı DNA aşı (genetik immunizasyon) çalışmaları da yapılmıştır. DNA aşı çalışmaları ile yapılan en son güncel araştırmada 52A ve 52B i-antijen ile sistein proteaz gen bölgesi plazmid vektörlerine eksprese edilmiş ve immunizasyon için plazmidler balıklara uygulanmıştır. DNA immunizasyonu sonrasında balıklarda parazite karşı zayıf antikör yanıtı alınmış ve çelinç enfeksiyonlarına karşı korunma sağlanmamıştır. DNA immunizasyonunun korunma için yeterli mukozal antikör yanıtını uyaramadığı vurgulanmıştır [30].

Sonuç olarak *I. multifiliis*'in kuluçkahane ve kafes sistemlerinde yetiştirilen Gökkuşuğu alabalıklarında salgın ve ölümlere neden olduğu bilinmektedir. Türkiye'de salgın ve ölümlere neden olan genotipler/genogruplar hakkında bugüne kadar herhangi bir araştırma yapılmamıştır. Bu yüzden Türkiye'de *I. multifiliis* saha suşlarının belirlenmesi gerekmektedir. Türkiye'de *I. multifiliis*'in genotiplerine karşı lisanslanmış herhangi bir aşı da yoktur. Bu nedenle Türkiye'de özellikle Gökkuşuğu alabalığı sektöründe rekombinant subunit *I. multifiliis* aşısına gerek duyulmaktadır.

Kaynaklar

1. Abernathy J, Xu DH, Peatman E, Kucuktas H, Klesius P, Liu Z, (2011). Gene expression profiling of a fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*: Insights into development and senescence-associated avirulence. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genom Proteomics*. 6(4), 382-392.
2. Buchmann K, Sigh J, Nielsen CV, Dalgaard M, (2001). Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *Vet Parasitol*. 100(1), 105-116.
3. Burkart MA, Clark TG, Dickerson HW, (1990). Immunization of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, against *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet): Killed versus live vaccines. *J Fish Dis*. 13(5), 401-410.
4. Clark TG, Cassidy-Hanley D, (2005). Recombinant subunit vaccines: Potentials and constraints. *Dev Biologicals*. 121, 153-163.
5. Clark TG, Dickerson HW, Gratzek JB, Findly RC, (1987). In vitro response of *Ichthyophthirius multifiliis* to sera from immune channel catfish. *J Fish Biol*. 31, 203-208.
6. Clark TG, Dickerson HW, Lin TL, (2006). Diagnostic and protective antigen gene sequences of *Ichthyophthirius*. U.S. Patent No. 7,026,156. Washington. DC: U.S. Patent and Trademark Office.
7. Clark TG, Forney J, (2003). *Free-living and parasitic ciliates*. Craig A, Sherf A, eds. *Antigenic Variation*. London. Academic Press (Elsevier Science Ltd.). p. 387-402.
8. Clark TG, Gao Y, Gaertig J, Wang X, Cheng G, (2001). The I-antigens of *Ichthyophthirius multifiliis* are GPI-anchored proteins. *J Eukaryot Microbiol*. 48(3), 332-337.
9. Clark TG, Lin T, Dickerson HW, (1995). Surface immobilization antigens of *Ichthyophthirius multifiliis*: Their role in protective immunity. *Annu Rev Fish Dis*. 5, 113-131.
10. Clark TG, Lin TL, Jackwood DA, Sherrill J, Lin Y, Dickerson HW, (1999). The gene for an abundant parasite coat protein predicts tandemly repetitive metal binding domains. *Gene*. 229(1), 91-100.
11. Clark TG, McGraw RA, Dickerson HW, (1992). Developmental expression of surface antigen genes in the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *Proc Natl Acad Sci*. 89(14), 6363-6367.
12. Coyne RS, Hannick L, Shanmugam D, Hostetler JB, Brame D, Joardar VS, Kumar U, Saier M, Wang Y, Cai H, Gu J, Mather MW, Vaidya AB, Wilkes DE, Rajagopalan V, Asai DJ, Pearson CG, Findly RC., Dickerson HW, Wu M, Martens C, Van de Peer Y, Roos DS, Cassidy-Hanley DM, Clark TG, (2011). Comparative genomics of the pathogenic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*, its free-living relatives and a host species provide insights into adoption of a parasitic lifestyle and prospects for disease control. *Genome Biol*. 12(10), R100.
13. Dickerson HW, Clark TG, Findly RC, (1989). *Ichthyophthirius multifiliis* has membrane-associated immobilization antigens. *J Protozool*. 36(2), 159-164.
14. Dickerson HW, Clark TG, Leff AA, (1993). Serotypic variation among isolates of *Ichthyophthirius multifiliis* based on immobilization. *J Eukaryot Microbiol*. 40(6), 816-820.
15. Dickerson HW, Clark TG, (1996). Immune response of fishes to ciliates. *Annu Rev Fish Dis*. 6, 107-120.
16. Dickerson HW, Findly RC, (2014). Immunity to *Ichthyophthirius* infections in fish: A synopsis. *Dev Comp Immunol*. 43(2), 290-299.
17. Dickerson HW, (2006). *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (phylum Ciliophora). Woo PTK, eds. *Fish Diseases and Disorders*. Vol. 1. Protozoan and Metazoan Infections. Second Edition. CAB International. Wallingford, UK. p. 116-153.
18. Dickerson HW, (2012). *Ichthyophthirius multifiliis*. Woo PTK, Buchmann K, eds. *Fish Parasites Pathobiology and Protection*. CABI. Wallingford, UK. p. 55-72.

19. Gaertig J, Gao Y, Tishgarten T, Clark TG, Dickerson HW, (1999). Surface display of a parasite antigen in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Nature Biotechnol.* 17, 462-465.
20. He J, Yin Z, Xu G, Gong Z, Lam TJ, Sin YM, (1997). Protection of goldfish against *Ichthyophthirius multifiliis* by immunization with a recombinant vaccine. *Aquaculture.* 158(1), 1-10.
21. Lin Q, Yang M, Huang Z, Ni W, Fu G, Guo G, Wang Z, Huang X, (2013). Cloning, expression and molecular characterization of a 14-3-3 gene from a parasitic ciliate, *Cryptocaryon irritans*. *Vet Parasitol.* 197(3), 427-435.
22. Lin Y, Lin TL, Wang CC, Wang X, Stieger K, Klopffleisch R, Clark TG, (2002). Variation in primary sequence and tandem repeat copy number among i-antigens of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Mol Biochem Parasitol.* 120(1), 93-106.
23. Lokanathan Y, Mohd-Adnan A, Wan KL, Nathan, S, (2010). Transcriptome analysis of the *Cryptocaryon irritans* to-mont stage identifies potential genes for the detection and control of cryptocaryonosis. *BMC Genom.* 11,76.
24. Lom J, Dyková I, (1992). *Protozoan parasites of fishes*. Elsevier Science Publishers.
25. MacColl E, Therkelsen MD, Sherpa T, Ellerbrock H, Johnston LA, Jariwala RH, Chang W, Gurtowski J, Schatz MC, Hossain MM, Cassidy-Hanley DM, Clark TG, Chang WJ, (2015). Molecular genetic diversity and characterization of conjugation genes in the fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Mol Phylogen Evol.* 86, 1-7.
26. Matthews RA, (2005). *Ichthyophthirius multifiliis* fouquet and ichthyophthiriosis in freshwater teleosts. *Adv Parasitol.* 59, 159-241.
27. Nemli E, (2011). *Gökkuşluğu alabalıkların (Oncorhynchus mykiss)'nda Ichthyophthirius multifiliis'e karşı bağışıklık kazandırılması üzerine denemeler*. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
28. Priya TJ, Lin YH, Wang YC, Yang CS, Chang PS, Song YL, (2012). Codon changed immobilization antigen (iAg), a potent DNA vaccine in fish against *Cryptocaryon irritans* infection. *Vaccine.* 30(5), 893-903.
29. Sin YM, Ling KH, Lam TJ, (1994). Passive transfer of protective immunity against ichthyophthiriasis from vaccinated mother to fry in tilapias, *Oreochromis aureus*. *Aquaculture.* 120(3), 229-237.
30. von Gersdorff Jørgensen L, Sigh J, Kania PW, Holtens-Andersen L, Buchmann K, Clark TG, Rasmussen JS, Jensen KE, Lorenzen N, (2012). Approaches towards DNA vaccination against a skin ciliate parasite in fish. *PLoS ONE.* 7(11), e48129.
31. Wang X, Clark TG, Noe J, Dickerson HW, (2002). Immunisation of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, with *Ichthyophthirius multifiliis* immobilisation antigens elicits serotype-specific protection. *Fish Shellfish Immunol.* 13(5), 337-350.
32. Xu DH, Klesius PH, Shelby RA, (2004). Immune responses and host protection of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), against *Ichthyophthirius multifiliis* after immunization with live theronts and sonicated trophonts. *J Fish Dis.* 27(3), 135-141.
33. Xu DH, Klesius PH, Shoemaker CA, (2009a). Effect of immunization of channel catfish with inactivated trophonts on serum and cutaneous antibody titers and survival against *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish Shellfish Immunol.* 26(4), 614-618.
34. Xu DH, Klesius PH, Shoemaker CA, (2008). Protective immunity of Nile tilapia against *Ichthyophthirius multifiliis* post-immunization with live theronts and sonicated trophonts. *Fish Shellfish Immunol.* 25(1), 124-127.
35. Xu DH, Panangala VS, Van Santen VL, Dybvig K, Abernathy JW, Klesius PH, Liu Z, Russo R, (2009b). Molecular characteristics of an immobilization antigen gene of the fish-parasitic protozoan *Ichthyophthirius multifiliis* strain ARS-6. *Aquaculture Res.* 40(16), 1884-1892.

Kemik Dokusunun Fizyolojisi

Burcu İnsal¹, İlksin Pişkin²

¹ Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı, Ankara

² Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Özet: Kemikler, hücreler arası sıvısı sert ve kalsifiye olmuş bir çatı tarafından kuşatılmış, osteoblast, osteosit ve osteoklast denilen özel hücreler tarafından meydana getirilir. Bu hücreler, hormonlar, sitokinler, büyüme faktörleri gibi yerel sinyalizasyon faktörlerinin etkisi ile farklı şekillerde bir araya gelerek kemiğin oluşumu ve büyümesini sağlarlar. Osteoblastlar, doku matriksinde kalsiyum tuzlarının birikmesiyle ossifikasyonu şekillendirir. Kemik dokunun fizyolojik ve mekanik değişimler karşısında gösterdiği tepki modellenme (modeling), normal kemik yapısının korunması ve bu değişikliklere karşı gelişen adaptasyonu ise yeniden şekillenme (remodeling) ile açıklanır. Canlı vücudunda üstlendiği görevler ve sahip olduğu özellikleri sebebiyle canlıda hem genel yapının korunması hem de meydana gelebilecek bozuklukların giderilmesi konusunda kemik dokusunun fizyolojisinin bilinmesi büyük önem taşır. Bu nedenle bu derlemede kemik dokusunun fizyolojik işlevi, yapısı, oluşumu ve büyümesi hakkında bilgilere yer verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kemik büyümesi, kemik doku, modelleme, ossifikasyon, yeniden şekillenme

Physiology of Bone Tissue

Abstract: Bones are formed by the combination of special cells called osteoblast, osteocyte and osteoclast which are surrounded by a rigid and calcified roof of intercellular fluid. These cells league together in different manners with local signalization factors such as hormones, cytokines, growth factors, and provide the formation and growth of the bone. Osteoblasts form the ossification via accumulation of calcium salts in the tissue matrix. The response of bone tissue to physiological and mechanical changes is modeling, the preservation of normal bone structure and adaptation to these changes are explained by remodeling. Due to the tasks of bone tissue in the body and the features it possesses, it is very important to know the physiology of the bone tissue in order to both protect the general structure and eliminate the pathological disorders that may occur in the living body. For this reason, this review includes information in the matter of the physiological function, structure, formation and metabolism of bone tissue.

Key Words: Bone growth, bone tissue, modeling, ossification, remodeling

Giriş

Kemik doku, hücreler arası sıvısı sert ve kalsifiye olmuş bir çatı tarafından kuşatılmış birçok mekanik ve fizyolojik işlevi olan hücresel yapıdır. Kemikler, kırıldak, ligamentler ve bağ doku ile kan damarları, lenf damarları ve sinirler bir araya gelerek iskelet sistemini oluştururlar. İskelet sistemi ve kemik dokunun vücutta oldukça önemli fizyolojik işlevleri vardır [1, 3, 24].

Kemik dokunun en önemli fonksiyonu iskeletin hareketi ve vital organların korunabilmesi için gerekli olan sertliği sağlamaktır. Kemik dokunun diğer önemli işlevleri arasında; vücuda hareket yeteneği ve destek sağlamak, kan hücrelerinin oluşumu (hematopoiesis) ve kana verilmesini sağlamak, yaygın organ disfonksiyonlarında asit-baz dengesini ayarlamak için tampon madde sağlamak, kalsiyum ve fosfor gibi mineral maddeler, büyüme faktörleri

ve sitokinler için depo görevi üstlenmek sayılabilir [2, 3, 6, 16]. Hastalığa maruz kaldığında kemik doku kendi kendini onarabilir ve değişen stres faktörlerine uyum gösterebilir [8, 9].

Taze kemik ortalama % 25 su, % 30 organik madde ve % 45 inorganik maddeden oluşur [13, 24]. Organik matriks kemiğin kuru ağırlığının % 30-35' ini oluşturur. Bunun da % 90-95' i su bazlı solüsyonlarla kaynatılınca jelatine dönüşebilen Tip I Kollajen formundadır. Kollajen olmayan önemli organik maddeler arasında ise, kondroitin sülfat, keratan sülfat, hiyaluronik asit, gibi glikozaminoglikanlar, osteonektin, osteokalsin, osteopontin, kemik sialoproteini gibi glikoproteinler, interlökin 1 ve 6 gibi sitokinler ile dönüştürücü büyüme faktör β ailesi (TGF-β), koloni uyarıcı faktörler, trombosit kaynaklı büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü 1 ve 2 gibi büyüme faktörleri bulunur [5, 10].

İnorganik matriks kemiğin kuru ağırlığının % 65' ini oluşturur. Bunun da %95' ini hidroksiapatit ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) kristalleri şeklinde bulunan kalsiyum ve fosfor iyonları oluşturmaktadır. Diğer iyonlar ise; magnezyum, sodyum, potasyum ve florürdür [3, 5, 6, 13].

Kemiğin mikroskopik yapısı ise osteoblast ve osteosit denilen destek hücreleri ile osteoklast denilen ve kemiğin yeniden şekillenmesinden sorumlu hücrelerden oluşur [13].

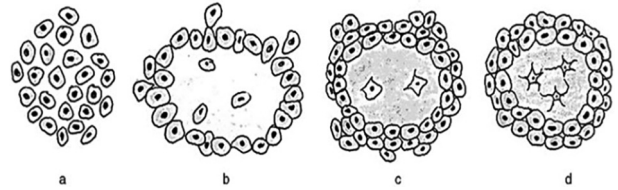
Bir kemiğin en temel birimi osteondur. Kemiğin boyuna paralel uzanan merkezsel kanallara "Havers kanalları" denir. Bu kanalların etrafını eşmerkezli (konsantrik) dairesel lameller sarar [3,6]. Lameller üzerinde osteositlerin yerleşmesi için daha geniş bir yüzey alanı oluşturan ve lakuna denilen boşluklar yer alır [5, 24].

Havers kanalı, eşmerkezli dairesel lameller ve osteositlerden oluşan bu sisteme "osteon" veya "Havers sistemi" denir. Her bir osteon, osteon kalıntısı şeklindeki ara lameller tarafından ayrılır [3, 6]. Havers Kanalları içinde, osteositler için gerekli olan, kemiğin dış yüzündeki ve kemik iligindeki kan damarlarıyla bağlantılı, kan damarları (osteonal arter), lenf damarları ve sinirler bulunur. Kemiğin boyuna dik uzanan damarlar ise Wolkman kanalları denilen boşluklara yerleşmiştir. Kemik içinde kanalikuli denilen dallanmış ince kanalıklar vardır. Osteositler birbirleriyle bu kanalıklar ağı aracılığıyla bağlantı kurarlar. Osteositlerin hücreler arası sıvısı, lakunalarda ve kanalikulilerde bulunur. Bu sıvı kan damarlarından kanalikuliler içine yayılarak osteositlerin yaşamasını sağlar. Bu sıvının iletiminin osteositlerin periyodik kasılımları ile sağlandığı düşünülmektedir [2, 15, 21, 24]. Osteositler her bir Havers sisteminin bağlantı bölgelerindeki tabakalara radial şekilde yerleşmiştir. Bir kesit alındığında, bu tabakalar bir ağacın büyüme halkaları gibi görünür [2, 5]. Eşmerkezli dairesel lameller ile ara lamellerden başka bir de iç ve dış dairesel lameller vardır. Bunlar kemiğin enine büyümesi sırasında osteblastlar tarafından oluşturulur böylece kemiğin iç ve dış yüzünü kaplar [5]. Bu sırada Havers sistemi de geliştiği için iç ve dış dairesel lamellerin Havers sistemine bakan yüzlerinde kesintili bir görünüm oluşur. Dış yüzlerinde böyle kesintili bir yapı olmadığı için bu yüzeyleri pürüzsüz bir görünüme sahiptir [24].

Kemik Oluşumu (Ossifikasyon, Osteogenesis)

Ossifikasyon, osteoblastlar tarafından kemiğin şekillendirilmesi işlemidir. Diğer bir deyişle ossifikasyon, osteoblastlar tarafından salgılanan osteoid doku matriksinde kalsiyum, fosfor ve diğer mineral maddelerin birikmesiyle gerçek kemik oluşumudur. Kalsifikasyon ise bazı dokularda kalsiyum tuzlarının birikimi olarak tanımlanır [1, 8, 20]. Temel olarak üç tip ossifikasyon çeşidi vardır [9].

İntramembranöz ossifikasyonda kemik gelişimi fibröz membranlardan olur. Birçok yassı kemik, kafatasındaki bazı kemikler, mandibula ve klavikula [13] fibröz membranlardan veya osteoid dokuyla ilintili matriksten şekillenir [8]. İntramembranöz ossifikasyonda, mezenşimal hücreler, kemiği oluşturmak için bir şablon oluşturmak üzere kümelenir ve bir ossifikasyon merkezi oluşturur. Sonra bu hücreler, osteoblastlara farklılaşır. Osteoblastlar, matriksi sertleştirmek üzere hücre dışı bileşenleri ve osteotidi salgılar. Daha sonra kemik benzeri osteoid doku asıl kemiği oluşturmak üzere kalsifiye olur. Son olarak periosteum şekillenir. Bundan sonra kemiğin devamı ise, kemiğin her iki yanından başlayarak periost tabakalarından oluşturulur (Şekil.1) [9, 13, 21].



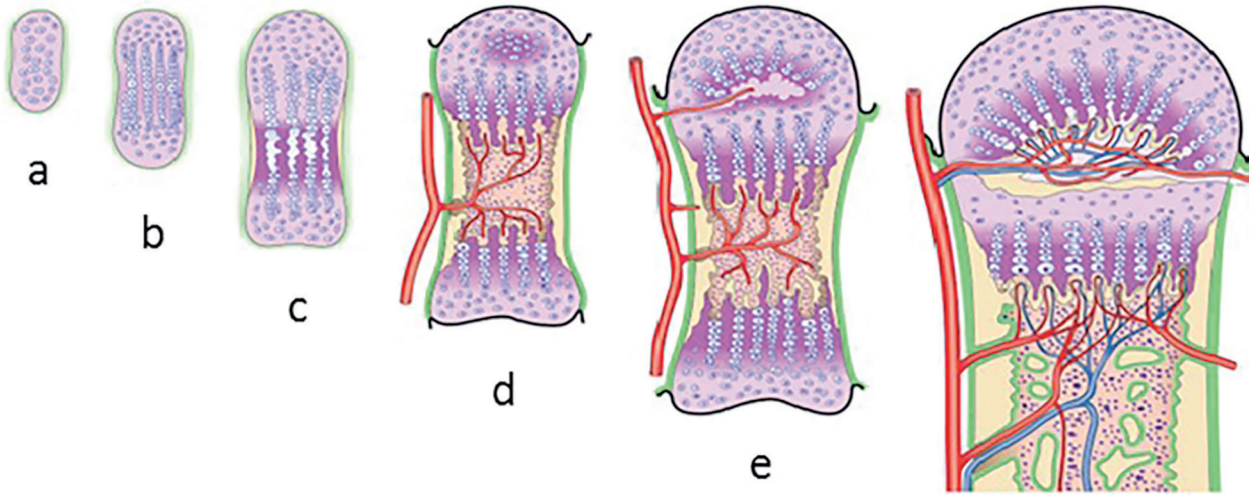
Şekil 1. İntramembranöz Ossifikasyon [13].

a. Mezenşimal hücre agregasyonu. b. Ossifikasyon merkezinin oluşumu. c. Osteoblastlar tarafından osteoid oluşumu. d. Osteoidin kalsifikasyonu ve osteoblastların osteosite dönüşümü.

Endokondral ossifikasyonda kemik gelişimi hyalin kıkırdaktan olur. Organizmadaki iskelet sistemini oluşturan, yassı kemikler, kafatası kemikleri, mandibula ve klavikular hariç çoğu kemik tamamen endokondral ossifikasyonla şekillenmektedir [1, 17, 21]. Embriyoda fertilizasyondan sonra ossifikasyonun başlama süresi hayvan türlerine göre farklılık gösterir. Bu süreden önce, fibröz membranlar ve hyalin kıkırdaktan oluşan embriyonik iskelette aksiyel ve apendiküler iskeletin neredeyse tamamı endokondral ossifikasyon ile gelişirken, kraniyofasiyal iskelet ise doğrudan intramembranöz

ossifikasyon ile gelişir [22]. Endokondral ossifikasyon fetusta gerçekleşir ancak doğumdan sonra da, metafiz ve epifiz arasında bulunan kıkırdak tabakadan ve korteksi saran perikondriumdan devam eder. Doğumdan sonraki dönemde uzun kemiklerin çoğu bu şekilde gelişir [24]. Endokondral ossifikasyonda, mezenşimal hücrelerin göçü ve kümeleşmesi (Şekil.2.a) intramembranöz ossifikasyona benzer. Ancak, bu hücreler farklı olarak kıkırdak matriksi yapacak ve osteoblastların yerine geçecek olan kondrablastlara dönüşür [1]. Uzun, kısa ve düzensiz kemiklerin embriyonik modelleri, ilk olarak, yoğun fibröz bağ doku kütesidir. Mezenşimal kök hücrelerden farklılaşan kondrositler bu fibröz bağ doku modeliyle yer değiştirip hyalin kıkırdak matriksi kalıbını (Şekil.2.b) oluşturmaya başlar. Uzun kemiğin orta bölgesinde (diafiz merkezinde), gelişen

bu kemikleşme merkezine “primer ossifikasyon merkezi” denir (Şekil.2.c). Daha sonra uzun kemiklerin uçlarına yakın kısımlarda (epifiz) gelişen ossifikasyon merkezlerine ise “sekonder ossifikasyon merkezleri” denir (Şekil.2.e) [8, 17]. Bu tür bölgelerde bir taraftan perikondriumdaki mezenşimal kök hücreler osteoblastlara farklılaşırken, bir taraftan da kompleks gelişimsel sinyallerle, matrikste hipertrofik kondrositler de farklılaşır ve kalsifikasyon başlar [22]. Bu kalsifikasyon, matriks içinden besinlerin difüzyonunu engeller, bunun sonucunda kondrositler ölür. Böylece osteoblast, osteoklast ve daha sonra kemik iliğini şekillendirecek olan hematopoetik hücrelerin öncüllerini taşıyan kan damarlarının bölgeye penetre olmasına izin verecek şekilde, diafiz üzerinde kaviterler (boşluklar) açılır (Şekil.2) [1, 13].



Şekil 2. Endokondral Ossifikasyon (Adams'ın çiziminden uyarlanmıştır) [21].

a. Osteoprojenitor hücre agregasyonu. b. Hyalin kıkırdak kalıbının oluşumu. c. Primer ossifikasyon merkezinin oluşumu. d. Kan damarlarının penetrasyonu. e. Sekonder ossifikasyon merkezlerinin oluşumu. f. Gelişmiş tam bir kemik yapısı.

Osteoblast ve osteoklastlar kalsifiye kıkırdak matriksini süngerimsi kemiğe dönüştürürken, kan damarları bu boşluklardan içeri akın ederler. Sonra osteoklastlar süngerimsi kemiğin bir kısmını, diafiz içinde, kemik iliği veya medullar kavitenin oluşması için bozar Ardından kemiğin çevresinde, yoğun, düzensiz, bağ dokudan bir periosteum şekillenir. Bu şekilde birkaç farklı ossifikasyon merkezi genişleyip yayılır ve en sonunda, periosteuma sahip, spongiyöz kemiği olan ve içindeki boşlukta kemik iliği bulunan tam bir kemik yapısı (Şekil.2.f) olgunlaşır [13, 21].

Heteroplastik ossifikasyon ise iskelet sistemi dışında herhangi bir doku içinde gerçekleşen kemikleşmedir. Bu tür kemikleşmeye bazı hayvanlardaki os penis ve sığır kalbindeki ossa cordis oluşumu örneklerdir [13, 24].

Kemik Büyümesi

Kemik büyümesi canlının içinde bulunduğu fizyolojik süreç göz önünde bulundurulmak üzere iki farklı şekilde açıklanır. Kemiklerin yaşam boyu fizyolojik etkilere ve biyomekanik kuvvetlere karşı kademeleli olarak gösterdiği tepki sonucu şekil değiştirmesi

“modellenme” (şekillenme, modeling) olarak tanımlanır [6, 13]. Fötal yaşamda iskelet oluştuktan sonraki dönemden itibaren tüm yetişkinlik boyunca, normal yapının korunması ile eski ve mikro düzeyde hasar gören kemiklerin uzaklaştırılması ve yerine yenisinin yapılması için kemik dokuda yıkım ve yapım olaylarının dengeli bir şekilde devam etmesi durumu ise “yeniden şekillenme” (remodeling) olarak adlandırılır [7, 13, 19]. Erişkinlikten önceki dönemde kemik büyümesi, metabolik aktivitenin yıkımdan daha çok yapım tarafında kalmasının sonucudur. Yetişkinlerde normal kemik yapının devamı için osteoklastik ve osteoblastik aktivite denge halinde olmalıdır [7].

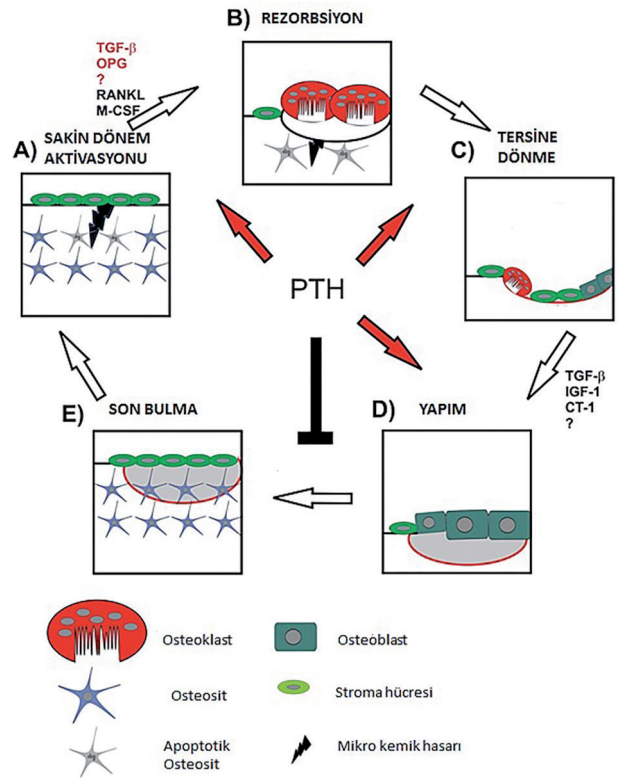
Modellenme işleminin bir parçası olan kemiğin boyuna büyümesi, epifiz plağında gerçekleşir. Boyuna büyüme, kırıkdağın interstisyel büyümesi ve alttan kemik dokunun endokondral yolla eklenmesi ile sağlanır. Kemiğin çapındaki büyüme (enine kalınlaşma) ise periosteumdaki osteoblastik aktivite ve apozisyonel mekanizma (mevcut kemik dokusu üzerine depolanma) sayesinde, periosteumun altına yeni kemik eklenmesiyle sağlanır [6, 21, 24]. Periosteum, osteojenik tabakayı sağlar ve tekrarlayan üremeler ile oluşan kemik doku, kemiğin boyuna uzaması sırasında oluşan Havers sistemleri arasındaki boşlukları doldurur. Aynı apozisyonel büyüme süreci endosteum kaynaklı olarak kemiğin gövdesinin iç yüzünde de gerçekleşir. Periosteum ve endosteumdan kaynaklanan kemik doku iç ve dış dairesel lamelleri oluşturur [24].

Gelişme çağına meydana gelen kemik modellenmesi ve erişkin çağda başlayıp yaşam boyu devam eden yeniden şekillenme olayları osteoblastların ve osteoklastların eşgüdümlü olarak çalışmaları ile olur [14, 16]. Yetişkin olgun bir iskelette kemikler yılda yaklaşık %10 oranında kayba uğrar, buna rağmen total hacim sabittir [3]. Yeniden şekillenme iki temel hücre aktivitesiyle sağlanmaktadır. Osteoblastlar, osteoblastik osteoid oluşumu ile yeni kemik matriksini salgılamak, dalak ve karaciğerdeki projenitör hücrelerden türeyen osteoklast öncülleri ise yeni oluşan trabeküller arasındaki kan damarlarından çekilerek “osteoklast delgisi (cutting cone)” denilen kemik yıkımını sağlar [3, 4]. Kararlı durumdaki bir kemikte osteoblastik ve osteoklastik aktivite denge halinde olmalıdır. Aksi takdirde, inflamasyonlar büyüme faktörleri ve hormonlarda-

ki değişikliklere bağlı olarak gelişen osteoklast ve osteoblast aktiviteleri arasındaki dengesizlikler, kemik kütlelerinin artması (osteopetroz) veya azalması (osteoporoz) ile karakterize iskelet anormalliklerine sebep olabilir [14].

Kemiğin yeniden şekillenmesi birbirini izleyen aşamalardan oluşan bir döngü şeklindedir [3, 11, 19]. Bu döngü, osteoklastların, RANKL (receptor activator of NF-KB ligand), osteoprotegrin (OPG), IL-1, IL-6, M-CSF (monosit colony-stimulating factor), paratiroid hormon, 1,25-dihidroksivitamin D ve kalsitonin tarafından uyarılmasıyla gerçekleşir (Şekil.3) [6].

Sessiz (sakin) bir kemikte aktivasyon işlemi, kemik iliğindeki öncül hücrelerin, kemikten ayrılıp çok çekirdekli, dirençli ve kemik yüzeylerine tutunan osteoklastlara farklılaşmasıyla başlar. Yeniden modellenmenin bu ilk aşaması “sakin dönem” olarak adlandırılır [3, 23].



Şekil 3. Kemiğin yeniden şekillenme döngüsü [11].

Ardından yerel sitokinler ve hormonların etkisiyle osteoklastik aktivite artar ve “rezorbsiyon dönemi” başlar [3, 10]. Osteoklastlar trabeküler kemiğin yüzeyine tutunurlar. Kemiğin organik mat-

riksi osteoklastlar tarafından salgılanan lizozomal enzimler olan hidrojen fosfataz, kollajenaz ve diğer proteolitik enzimlerle yıkımlanır ve hidrojen iyon salınımının (düşük pH' da matriks kristal içeriği bozulur) bir sonucu olarak mineral matriks azalır. Bu aşama yaklaşık 2 hafta kadar sürer [3, 10, 18, 19]. Kemik matriksinin yıkımlanmasıyla kemik matriksi içinde düzensiz yapıda Howship boşlukları ve Havers kanalları şekillenir. Bu kavitelere gelmek üzere kendi öncül hücrelerinden gelişen osteoblastlar aktive edilir. Aktive olan osteoblastlar, kemik yıkımlanması sonucu açığa çıkan sitokinlerin salgılandığı bölgelerde toplanırlar. Bu aşamadan sonra artık osteoblastik aktivite yani kemik yapımı başlar ki bu aşamaya ise “tersine dönme” denir [3, 19]. Bu evre osteoklastların apoptozisi ile sonuçlanır. Bu aşamanın ardından mezenşimal öncüllerinden farklılaşan osteoblastların, mineralizasyonu kontrol etmek ve organik matriks oluşturmak üzere, osteoid sentezleyerek yeni kemik dokusunun oluşmasını sağladığı dönem olan “yapım dönemi” başlar [3, 19]. Kemik yapımının tamamlanması yaklaşık 4-6 ay alır [6]. Osteositler tarafından kontrol edilen, bütün işlemlerin sonlandığı ve normal bir kemik formunun tamamen şekillendiği dönem ise “son bulma” olarak adlandırılır [3, 11, 18].

Kemiklerin yeniden şekillenmesinin moleküler kontrolü yaygın olarak çalışılmıştır ve sistemik düzenlenmenin, başta paratiroid hormon ve kalsitriol olmak üzere, büyüme hormonu, glikokortikoidler, tiroid hormonları, prolaktin ve cinsiyet hormonları gibi hormonlar, yerel faktörler ve sitokinler tarafından kontrol edildiği iyi bilinmektedir [10, 14, 16, 19]. Henriksen ve ark. na [11] göre, son zamanlardaki yapılan çalışmalar, kemiğin yeniden şekillenmesinde, daha az bilinen ve oldukça önemli olan yerel sinyalizasyonun, kemik hücreleri arasında doğrudan oluştuğunu göstermektedir. Buna ek olarak, yerel kemik hücreleri arasındaki sinyalizasyon gibi, sempatik sinir sistemi, immun sistem, hematopoetik kök hücreler, damarlar ve hatta eklem kıkırdağının hücreleri de kemik yapımını kontrol eder [12, 19].

Kaynaklar

1. Akers RM, Denbow DM, (2008). Anatomy and physiology of domestic animals. First edition. p. 133-143.
2. Bassert JM, Colville T, (2002). Clinical anatomy and physiology for veterinary technicians. p. 95-118.
3. Bayliss L, Mahoney DJ, Monk P, (2012). Normal bone physiology, remodeling and its hormonal regulation. *Surgery*. 30(2), 47-53.
4. Boyce BF, Xing L, (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 473.139-146
5. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R, (2010). Bone biology. *J Bone Joint Surg Am*. 77.1256-1275.
6. Clarke B, (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 3. 131-139.
7. Çayır F, (2011). Osseointegrasyon. Doktora Tezi. EÜ Diş Hekimliği Fakültesi, İzmir.
8. Fails AD, Fradson RD, Wilke WL, (2009). Anatomy and physiology of farm animals. Seventh edition. p.59-85.
9. Fradson RD, Spurgeon TL, (1992). Anatomy and Physiology of Farm Animals. Fifth edition. p. 55-81.
10. Hadjidakis JD, Androulakis II, (2006). Bone remodeling. *Ann NY Acad Sci* 1092. 385-396
11. Henriksen K, Neutsky-Wulff AAV, Bonewald LF, Karsdal MA, (2009). Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone*. 44. 1026-33
12. Iain HK, (2001). Principles of bone healing. *Neurosurg Focus* 10(4). 1-4.
13. Kini U, Nandeesh BN, (2012). Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. Fogelman I. et al. eds. *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*. Springer Press. Berlin-Heidelberg p.30-55.
14. Kong YY, William JB, Penninger MJ, (2010). Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today*. 21(10). 495-502.
15. Lanyon LE, (1993). Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int*. 53. 102-107.
16. Leibbrandt A, Penninger JM, (2008). RANK/RANKL: Regulators of immune responses and bone physiology. *Ann NY Acad Sci*. 1143. 123-150.
17. Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M, (2007). Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *J Biocel*. 40. 46-62.
18. Raggatt LJ, Partridge NC, (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *JBC Papers*. 285. 25103-25108.
19. Raisz LG, (1999). Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem*. 45(8). 1353-1358.
20. Rauch F, Schoenau E, (2002). Skeletal development in premature infants: a review of bone physiology beyond nutritional aspects. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 86. 82-85.
21. Standring S. (2016). *Gray's anatomy: The anatomical basis of clinical practice*. Forty-first edition. Elsevier press. p. 81-123.
22. Vortkampa A, Pathia S, Perettib GM, Enzo M. Carusob EM, David J. Zaleskeb DJ, Tabin CJ, (1998). Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during post-natal growth and in fracture repair. *Mech Dev*. 71. 65-76.
23. Watts NB, (1999). Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. *Clin Chem*. 45(8). 1359-1368.
24. William OR. (2009). *Functional anatomy and physiology of domestic animals*. Fourth edition. p. 179-198.

Akut Tolüen Maruziyetinin Tavşan Beyin Korteksinde Yol Açığı Toksik Etkiler

Mustafa Çiçek¹, Turgay řıřman²

¹ Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi AD.

² Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji AD.

Geliş Tarihi / Received: 02.11.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 31.12.2016

Özet: Bu çalışmada yüksek dozda tolüenin tavşan beyin korteksi üzerine akut dönemdeki histopatolojik ve biyokimyasal etkilerinin araştırılması amaçlandı. On yedi adet Yeni Zelanda cinsi tavşan (4-6 kg) iki guruba ayrıldı. Grup I kontrol grubu (n=7) olarak kullanılırken Grup II'ye (n=10) yüksek doz Tolüen verildi (876 mg/kg/ip). Üç saatlik deney periyodunun sonunda öldürülen hayvanlardan biyokimyasal analizler için kan serumu ve beyin doku örnekleri % 10'luk nötral formaline alınıp parafine gömülerek kesildi (5 µm). H&E (hematoksilen-eozin), Crystal violet boyamaları, Na, K, GSH, MDA ve NO kan serum seviyeleri analiz edildi. Bu çalışma sonucunda Tolüen verilen tavşanlarda önemli ölçüde histopatolojik bozukluklar ve ciddi amiloit plak oluşumu gözlemlenmiştir. Tolüen grubunda Na, K, MDA, kan serumu seviyelerinde önemli ölçüde artış görülmüşken, GSH ve NO seviyelerinde anlamlı derecede azalma izlenmiştir. Bu çalışma sonucunda yüksek doz tolüenin beyin korteksinde akut dönemde ciddi hasarlar oluşturabileceği gösterilmiştir.

Anahtar sözcükler: Tolüen, oksidatif hasar, beyin korteksi, tavşan ve amyloid plak.

Toxic Effects That Induced Acute Toluene Exposure In Rabbit Brain Cortex

Abstract: This study aimed to investigate the histopathological and biochemical effect of high dose Toluene on brain cortex in acute period of Toluene treated rabbits. Seventeen adult female New Zealand rabbits (4-6 kg) were divided into two groups. Group I was used as a control group (n=7), while Group II was exposed to high dose of Toluene (876 mg/kg/ip) (n=10). After the 3 hours experimental period, blood serum for biochemistry analyses and brain tissues were taken from sacrificed animals and fixed in % 10 neutral formalin, then, embedded in paraffin and sectioned (thickness, 5 µm). H & E (hematoxylin-eosin), Crystal violet dyes, Na, K, GSH, MDA and NO blood serum levels were analyzed. In this study, significant histopathological abnormalities and severe amyloid plaque formation was observed given the Toluene in rabbits. While Na, K, MDA blood serum levels significantly increase have been observed in the Toluene group, GSH and NO levels considerable have been decreased in the control group. As a result of this study showed that the high doses of Toluene in the cerebral cortex to cause serious damage in the acute phase.

Key words: Toluene, oxidative stress, brain cortex, rabbits and amyloid plaque.

Giriş

Tolüen özellikle boya ve kozmetik sanayinde yaygın olarak kullanılan, hoş kokulu, uçucu bir sıvı hidrokarbondur [16,21,30]. Tolüenin öfori yapıcı etkisinden dolayı bağımlılığına toplumda sık rastlanılmaktadır. [6]. Ucuz ve kolay bulunabilir olduğundan dolayı bağımlıların tercihi sıklıkla tutkal ve tinerdir [32]. Özellikle boyacılar [37], ayakkabı işçileri [14,35], ve matbaa işçilerinde [19] mesleki maruziyet sık görülmektedir. Tolüen başlıca solunum, sindirim ve deri yoluyla vücuda alınabilir. Vücutta çoğunlukla iyi kanlanan ve yağdan zengin dokularda birikir [1,5]. Tutkal soluyarak ölen kişilerin karaciğer ve beyinde yüksek oranda tolüene

rastlanmıştır. Vücuda alınan tolüenin büyük bir kısmı karaciğerde yıkılıp hippürik aside dönüştürülerek idrar yolu ile atılır [14]. Tolüen doz ve süreye bağlı olarak baş ağrısından ölüme kadar birçok klinik tabloya yol açabilir [5,30]. Yüksek dozda tolüene maruziyet genelde çalışanlarda ve bağımlılarda görülür [16,35,37]. Yüksek dozda meydana gelen zehirlenmeler üzerindeki araştırmalar daha çok akut entoksikasyon vakalarının değerlendirilmesine bağlı çalışmalar [4,34]. Tolüen sinir dokusunda daha fazla biriktiğinden çalışmalar daha çok sinir sistemi üzerine yoğunlaşmış ve uzun dönemde sinir sistemi üzerindeki kronik etkileri daha çok araştırılmıştır [7,22].

Yaptığımız bu çalışmada genelde kronik olarak maruz kalınan Tolüen'in beyin korteksi üzerine akut etkilerini histopatolojik ve biyokimyasal metotlarla araştırmayı amaçladık. Tavşanlar üzerinde ve akut yüksek dozlarda bu konularda sınırlı sayıda çalışma bulunması bizim çalışmamızın önemini artırmaktadır. Tolüen'in hem sanayide yoğun kullanılan bir madde olması hem de özellikle çocuk ve gençlerde olmak üzere kasıtlı ve özellikle intihar vakalarında sık kullanımı nedeniyle sağlık üzerine etkisi son derece önemlidir. Bu prensip doğrultusunda yapılan çalışmada Tolüen kullanımına bağlı biyokimyasal dejenerasyonun ve histopatolojinin organizma sağlığı açısından önemli ve ciddi derecede değişiklikler gösterdiği belirtilmiştir.

Bu amaç doğrultusunda çalışmamızda, yüksek doz tolüenin tavşan beyin korteksi dokusunda akut dönemde meydana getirebileceği toksik etkilerin histopatolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirilmesi amaçlandı.

Materyal ve Metod

Çalışmamız yerel etik kurul izni (HADYEK-51) alındıktan sonra Gaziosmanpaşa Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırmaları Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi. Hayvanlar Grup I kontrol grubu (n=7) ve Grup II Tolüen grubu (n=10) olarak tanzim edildi. Tolüen grubundaki deneklere tek doz 876 mg/kg intraperitoneal (ip) tolüen verildi. Bu doza önceki çalışmalardan esinlenerek karar verildi [22,30]. Deney hayvanları doz verildikten 3 saat sonra ketamin ve xylazin anestezisi altında bazal kan alınarak eksanguinasyon yöntemi ile öldürüldü. Alınan kanlar santrifüj edildikten sonra serumları ayrılarak - 80 C°'de saklandı. Beyin dokuları çıkarılarak bouin solüsyonu içerisine alındı.

Deney hayvanlarından alınan beyin dokularının rutin doku takipleri yapılarak parafin bloklara gömülmesi sağlandıktan sonra bloklardan mikrotom ile 5µm kalınlığında kesitler alındı. Standart Hematoksilen&Eozin boyaması gerçekleştirildi. Boyanan preparatlar Olympus BX-50 araştırma mikroskopunda incelendi. Deney hayvanlarından alınan kan serum numunelerinde Na, K, MDA, GSH ve NO seviyelerinin tespiti için spektrofotometrik yöntemler ile ölçümler yapıldı.

Normallik denetimi Shapiro-Wilk testi ile gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılıma uygun olduğu görüldü. İstatistiksel anlamlılık p<0,05 olarak kabul edildi. Grupların karşılaştırılmasında bağımsız iki örnek T testi kullanıldı.

Bulgular

Klinik Bulgular

Deneysel araştırmamızda Tolüen verdiğimiz tavşanlarda kontrol grubundan farklı bir şekilde makroskobik olarak pupillerde büyüme, kusma, bazı hayvanların ağız ve burun bölgelerinde kanama ve ayakta dengede duramama gibi postür bozuklukları gözlemlenmiştir.

Biyokimyasal Bulgular

Gruplara ait kan serum örneklerinde, spektrofotometrik olarak Na, K, NO, GSH ve MDA değerleri Tablo 1'deki gibidir. Buna göre oksidatif hasarı belirlemede önemli bir parametre ve kanda lipid peroksidasyonun bir göstergesi olan MDA düzeylerinin, tolüen uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi (p<0,05). Antioksidan ve oksidatif hasarı düşürerek koruyucu ve düzenleyici etkisi olan NO ve GSH düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığı bulundu (p <0,05). Tolüene maruz bırakılan hayvanlarda serum Na ve K düzeylerinin kontrol grubuna oranla oldukça yüksek olduğu, bu yüksekliğin istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlendi (p <0,05).

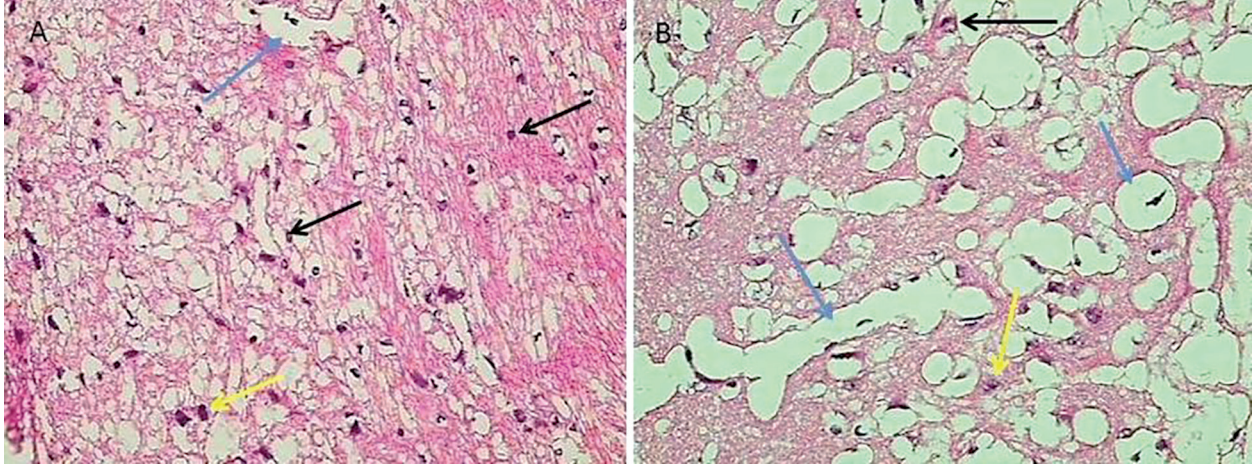
Tablo 1. Tolüen ve kontrol grubu kan serum örneklerindeki Na, K, NO, GSH ve MDA değerleri

	Grup		t	p
	Tolüen	Kontrol		
	$\bar{x}\pm SH$	$\bar{x}\pm SH$		
NO (µmol/L)	4091,40±182,79	5854,00±223,41	17,880	0,001
MDA(µmol/L)	484,90±56,07	345,86±42,10	5,538	0,001
Na (mmol/L)	172,70±13,42	139,29±3,82	6,355	0,001
K (mmol/L)	678,70±64,76	560,57±83,05	3,300	0,005
GSH(µmol/L)	7791,20±630,26	11403,00±887,00	9,855	0,001

Çalışmamızın biyokimyasal bölümünden elde ettiğimiz sonuçlara göre tolüen tavşanlarda oksidatif hasara yol açar ve vücut sıvısı elektrolit dengesini bozar (Tablo 1)(p<0,05).

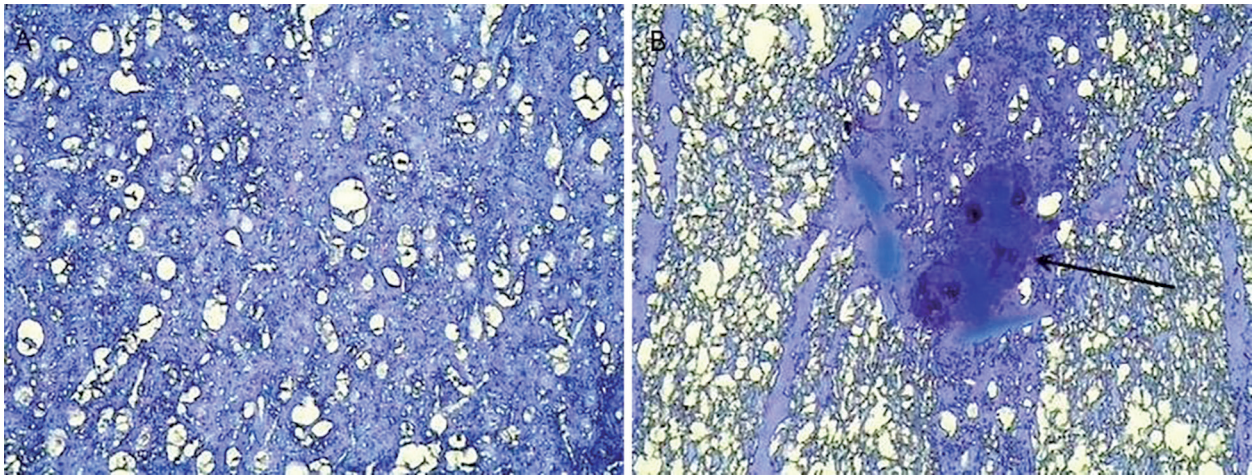
Histopatolojik Bulgular

Hematoksilen-Eozin ile boyanan preparatlar incelendiğinde, kontrol grubu beyin korteksi dokularının normal yapıda olduğu gözlemlendi (Şekil 1A). Tolüen verilen tavşanlarda ise beyin korteksinde fokal vakuoller dejenerasyon, gliozis, perivasküler demiyelinizasyon, çok sayıda piknotik hücre ve nekroz alanları izlendi. Tolüen grubunda kontrol grubuna oranla belirgin derecede kan damarlarında aşırı genişlemeler ve hücreler arasındaki hücre hatlarının ciddi ölçüde dejenerasyona uğradığı hücre sınırlarının neredeyse dağıldığı görülmektedir (Şekil 1B).



Şekil 1: Yüksek doz akut Tolüen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin gösterimi H&E boyama

*A) Kontrol grubu, beyin korteksi, H&E (x40) B) Tolüen grubu, beyin korteksi, H&E (x40) (Oklarda gösterilen histomorfolojik değişiklikler; abseleşme(siyah ok), kan damarlarında hasar(mavi ok), gliozis ve hücre sınırlarında belirgin kayıplar(sarı ok))



Şekil 2. Tolüen maruziyetinin Kristal Viyolet boyanmasında senil ve amiloit plakların oluşumu 40X büyütme

*A) Kontrol Grubu Beyin Korteksi B) Tolüen Grubu Beyin Korteksi

Kristal violet boyama yapılmış kesitler incelendiğinde kontrol grubunda spesifik bir boyanma gözlemlenmedi (Şekil 2A). Tolüen grubunda ki kesitler incelendiğinde ise boyanma yoğunluğunda belirgin bir artış olduğu ve Senil plakların büyüklüklerinin ve sayısının arttığı fark edildi. Nöronların hücre

gövdelerinin ve uzantılarının etrafında amiloit plakların depolandığı ve bu alanların genişleyerek senil plakları oluşturduğu gözlemlendi. Beyin korteksinin üst tabakasında daha az, alt tabakasında ise daha yoğun diffüz amiloit plak izlendi (Şekil 2B).

Tartışma ve Sonuç

Tolüen hayatın birçok alanında kullanılan ve oldukça sık karşılaşılan bir maddedir. Evde ve endüstride sayısız yerde kullanılması ile bağımlılık yapıcı bir madde olması ve istenildiğinde kolaylıkla temin edilebilmesi nedeniyle de popülasyonun önemli bir bölümünü etkileyen, diğer organik solventlerden farklı olarak özel bir öneme sahiptir [16,21,30]. Tolüenin özellikle santral sinir sistemi ve karaciğer başta olmak üzere birçok doku üzerinde toksik etkilerinin olduğunu kanıtlayan bir çok bilimsel araştırma bulunmaktadır [32]. Tolüene maruz kalan insan ve hayvanlarda ilk etki santral sinir sistemi depresyonudur. Yüksek konsantrasyonlarda diğer uçucu maddelerle benzer olarak psikomotor hasarlanma, lokomotor aktivitelerde eksitasyon ve daha sonrada inhibisyon, ayakta durma refleksinin kaybolması ve sedasyon gibi etkileri vardır [14,35,37]. Tolüen bu etkileri gabaerjik, glutamaterjik, serotonerjik, dopaminerjik yolları etkileyerek yapar [6,8]. Tolüen lipofilik özelliğinden dolayı hücre duvarındaki lipid yapısını değiştirir ve proteinlerle etkileşime girer. Akut dozlarda Na/K-ATPaz aktivitesini önemli oranda artırarak membran akışkanlığını artırır [9]. Deneysel araştırmamızda Tolüen verdiğimiz tavşanlarda 2-3 üncü saatler arasında hayvanlarda makroskobik olarak pupillerde büyüme, kusma, bazı hayvanların ağız ve burun bölgelerinde kanama ve ayakta dengede duramama gibi postür bozuklukları gözlemlenmiştir. Çalışmamızda serum sodyum ve potasyum değerlerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur.

Lipid peroksidasyonu, hücre zarındaki fosfolipidlerde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ve bu nedenle hücre zarındaki lipid yapısında meydana gelen değişiklikler ile hücrenin yapısını ve fonksiyonlarının bozulmasıdır [36]. Serbest radikallerin zardaki doymamış yağ asitlerini etkileyerek bir kimyasal zincir tepkimesi ile başlayıp radikaller için devamlı bir kaynak oluşturarak hücre zarına geri dönüşümü olmayan bir hasar oluşturur [11,28]. Bir çok çalışmada, Tolüen maruziyetin doku, eritrosit ve plazma MDA seviyelerini arttırdığı rapor edilmiştir [15, 20, 23, 38]. Çalışmamızda Tolüen grubunun MDA seviyeleri kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar reaktif oksijen türleri oluşumunun çok fazla olduğunu, serbest radikaller-

le antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozularak oksidatif strese ve oksidatif hasara yol açtığını göstermektedir. Bu nedenle lipid peroksidasyonun en önemli ürünü olan MDA düzeylerinde artışa neden olduğunu düşündürmektedir.

Nitrik oksit suda ve yağda çözünebilir, organizmada vazoregulasyon ve hücrel toksisiteyi gösteren, kan ve endotel hücreleri arasında oluşan etkileşimin düzenlenmesinden sorumlu, antioksidan ve oksidatif hasarı azaltan biyolojik koruyucu ve düzenleyici bir moleküldür [25,26,31]. Çeşitli çalışmalarda, Tolüenin kan yoluyla tüm vücuda yayıldığı ve dokularda birikerek serbest radikal oluşumunu arttırmış antioksidan seviyelerini ise azaltmışlardır [2,27]. Bizim çalışmamızda ise paralel bir şekilde Tolüene maruz bırakılan deneklerin plazma NO seviyeleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde azalma göstermiştir.

Glutasyon, tripeptit yapısında olan ve vücuttaki birçok hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksidan maddelere karşı koruyan bir moleküldür [10]. Glutasyon DNA'nın sentezinde, hasarlı parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikallerin muhtemel hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır [12]. Park ve ark. (2006) çalışmalarında organik çözücü ve sigaraya maruz kalan bir vücutta serbest radikal ve reaktif oksijen türlerinin artarak kanser gibi hastalıklara sebep olduklarını, glutasyon gibi antioksidan maddelerinde vücut dokularında biriken bu serbest radikallere karşı koyarak toksik olan bu maddeleri zararsız hale getirdiklerini ve bu yüzden antioksidanların konsantrasyonlarında azalma meydana geldiğini göstermişlerdir [33,34]. Çalışmamızda da, elde ettiğimiz Tolüen grubunun serum glutasyon miktarının kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azalmış olması bu duruma paralellik göstermektedir. Ayrıca süperoksit radikalinden daha zayıf etkili olan hidrojen peroksit, dokularda bulunan glutasyon enzimi ile su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz hale getirilmesi gerekirken glutasyon konsantrasyonlarında ki bu azalma oksidatif hasara neden olduğunu düşündürmektedir.

Araştırmamızda yapmış olduğumuz hematoksilen-eozin boyamaları sonucunda, kontrol grubu beyin korteksi dokularının normal yapıda olduğu gözlenmektedir. Tolüen verilen tavşanlarda beyin

korteksinde fokal vakuoler dejenerasyon, gliozis, perivasküler demiyelinizasyon, çok sayıda piknotik hücre ve nekroz alanları izlenmektedir. Tolüen grubunda kontrol grubuna oranla kan damarlarında aşırı genişlemeler ve hücreler arasında kompenzasyonun ciddi ölçüde dejenerasyona uğradığı hücre sınırlarının nerdeyse tamaen gözden silindiği görülmektedir.

Senil plaklar; dejenere nöronal uzantılar, reaktif glial hücreler ve peptidlerden meydana gelen komplice lezyonlardır. Başlangıçta nöron gövdeleri ve uzantıları etrafında diffüz amiloit birikir. Ardından bu maddelerin birikimi yoğunlaşarak ve genişleyerek senil plakları oluşturur [3]. Çalışmamızda tolüen verilen grupta amiloit proteinlerinin senil plaklarda belirgin şekilde biriktiğini göstermektedir. Histokimyasal olarak tolüen verilen grupta amiloit proteinlerinin birikimine bağlı olarak boyanma yoğunluğu ve boyanan alanların büyüklüğünde ve sayısında artış olmaktadır. Amyloid plak oluşumu Alzheimer hastalığının ilk patolojik olayı olup nöritik plak oluşumuyla sonuçlanabilmektedir. Amyloid plaklar serebrumda bulunan arteriollerde birikerek amyloid anjiyopati oluşturmaktadır. Alzheimer hastalarında serebrumda bulunan meningeal arteriollerde amyloid plak gözlemlenmiştir [17,18,29].

Amiloit birikiminin Alzheimer' a neden olabileceği konusunda yapılan bir çalışma da amiloit birikimi olan nöronal uzantılarda meydana gelen morfolojik değişiklikler ile aksiyon potansiyellerinin ve bu nedenle iletimin geciktiği bildirilmiştir [24]. Dickson (1997) bir araştırmasında korteksin üst tabakasında daha az diffüz yoğunluk ancak alt korteks tabakasında ise daha fazla diffüz yoğunluk olduğunu rapor etmiştir [13]. Yaptığımız çalışmada tolüen grubunda bu duruma paralel bir şekilde beyin korteksinin üst tabakasında daha az korteksin alt katmanlarında daha yoğun diffüz amiloit plak oluşumu görülmüştür. Kontrol grubunda ise boyanma yoğunluklarında herhangi bir değişiklik gözlemlenmiştir. Bu durumda tolüen maruziyetinin senil plakların oluşumunu arttırarak alzheimer'a neden olma olasılığını arttırabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç

Sonuç olarak yüksek dozda tolüenin 3 saat gibi çok kısa bir sürede bile önemli beyin hasarı oluşturdu-

ğu, senil amiloit plak oluşumu ve serum antioksidan seviyelerinde önemli derecede azalmanın meydana getirmesi ile akut tolüen maruziyetinin vücutta kalıcı ve geri dönüşümü zor hasarlar oluşturmasının mümkün olabileceği kanaatine varıldı.

Aknowledgments (Teşekkür)

Çalışmamız Atatürk Üniversitesi BAP 2014/183 nolu proje tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), (2000). Toxicological Profile for Tolüene. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp56.pdf>. Erişim tarihi: 25.10.2016.
2. Altındag A, Ozkan M, Oto R, (2001). *İnhalanla ilişkili bozukluklar*. Klinik Psikofarmakoloji Bülteni. 11:143-148.
3. Arends YM, Duyckaerts C, Rozemuller JM, Eikelenboom P, Hauw JJ, (2000). *Microglia, amyloid and dementia in alzheimer disease*. A correlative study. Neurobiol Aging. 21:39-47.
4. Argo A, Bongiorno D, Bonifacio A, Pernice V, Liotta R, Indelicato S, Zerbo S, Fleres P, Ceraulo L, Procaccianti P, (2010). *A fatal case of a paint thinner ingestion: comparison between toxicological and histological findings*. Am J Forensic Med Pathol. Jun;31(2), 186-91.
5. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), (2006). Case Studies in Environmental Medicine. Tolüene Toxicity. <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/Tolüene/>. Erişim tarihi: 25.10.2016.
6. Balster RL, (1998). *Neural basis of inhalant abuse*. Drug Alcohol Depend. 51,207-14.
7. Baydas G, Reiter RJ, ve ark., (2003). *Melatonin protects the central nervous system of rats against Tolüene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis*. Toxicol Lett. 137, 169-174.
8. Bowen SE, Batis JC, Mohammadi MH, Hannigan JH, (2005). *Abuse pattern of gestational Tolüene exposure and early postnatal development in rats*. Neurotoxicol Teratol. 27, 105-116.
9. Calderon-Guzman D, Espitia-Vazquez I, Lopez-Dominguez A, Hernandez-Garcia E, Huerta-Gertrudis B, Coballase-Urritia E, ve ark., (2005). *Effect of Tolüene and nutritional status on serotonin, lipid peroxidation levels and NA+/K+-ATPase in adult rat brain*. Neurochem Res. 30, 619-624.
10. Champe PC, Harvey RA, (1997). Glikozaminoglikanlar. Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E., Lippincott's illustrated reviews serisinden: Biyokimya. İkinci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul. p. 147-156.
11. Canoruç N, Çiçek R, Atamer A, Dursun M, Turgut C, Güneli E, Canoruç F, (2001). *Protective effects of vitamin E selenium and allopurinol against stres-induced ulcer formation in rats*. Turk J med Sci. 31,199-203.

12. Chavan S, Sava L, Saxena V, Pillai S, Sontakke A, Ingole D, (2005). *Reduced glutathione: Importance of specimen collection*. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 20(1), 150-152.
13. Dickson DW, (1997). *The pathogenesis of senile plaques*. J Neuropath Exp. Neurol. 56, 321-339.
14. Dossing, M, Aelum, JB, Hansen, SH, Lundqvist, GR, Andersen, NT, (1983). *Urinary hippuric acid and ortho-cresol excretion in man during experimental exposure to Tolüene*. Br J Ind Med. 40, 470-473.
15. Dündaröz MR, Turkbay T, Akay C, Sarıcı SU, Aydın A, Denli M, Gökçay E, (2003). *Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in adolescent with inhalant abuse*. Turk J Pediatr. 45(1),43-45.
16. Faust RA, (1994). Toxicity Summary for Tolüene. OAK Ridge Reservation Enviromental Restoration Program. Chemical Hazard Evaluation Group Biomedical and Environmental Information Analysis Section Health Sciences Research Division. <http://riskassessment.ornl.gov/documents/Toluene.pdf>. Erişim tarihi: 25.10.2016.
17. Georganopoulou DG, Chang L, Nam JM, ve ark., (2005). *Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci USA. 102, 2273.
18. Gong Y, Chang L, Viola KL, ve ark., (2003). *Alzheimer's Disease affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss*. Proc Natl Acad Sci USA. 100, 10417.
19. Guzelian P, Mills S, Fallon HJ, (1988). *Liver structure and function in print workers exposed to Tolüene*. J Occup Med. 30, 791-796.
20. Ilgazlı A, Şengül C, Maral H, Özden M, Erçin C, (2004). *The effects of thinner inhalation on superoxide dismutase activities, malondialdehyde and glutathione levels in rat lungs*. Clin Chim Acta. 343(1-2),141-4.
21. Jones HE, (1997). *Neurobehavioral consequences of intermittent prenatal exposure to high concentrations of Tolüene*. Neurotoxicology and Teratology. 4, 305-13.
22. Kanter M, (2011). *Protective effects of thymoquinone on the neuronal injury in frontal cortex after chronic Tolüene exposure*. J Mol Histol. 42(1), 39-46.
23. Karagözler AA, Mehmet N, Batçioğlu K, (2002). *Effects of long-term exposure on blood cytokine levels and antioxidant enzyme activities in house painters*. J Toxicol Environ Health A. 65(17),1237-46.
24. Knowles RB, Wyart C, Buldyrev SV, Cruz L, Urbanc B, Hasselmo ME, Stanley HE, Hyman BT, (1999). *Plaque-induced neurite abnormalities: implications for disruption of neural networks in Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A. 96,5274-5279.
25. Kuyumcu A, Duzgun AP, Ozmen MM, Besler HT, (2004). *Travma ve enfeksiyonda nitrik oksidin rolü*. Ulus Travma Dergisi. 10(3),149-159.
26. Matthew BG, Jourd'heuil D, Wink DA, (1999). *Nitric oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation*. Am. J. Physiol. 276,315-321.
27. Mohan IK, Dsa UN, (1997). *Oxidant stress, antioxidants and essential fatty acids in bronchial asthma*. Med. Sci. Res. 25,307-309.
28. Murray RK, Granner DK, Mayes RA, Rodwell VW, (1996). *Fizyolojik öneme sahip lipidler*. Dikmen N, Özgünen T, Harper'ın Biyokimyası, Yirmidördüncü baskı, Barış Kitabevi, İstanbul.
29. Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, ve ark., (2000). *Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline*. JAMA. 283, 1571.
30. OEHHA (Office of Environmental Health Hazard Assessment), (1999). Public Health Goal for Tolüene in Drinking Water. http://oehha.ca.gov/water/phg/pdf/tolu_f.pdf. Erişim tarihi: 20.10.2016.
31. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S, (1993). *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature. 327,524-6.
32. Park CK, Kwon KT, Lee DS, Jo CM, Tak WY, Kweon YO, ve ark., (2003). *A case of toxic hepatitis induced by habitual glue sniffing*. Korean J Hepatol. 4, 332-336.
33. Park E, Park Y, Gwak Y, (1998). *Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke*. Free Radical Biology & Medicine. 25(1),79-86.
34. Park JJ, Chang H, Jung JY, Jung SJ, Song KH, Suh WN, ve ark., (2006). *A Case of Tolüene-induced Renal Tubular Acidosis Presented with Hypokalemic Paralysis*. www.jksem.org. 17(6), 656-658.
35. Tomei F, Giuntoli P, Biagi M, Baccolo TP, Tomao E, Rosati MV, (1999). *Liver damage among shoe repairers*. Am J Ind Med. 36, 541-547.
36. Thomas JA, (1999). *Including glutathione, a peptide for cellular defense against oxidative stress*. Free Radical Biology and Medicine. 27,916-921.
37. Tsatsakis AM, Dolapsakis G, Troulakis G, Christodoulou P, Relakis K, Trikili N, ve ark., (1997). *Fatal and non-fatal outcome by accidental intoxication with paint thinner*. J Clin Forensic Med. 4, 133-137.
38. Ulakoğlu EZ, Saygı A, Gümüştüş MK, Zor E, Öztekin İ, Kökoğlu E, (1998). *Alterations in superoxide dismutase, lipid peroxidation and glutathione levels in thinner inhaled rat lungs: Relationship between histopathological properties*. Pharmacological Research. 38(3),209-214.

Samsun ili ve ilçelerinde yetiştirilen Anadolu mandalarının dışkı örneklerinde *Escherichia coli* O157:H7'nin tespiti

Çağatay Nuhay¹, Timur Gülhan²

¹Vezirköprü İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Vezirköprü, Samsun

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Samsun

Geliş Tarihi / Received: 25.05.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 01.06.2017

Özet: Mandalar, pek çok hayvan türü gibi bazı hastalıkların duyarlı hayvan popülasyonlarına ve insanlara bulaştırılmasında rol oynamaktadır. Enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC) suşları, insanlarda hemorajik kolitis (HC) ve hemorajik üremik sendrom (HUS) başta olmak üzere ölümcül enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu enfeksiyonlardan sorumlu başlıca EHEC serotipinin *E. coli* O157:H7 olduğu ortaya konulmuştur. Bu çalışmada, Samsun ili ve ilçelerindeki Anadolu Mandalarına ait 1000 dışkı örneği *E. coli* O157:H7 açısından standart kültürel metot ile incelendi. İncelenen 1000 dışkı örneğinden 38 (%3.8) *E. coli* O157:H7 serotipi, 400 (%40) *E. coli* O157:H7 serotipi yönünden negatif *E. coli* olmak üzere toplam 438 (%43.8) *E. coli* izole ve tanımlendi. İzolatların tamamı penisilin G ve eritromisine dirençli, danofloksasin, amoksisisilin+klavulanik asit, sefaperazon, ampisilin+sulbaktam, oksitetrasiklin ve ampisiline duyarlı olarak bulundu. Bu araştırma ile bölgemizde ilk kez Anadolu Mandalarına ait dışkı örnekleri *E. coli* O157:H7 serotipi yönünden incelendi. Bu çalışmadan elde edilen verilerin, yöremizde yapılacak benzer çalışmalara kaynak teşkil edebileceği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Anadolu mandası, Antibiyotik dirençlilik, Dışkı, *E. coli* O157:H7

Determination of *Escherichia coli* O157:H7 in Anatolian buffaloes' feces in and around Samsun

Abstract: Buffaloes are involved in the transmission of certain diseases, such as many animal species, to susceptible animal populations and humans. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) strains cause lethal infections in human mainly hemorrhagic colitis (HC) and haemorrhagic uremic syndrome (HUS). The major EHEC serotype responsible for these infections is *E. coli* O157: H7. In this study, 1000 fecal samples belonging to Anatolian Buffaloes in the provinces and districts of Samsun were examined for *E. coli* O157:H7 by standard cultural methods. Totally 438 (43.8%) *E. coli* were isolated and identified from examined 1000 stool samples including 38 (3.8%) for *E. coli* O157: H7 serotype and 400 (40%) for none *E. coli* O157: H7. All of isolates were found to be resistance to penicillin G and erythromycin, while they were found to be susceptible to danofloxacin, amoxicillin+clavulanic acid, cefoperazone, ampicillin+sulbactam, oxytetracycline and ampicillin. Fecal samples obtained from Anatolian Buffaloes were examined first time in our region respect to *E. coli* O157:H7 serotype. We concluded that the data obtained from this research can constitute a resource to similar studies in our region.

Key words: Anatolian buffaloes, Antibiotic resistance, Feces, *E. coli* O157:H7

Giriş

Manda, et, süt ve çeki hayvanı olarak dünya çapında, özellikle belirli ülkelerde yaygın olarak yetiştirilen Artiodactyla takımında, Bovidae ailesinde Bubalus sınıfında bir hayvandır. Afrika yabani mandası (*Syncerus caffer*) ve Asya mandası (*Bubalus bubalis*) olarak gruplandırılmaktadır. Evcil ve yabani formlardan köken alan mandaların yaklaşık 74 ırkı bulunmaktadır. Bu ırklar kabaca, bataklık ve nehir mandaları olarak ikiye ayrılmaktadır. Bataklık mandaları yük hayvanı olarak kullanılırken, nehir mandaları et ve süt yönlü yetiştirilmektedir. Türkiye'deki mandalar, nehir

mandalarının bir alt grubu olan Akdeniz mandalarından köken almakta ve Anadolu mandası olarak isimlendirilmektedir (Şekil 1). Türkiye'de manda yetiştiriciliği; Karadeniz Bölgesinde sahil şeridinde Samsun ve Sinop'ta, iç kesimlerde ise Tokat, Çorum ve Amasya'da; İç Anadolu Bölgesinde Sivas ve Yozgat'ta; Ege Bölgesinde Afyon'da; Marmara Bölgesinde İstanbul'da; Doğu Anadolu Bölgesinde Muş'ta; Güneydoğu Anadolu Bölgesinde Diyarbakır'da yoğunlaşmıştır. Dünya çapında son verilere göre yaklaşık 177 milyon manda bulunmaktadır. Ülkemizde 134.000 civarında manda yetiştirildiği, Samsun ilinde ise yaklaşık 19.000 manda bulunduğu bildirilmektedir [2].



Şekil 1. Anadolu Mandası

EHEC grubu zoonotik orijinli patojenik grup tur ve birçok hayvan türünün barsak florasında bulunabilmektedir. Fakat ruminantların EHEC'nin ve özellikle *E. coli* O157:H7'nin birincil rezervuarı olduğu bilinmektedir. Bugüne kadar yaklaşık 500 EHEC serotipi sığırlardan izole edilmiştir. *E. coli* O157:H7 infeksiyonları sığırlarda asemptomatik olduğu için genellikle etken bu hayvanlarda kommensal olduğu düşünülmektedir. Ancak, *E. coli* O157:H7 sığırlar için kommensal değildir. Hasta hayvanların sindirim sistemi incelendiğinde küçük mukozal hemorajiler ve fokal peteşilerle karakterize barsak lezyonları görülmekte ve böyle hayvanlar aylarca etkeni dışkılarıyla çıkartabilmektedirler. İnsan için yüksek derecede virulanse sahip olan etken sadece kontamine gıda veya suyun tüketilmesiyle değil, EHEC pozitif hayvanlar veya ortamlarla temas ile de bulaşabilmektedir [7].

E. coli O157 serotipinin diğer VTEC serotiplerinden ayırt edilmesinde kullanılan en önemli özellikler sorbitolü fermente edememesi (sorbitol negatif), β -glukorinidaz negatif olması ve 44-45°C'de üreyememesidir. Bununla birlikte, sorbitol pozitif *E. coli* O157 suşları da izole edilmektedir. Bu serotipin belirlenmesinde sorbitol MacConkey agar (SMAC), cefixime-SMAC (CR-SMAC), SMAC'ya cefixime+potasyum tellurite kombinasyonu eklenmesi ile elde edilen CT-SMAC gibi besiyerlerinde, 5-bromo-5-chloro-3-indoxyl- β -D-glucuronide veya 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide içeren ortamlarda direk kültür tekniği, bakteriyolojik kültürden sonra O157 spesifik antikorlarla kaplanmış boncukları kullanarak immunomanyetik seperasyon ve selektif besiyerlerinde üretildikten sonra lateks aglütinasyon testleri yaygın olarak kullanılmakta-

dır [15]. *E. coli* O157:H- ve O157:H7 serotiplerinin özellikle dışkı örneklerinde saptanmasında, SMAC besi yerinin kullanılarak yapılan direkt kültür tekniğinin basit, ucuz ve güvenilir bir yöntem olduğu bildirilmiştir [21]. Bu besi yerinde sorbitol negatif bakteriler, ticari antiserumlar veya lateks aglütinasyon test kitleri ile test edilebilmektedir.

E. coli tedavi amaçlı kullanılan antibiyotiklere genellikle duyarlı olmakla birlikte, pek çok enteropatojenik bakteri türünde olduğu gibi, *E. coli* izolatları arasında da antibiyotik dirençliliği giderek artmaktadır [13].

Literatür taramalarında, manda dışkılarından *E. coli* O157:H7 serotipinin tespitine yönelik çalışma sayısının, diğer hayvan türleriyle kıyaslandığında, yetersiz olduğu görülmüştür. Ülkemizde etkenin manda dışkılarından tespitine yönelik iki çalışmaya rastlanılmıştır [24, 25]. Samsun ili ve çevresinde manda yetiştiriciliği yoğun olarak yapılmaktadır. Bu çalışma ile bölgemizde ilk kez Anadolu mandalarının dışkı örnekleri *E. coli* O157:H7 serotipi yönünden incelendi. Manda dışkılarında etkenin varlığı ve sıklığı ortaya konuldu. Ayrıca izolatların belirli antibiyotiklere dirençlilik/duyarlılık durumları araştırıldı.

Materyal ve Metot

Dışkı Örnekleri: Çalışmanın materyalini Samsun ilçelerinde yetiştiriciliği yapılan Anadolu Mandalarından sağlanan 1000 adet dışkı örneği oluşturdu (Şekil 2). Bu amaçla alınan dışkı sayıları ve merkezler Tablo 1'de sunuldu.



Şekil 2. Anadolu mandası dışkı örneklerinin toplandıği merkezler

Tablo 1. Anadolu mandası dışkı örneklerinin toplandığı merkezler ve dışkı sayıları

Merkez	Manda sayısı	Alınan dışkı sayısı
Ayvacık	6	4
İlkadım	20	10
Canik	42	10
Atakum	62	10
Yakakent	79	20
Tekkeköy	148	20
Salıpazarı	206	20
Asarcık	335	20
Ladik	408	20
Kavak	428	30
Ondokuz Mayıs	1116	50
Terme	1496	80
Çarşamba	1857	100
Alaçam	1936	80
Vezirköprü	2869	140
Bafra	6972	386
Toplam	17.980	1000

Besiyerleri ve Suplementler: Dışkı örneklerinden *E. coli* O157:H7 izolasyonu amacıyla modifiye tryptic soy broth (mTSB, Oxoid), sorbitol MacConkey agar (SMAC, Oxoid), tryptic soy agar (TSA, Oxoid,) ve tryptic soy buyyon (TSB, Oxoid) kullanıldı. Selektif besi yeri elde etmek için ise novobiocin (Oxoid), cefixime (0.05 µg/ml) ve potasium tellurite (2.5 µg/ml) (Oxoid) supplementlerinden yararlanıldı.

Antiserumlar: *E. coli* suşlarında O157 serotipinin belirlenmesi için O157 lateks aglütinasyon test kiti (Oxoid DR620M, UK), H7 serotipinin tespitinde ise H7 monovalan antiserumu (Denka Seiken, Japonya) kullanıldı.

İzolasyon ve İdentifikasyon: Dışkı örneklerinden *E. coli* izolasyonu konvansiyonel yöntemlere göre yapıldı. *Escherichia coli* O157:H7 izolasyonu amacıyla önceden popülasyon yoğunluğu belirlenen mandalardan steril dışkı toplama kaplarına alınan dışkı örnekleri kısa sürede ve soğuk zincirde, OMÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirilerek selektif zenginleştirme (direkt kültür) tekniği ile incelendi.

Bu amaçla, 1 g dışkı örneği, 20 µg/ml novobiocin supplementi içeren 9 ml modifiye tryptic soy broth (mTSB) besiyerine aktarıldı ve homojenize edildi. Homojenizattan hazırlanan 10 katlı seri sulandırmalar cefixime (0.05 µg/ml) ve potasium tellurite (2.5 µg/ml) içeren sorbitol MacConkey agar (CT-SMAC) besi yerine ekilerek direkt kültür (direkt pleyting) yapıldı. CT-SMAC agarda üreyen sorbitol fermentasyonu negatif, renksiz koloniler ayrılarak lateks aglütinasyon testi ile *E. coli* O157 ve monovalan H7 antiserumu ile H7 yönünden incelendi.

İzole ve identifiye edilen *E. coli* suşlarında O157 serotipinin belirlenmesinde ticari *E. coli* O157 lateks test kiti kullanıldı. Test üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. Kısaca, *E. coli* suşlarının taze kültürleri CT-SMAC agara ekilerek 37 °C'de aerobik koşullarda 24 saat inkübe edildi. Bu ortamda üreyen sorbitol fermentasyonu ve β-glukuronidaz negatif renksiz koloniler şüpheli olarak değerlendirildi. Saflaştırılarak ayrılan şüpheli koloniler lateks aglütinasyon testi ile incelendi. Test, pozitif kontrol lateksi ve negatif kontrol süspansiyonu ile doğrulandı.

E. coli O157 olarak saptanan susların H antijen tipinin belirlenmesi amacıyla ticari H7 monovalan antiserumu kullanıldı. Test prospektüsüne göre gerçekleştirildi. Kısaca, izolatların taze sıvı kültürlerinden craigie tüplü yarı-katı besiyerlerine ekimler yapılarak 3-5 kez flagella oluşumunu artırmak için pasajlandı. Yarı katı besi yerinden BHI sıvı besi yerine ekilen kültürler 37 °C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda sıvı kültürler üzerine eşit miktarda %1'lik formalin ilave edildi. Aynı ayrı test tüplerine 3'er damla H antiserumu damlatılacak ve her tüpe 0.5 ml bakteri kültüründen eklendi. Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 56 °C'de 1 saat su banyosunda bekletildi ve aglütinasyonlar çıplak gözle değerlendirildi. Aglütinasyon gösteren izolatlar *E. coli* O157:H7 olarak tiplendirildi.

Antibiyotik Duyarlılık Testi: İzolatların ampicilin (10 µg), eritromisin (15 µg), penisillin G (10 µg), sefaperazon (75 µg), danofloksasin (5 µg), amoksisilin+klavulanik asit (25 µg), ampisilin+sulbaktam (20 µg), oksitetrasiklin (30 µg) antibiyotiklerine dirençlilik/duyarlılık durumlarının belirlenmesinde Clinical and Laboratory Standards Institute tarafından önerilen standart disk diffüzyon tekniği kullanıldı [5].

Bulgular

İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları: İncelenen 1000 dışkı örneğinden 38 (%3.8) *E. coli* O157:H7 serotipi, 400 (%40) *E. coli* O157:H7 serotipi yönünden negatif *E. coli* olmak üzere toplam 438 (%43.8) *E. coli* suşu izole ve identifiye edildi. İzole edilen *E. coli* ve *E. coli* O157:H7 suşlarının dışkı örneklerinin sağlandığı merkezlere göre dağılımı Tablo 2'de sunuldu.

Tablo 2. *E. coli* ve *E. coli* O157:H7 suşlarının izole edildiği merkezlere göre dağılımı

Merkez	Dışkı sayısı	O157:H7 negatif <i>E. coli</i> (%)	<i>E. coli</i> O157:H7 (%)	Toplam <i>E. coli</i> (%)
Ayvacık	4	2 (50)	-	2 (50)
İlkadım	10	5 (50)	-	5 (50)
Canik	10	5 (50)	-	5 (50)
Atakum	10	5 (50)	-	5 (50)
Tekkeköy	20	10 (50)	2 (10)	12 (60)
Yakakent	20	15 (75)	-	15 (75)
Asarcık	20	15 (75)	2 (10)	17 (85)
Salıpazarı	20	15 (75)	-	15 (75)
Ladik	20	15 (75)	-	15 (75)
Kavak	30	15 (50)	2 (6.7)	17 (56.7)
Ondokuz Mayıs	50	25 (50)	2 (4)	27 (54)
Alaçam	80	25 (31.3)	2 (2.5)	27 (33.8)
Terme	80	25 (31.3)	4 (5)	29(36.3)
Çarşamba	100	50 (50)	4 (4)	54 (54)
Vezirköprü	140	55 (39.3)	6 (4.3)	61 (43.6)
Bafra	386	118 (30.6)	14 (3.6)	132 (34.2)
Toplam	1000	400 (40)	38 (3.8)	438 (43.8)

Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları: İzole edilen 438 *E. coli* suşunun tamamı eritromisin ve penisilin G'ye dirençli, danofloksasin, amoksisilin+klavulanik asit, sefaferazon, ampisilin+sulbaktam, oksitetrasiklin ve ampisiline duyarlı bulundu.

Tartışma ve Sonuç

Mandaların diğer hayvanlarda olduğu gibi pek çok patojen etkeni taşıdıkları, bazı hastalıkların duyarlı hayvan popülasyonlarına ve insanlara bulaştırılmasında rol oynadıkları tespit edilmiştir. Yabani ve evcil mandalarda yapılan çalışmalarda zoonoz karaktere de sahip pek çok bakteriyel etkenin varlığı ve yaygınlığı ortaya konulmuştur [10,22,25].

Çeşitli hayvan türlerinde [5, 9, 12] olduğu gibi mandalarda da *E. coli* O157:H7 ile ilgili farklı ülkelerde gerçekleştirilen çalışmalar bulunmaktadır.

İtalya'da yapılan bir çalışmada 289 manda dışkı örneğinden 42'sinde (%14.5) VTEC 157 suşu belirlenmiştir [8]. Benzer bir çalışmada [12], 174 manda dışkısından 25 (%14.4) STEC O157 izole edilmiştir. Naag ve ark. [17] ishali manda yavrularına ait 32 dışkı örneğinin 19'undan (%59.4) VTEC izolasyonu yapmışlardır. Hindistan'da gerçekleştirilen bir çalışmada [16] mandalarda %13.4 (8/60) oranında VTEC tespit edilmiştir.

Mahanti ve ark. [14] manda dışkılarından izole ettikleri 363 *E. coli* suşundan 24'inin (%6.6) O157 haricinde diğer STEC serotipi olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmada izolatların %95.8'i eritromisine, %62.5'i sefalotine, %54.2'si amikasine, %4.2'si de amoksisiline dirençli bulunmuştur. Aynı araştırmacıların yaptıkları başka bir çalışmada [15] manda dışkılarından izole edilen 363 *E. coli* suşunun 26'sı (%6.8) O157 olmayan ETEC olarak belirlemiştir. Benzer bir çalışmada 237 manda rektal svap örneğinden 64 (%27) STEC izole edilmiştir. İzolatların tamamı O157 serotipi açısından negatif bulunmuştur [27].

İshali manda yavrularından izole edilen hemolitik *E. coli* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada [18], 169 dışkı örneğinden 94 (%55.6) izolat saptanmıştır. İzole edilen 94 hemolitik *E. coli* suşunun, tamamı penisiline, 44'ü (46.8) ampisilin ve amoksisilin+klavulonik aside, 32'si (%34) tetrasikline 18'i (%19.1) enrofloksasine dirençli bulunmuştur. İzolatların 40'ı (%42.5) O157 serotipi olarak tiplendirilmiştir. O157 izolatlarından 40'ının (%100) penisiline, 26'sının (%65) ampisiline, 25'inin (%62.5) amoksisilin+klavulonik aside, 12'sinin (%30) enrofloksasine ve 9'unun (%22.5) tetrasikline dirençli olduğu saptanmıştır. Benzer bir çalışmada [20] 50 manda rektal svap örneğinin 23'ünden (%46) *E. coli* izole edilmiştir. Çalışmada, izolatların %12.2'si enrofloksasine, %22.5'i amoksisiline, %33.3'ü eritromisine dirençli, tamamı siprofloksasin, gentamisin ve sefaleksine duyarlı bulunmuştur.

İran'da yapılan bir çalışmada [28] 360 manda dışkı örneğinden 340 (%94.4) *E. coli* izole edilmiş ve 26'sı STEC olarak bulunmuştur. Bunların sadece

1'i (%3.8) O157 serotipi geri kalanı O157 olmayan STEC serotipi olarak tanımlanmıştır. 26 STEC izolatının tamamının ampisilin, eritromisin, neomisin ve streptomisine, 25'inin (%96.1) amoksisiline, 18'inin (%69.2) kanamisine ve 4'ünün (%15.3) de tetrasikline dirençli olduğu bildirilmiştir. Benzer bir çalışmada [4], 314 manda yavrusuna ait dışkı örneğinden 220 (%70.1) *E. coli* izole edilmiştir. İzolatların %81.8'i ampisiline, %74'ü oksitetrasikline, %42.6'sı amoksisilin+klavulonik aside ve %30.6'sı enrofloksasine dirençli bulunmuştur. 220 izolatın 4'ü (%1.8) ETEC ve 6'sı (%2.7) EHEC olarak bulunmuştur. Ancak patojen suşların hiçbirinde O157 serotipi saptanamamıştır.

Hindistan'da mandalarda enteropatogenik *E. coli* (EPEC) epidemiyolojisi üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada [23], 43 manda dışkısının 35'inden (%81.4) O157 olmayan *E. coli* serotipleri izole edilmiş, bunların sadece 1'i (%2.3) EPEC olarak tanımlanmıştır. İzolatların tamamı ampisilin, amoksisilin, tetrasiklin ve enrofloksasine duyarlı bulunmuştur.

İran'da yapılan bir çalışmada [21], sağlıklı görünen mandalardan alınan 43 dışkı örneğinin 5'i O157:H7, 3'ü O157:H7/NM olmak üzere 8 (%18.6) *E. coli* O157 serotipi tespit edilmiştir. Çalışmada, mandaların enterohemorajik *E. coli* O157 serotipinin insanlara bulaştırılmasında potansiyel önemine dikkat çekilmiştir.

Tanzanya'da yaban hayatında antibiyotiklere dirençli bakterileri belirlemek için yapılan bir çalışmada [13], 35 manda dışkısından izole edilen 31 *E. coli* (%88.6) suşun 20'si (%64.5) tetrasikline, 12'si (%38.7) ampisiline, 9'u (%29) sefotaksim ve amoksisilin+klavulonik aside, 8'i (%25.8) de enrofloksasine dirençli bulunmuştur. Benzer bir çalışmada [1], 25 manda dışkısından 20 *E. coli* (%80) izole edilmiş, izolatların antibiyotik dirençlilik oranları eritromisin, ampisilin, tetrasiklin ve enrofloksasin sırasıyla %100, 90, 80 ve 75 olarak bildirilmiştir. Idrees ve ark. [11], manda orijinli 58 *E. coli* suşunda trimetoprim %28, ampisiline %24, sefotaksime %16 oranında dirençlilik saptamışlardır.

Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda mandalarda diğer EHEC serotiplerinin de yüksek oranlarda tespit edilmesi [3, 12], bu hayvanların zoonoz karakterdeki serotiplerin taşınmasındaki önemli

potansiyeye sahip olduğunu göstermektedir. Diğer yandan *E. coli* O157:H7 serotipi, başlıca zoonotik EHEC olması nedeniyle öneme sahiptir. Bu bakteriyi taşıyan ve başlıca dışkı olmak üzere çeşitli yollarla saçabilen hayvanların tespiti, insanlardaki gıda kökenli salgınların önlenmesi açısından son derece önemlidir. Çeşitli ülkelerde mandaların dışkılarındaki etkenin varlığı ortaya konulmasına rağmen [19, 21, 28], ülkemizde konuyla ilgili çok az araştırmaya rastlanılmıştır. Marmara bölgesinde yapılan bir çalışmada 28 manda karkas ve rektal svaplarında *E. coli* O157:H7'ye rastlanılmamıştır [29]. Türkiye'de Anadolu Mandalarına ait dışkı örneklerinden *E. coli* O157:H7'nin ilk izolasyonu Şeker ve Yardımcı [24] tarafından yapılmıştır. Çalışmada 300 dışkı örneğinden 11 (%3.7) ve 213 çiğ süttten 3 (%1.4) *E. coli* O157:H7 izole edilmiştir.

Bu çalışmada, incelenen 1000 manda dışkı örneğinden 38 (%3.8) *E. coli* O157:H7 suşu izole ve identifiye edildi. Ayrıca dışkı örneklerinden O157:H7 serotipi açısından negatif 400 *E. coli* izolasyonu gerçekleştirildi. Araştırma kapsamında örnek toplanan manda populasyonlarında belirlenen toplam pozitiflik oranının farklı ülkelerde bildirilen oranlardan genelde düşük olduğu görüldü. Diğer yandan sonuçlar, ülkemizde izolasyon yapılan tek çalışma ile uyumlu bulundu. İzolasyon oranlarının diğer ülkelerdekilerden düşük olması, proje kapsamında alınan dışkı örneklerinin klinik olarak sağlıklı mandalardan sağlanmış olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca çalışmalarda kullanılan metotların, örnek toplanan merkezlerin farklı coğrafik alanlara ait olması da sonuçları etkileyebilmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada Samsun İli ve ilçelerinde halk elinde yetiştiriciliği yapılan Anadolu Mandalarının dışkı örneklerinde *E. coli* O157:H7'nin varlığı, yaygınlığı ve hedef hayvan populasyonlarındaki taşıyıcılık oranları ilk kez incelendi. Çalışma kapsamındaki bazı Anadolu Mandası populasyonlarından sağlanan dışkılarından etken izole edilemezken, bazı populasyonlarda yüksek oranda tespit edildi. Toplam hayvan populasyonlarından izole edilen etkenin prevalansı ise %3.8 olarak saptandı. Bu oran ülkemizde Ege bölgesinde bildirilen oranla paralellik göstermektedir. Zoonotik öneme sahip etkenin mandalardaki taşıyıcılık oranının yüksek olması önem arz etmektedir. İzole edilen suşlarda çoğul antibiyotik dirençliliğine rastlanılmaması

önemli olarak değerlendirildi. Diğer yandan izolatların tamamının eritromisin ve penisiline direnç göstermesi, söz konusu antibiyotiklerin sahada yaygın olarak kullanılıyor olmasından kaynaklanabileceği kanısına varıldı.

Ülkemizde diğer hayvan türlerinde zoonotik öneme sahip etkenin belirlenmesine yönelik çok sayıda çalışma bulunmakla birlikte, mandalara ait verilerin çok yetersiz olduğu görülmektedir. Ülkemizin farklı bölgelerinde, manda yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlarda konuyla ilgili kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma PYO.VET.1904.14.007 numaralı yüksek lisans tez projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Aynı isimli yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Kaynaklar

- Ahmadi M, Tokmechi A, Kazemnia A, (2008). Study of antimicrobial susceptibility and plasmid analysis of *Escherichia coli* in Iran, Urmia. *J Vet Res.* 63(2), 25-29.
- Anonim, (2017). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Hayvancılık Genel Müdürlüğü, Mart 2017 Verileri, Erişim adresi: <http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/HAYGEM.pdf>, Erişim Tarihi: 26.04.2017.
- Beraldo LG, Borges CA, Maluta RP, Cardozo MV, Rigobelo EC, Avila FA, (2014). Detection of Shiga toxigenic (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in dairy buffalo. *Vet Microbiol.* 170, 162-166.
- Borriello G, Lucibelli MG, De Carlo E, Auriemma C, Cozza D, Ascione G, Scognamiglio F, Iovane G, Galiero G, (2012). Characterization of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) and necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) isolated from diarrhoeic Mediterranean water buffalo calves (*Bubalus bubalis*). *Res. Vet Sci.* 93, 18-22.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2013). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement M100-S23. Wayne, PA.
- Çabalar M, Boynukara B, Gülhan T, Ekin İH, (2001). Prevalence of rotavirus, *Escherichia coli* K99 and O157:H7 in healthy dairy cattle herds in Van, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci.* 25, 191-196.
- Ferens WA, Hovde CJ, (2011). *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathog Dis.* 8(4), 465-487.
- Galiero G, Conedera G, Alfano D, Caprioli A. (2005). Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. *Vet Rec.* 156, 382-383.
- Gülhan T, (2003). Sağlıklı görünen hayvanların dışkılarından izole edilen *Escherichia coli* suşlarının biyokimyasal, enterotoksijenik ve verotoksijenik özelliklerinin belirlenmesi. *YYÜ Vet Fak Derg.* 14(1), 102-109.
- Hadimli HH, Pinarkara Y, Sakmanoğlu A, Sayin Z, Erganiş O, Uslu A, Al-Shattrawi HJ, (2017). Serotypes of *Salmonella* isolated from feces of cattle, buffalo, and camel and sensitivities to antibiotics in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci.* 41, 193-198.
- Idrees M, Shah MA, Michael S, Qamar R, Bokhari H, (2011). Antimicrobial resistant *Escherichia coli* strains isolated from food animals in Pakistan. *Pakistan J Zool.* 43(2), 303-310.
- Islam MA, Mondol AS, de Boer E, Beumer RR, Zwietering MH, Talukder KA, Heuvelink AE, (2008). Prevalence and genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from slaughtered animals in Bangladesh. *Appl Environ Microbiol.* 74, 5414-5421.
- Katakweba AAS, Møller KS, Muumba J, Muhairwa AP, Damborg P, Rosenkrantz JT, Minga UM, Mtambo MMA, Olsen JE, (2014). Antimicrobial resistance in faecal samples from buffalo, wildebeest and zebra grazing together with and without cattle in Tanzania. *J Appl Microbiol.* 118, 966-975.
- Mahanti A, Samanta I, Bandopaddhay S, Joardar SN, Dutta TK, Batabyal S, Sar TK, Isore DP, (2013). Isolation, molecular characterization and antibiotic resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from buffalo in India. *Lett Appl Microbiol.* 56, 291-298.
- Mahanti A, Samanta I, Bandopaddhay S, Joardar SN, Dutta TK, Sar TK, (2014). Isolation, molecular characterization and antibiotic resistance of Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) and Necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) from healthy water buffalo. *Vet Arhiv.* 84(3), 241-250.
- Mishra RP, Jain U, Bist B, Verma AK, Kumar A, (2016). Prevalence of vero toxic *Escherichia coli* in fecal samples of domestic as well as wild ruminants in Mathura districts and Kanpur zoo. *Vet World.* 9(1), 71-74.
- Naag D, Swamy M, Shrivastav AB, (2015). Detection of verotoxin producing strain of *E. coli* in buffalo calves. *Buffalo Bulletin.* 34(2), 227-229.
- Nizza S, Mallardo K, Marullo A, Iovane V, De Martino L, Pagnini U, (2010). Antibiotic susceptibility of haemolytic *E. coli* strains isolated from diarrhoeic faeces of buffalo calves. *Ital J Anim Sci.* 9:e26, 134-136.
- Oliveira MG, Brito JRF, Carvalho RR, Guth BEC, Gomes TAT, Vieira MAM, Kato MAMF, Ramos II. Vaz TMI, Irino K, (2007). Water buffaloes (*Bubalus bubalis*) identified as an important reservoir of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 73, 5945-5948.
- Paul SK, Khan MSR, Rashid MA, Hassan J, Mahmud SMS, (2010). Isolation and characterization of *Escherichia coli* from buffalo calves in some selected areas of Bangladesh. *Bangl J Vet Med.* 8(1), 23-26.
- Rahimi E, (2012). Prevalence and virulence genes of *Escherichia coli* O157:H7/NM isolated from the feces of water buffaloes, camels, cattle, sheep and goats in Iran. *Philipp J Vet Med.* 49(2), 96-102.

22. Rahimi E, Momtaz H, Behzadnia A, Baghbadorani ZT, (2014). Incidence of *Listeria* species in bovine, ovine, caprine, camel and water buffalo milk using cultural method and the PCR assay. *Asian Pac J Trop Dis.* 4(1), 50-53.
23. Rehman MU, Rashid M, Sheikh JA, Bhat MA, (2014). Molecular epidemiology and antibiotic resistance pattern of Enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from bovines and their handlers in Jammu, India. *J Adv Vet Anim Res.* 1(4), 177-181.
24. Şeker E, Yardımcı H, (2008). First isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from faecal and milk specimens from Anatolian water buffaloes (*Bubalus bubalus*) in Turkey. *J S Afr Vet Assoc.* 79, 167-170.
25. Şeker E, Yardımcı H, (2010). The aerobic bacterial flora of the nasal cavity in healthy Anatolian water buffalo calves. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 57, 65-67.
26. Şeker E, Kuyucuoğlu Y, Sareyyüpoğlu B, Yardımcı H, (2010). PCR detection of Shiga toxins, enterohaemolysin and intimin virulence genes of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from faeces of Anatolian water buffaloes in Turkey. *Zoonoses Public Health.* 57, 33-37.
27. Vu-Khac H, Cornick NA, (2008). Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes, cattle, and goats in central Vietnam. *Vet Microbiol.* 126, 356-363.
28. Yaghobzadeh N, Ownagh A, Mardani K, Khalili M, (2011). Prevalence, molecular characterization and serology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* isolated from buffaloes in West Azerbaijan, Iran. *Int J Vet Res.* 5(2), 113-117.
29. Yılmaz A, Gün H, (2007). Manda karkasları ve rektal swap-larında *Escherichia coli* O157:H7 varlığının araştırılması. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg.* 33(3), 59-65.

Etsiz Çiğ Köftelerde Patojen *Candida* spp. Varlığının Tespiti

Özen Kurşun Yurdakul¹, Seval Sevgi Kırdar², Erhan Keyvan¹

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

²Mehmet Akif Ersoy Univ., Burdur Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Böl., Süt ve Ürünleri Teknolojisi AD, Burdur

Geliş Tarihi / Received: 31.10.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 14.04.2017

Özet: Çiğ köfte, pişirilmeden tüketilen geleneksel hazır bir gıdadır. Artan tüketici taleplerinin karşılanabilmesi için endüstriyel üretimi yoğunluk kazanmış olan çiğ köfte, halk sağlığının korunması amacıyla çiğ et ilavesi olmadan üretilmektedir. Hammadde kalitesi, muhafaza koşulları, personel hijyeni ve ısıl işlem görmeden tüketilmesi gibi nedenler, çiğ köfteleri gıda hijyeni bakımından riskli hale getirmektedir. Bu çalışmada, 100 adet etsiz çiğ köfte örneği patojen *Candida* spp. varlığı yönünden analiz edildi. Etsiz çiğ köfte örneklerinin %10'unda *Candida albicans*, %2'sinde *C. albicans* ve *C. krusei* ile %2'sinde ise *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* olmak üzere üç farklı tür ile kontaminasyon tespit edildi. Gıda örneklerinin mikrobiyolojik incelemesinde toplam maya ve küf sayısı ile birlikte patojen mayaların varlığına yönelik analizlerin de yapılması toplum sağlığı açısından yararlı olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Etsiz çiğ köfte, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*.

Detection of Pathogen *Candida* spp. in Cig Kofte-Meatless Raw Meatball

Abstract: Cig köfte is a Turkish traditional ready to eat food and eaten without any cooking process. In order to maintain consumer demands, industrial production of cig köfte has become widespread in recent years, cig köfte is produced without the addition of raw meat for the protection of public health. Cig kofte is a potential problem for food hygiene because of such reasons like quality of raw material, storage conditions, personel hygiene and uncooked consumption. In this study, 100 meatless cig köfte samples were analyzed for occurrence of pathogen *Candida* spp. *Candida albicans* was detected 10%, *C. albicans* and *C. krusei* were detected 2% and *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei* were detected 2% of meatless cig köfte samples. As a result of this studies, microbiological analysis of food samples should be detected for the presence of pathogenic yeast with total number of mold that it would be beneficial for public health.

Key words: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida*, Meatless raw meatball.

Giriş

Çiğ köfte perakende satışı son yıllarda giderek yaygınlaşan geleneksel ürünlerimizden biridir. Geleneksel üretimde; yağsız sığır eti kıyması ile ince öğütülen bulgur içerisine çeşitli baharatlar, sarımsak, salça ve maydanoz eklenir. Bulgur yumuşayana kadar elle yoğrulur ve şekil verilerek tüketime hazır hale getirilir. Çiğ köftede çiğ et bulunması, ilave edilen malzemelerin hijyeni ile personel ve ekipmanlara bağlı nedenlerle mikroorganizma ve parazit kontaminasyonu şekillenebilir. Halk sağlığı açısından potansiyel bir tehlike oluşturabileceğinden perakende satışlarda çiğ et kullanımı yasaklanmıştır. Etsiz hazırlanan çiğ köftelere ısıl işlemi uygulanmadığı için baharat, alet ekipman ve hazırlayan kişiye bağlı olarak tüketimi bazı durumlarda riskli olabilir [10, 28, 29]. Özellikle baharat ve baharat katkılı gıda maddelerinde patojen mikroor-

ganizmalardan kaynaklanan kontaminasyonlar her zaman mümkündür [12, 13 19].

Yeni antifungal ilaçların gelişmesi ile bu ilaçlara dirençli *Candida* türlerine bağlı enfeksiyonlarda önemli artışlar meydana gelmiştir. Hastane enfeksiyonu görülen yoğun bakım ünitelerinde bulunan mikroorganizmaların %51'i gram negatif bakteri, %35,2'si gram pozitif bakteri, %13,8'i *Candida* spp. olduğu görülmüştür [16]. *Candida* cinsi maya mantarları, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) hastanelerinde kan dolaşımı enfeksiyonlarında %8 ile dördüncü sırada görülen bir etkidir. İnvaziv kandidiyaz ile ilişkili mortalite önemlidir. Fransa'da yapılan toplum temelli yeni bir çalışmada, kandidemi ile ilişkili ölüm oranı %40 olarak bulunmuştur [4]. Hastane enfeksiyonları patojenleri arasında dördüncü sıraya yükselen ve yüksek mortalite oranına sahip patojen *Candida* türleri aynı zamanda gıdalarla da insanlara bulaşmaktadır. Son yıllarda patojen

Candida spp. önemli bir gıda patojeni olarak dik-katleri üstüne çekmektedir [25].

Candida türleri 6 µm büyüklüğünde, Gram pozitif, oval, hareketsiz, kapsülsüz, sporsuz, to-murcuklanan hücreler olarak görülürler. Yalancı hif (psödohif) oluştururlar. Bunlar arasında *C. albicans*, blastokonidyum ve yalancı hif yanında gerçek hifler de oluşturarak dimorfik özellik gösterir [11,22].

Candida türleri, rutin besiyerleri olarak kulla-nılan Sabouraud-dekstroza-agar (SDA)'da, 24°C'de ve 37°C'de 24 saatte üreyerek genellikle kirli-beyaz veya krem rengi, yumuşak kıvamlı ve tipik olarak mayamsı, kokulu koloniler yaparlar. Kolonilerin besiyeri yüzeyinde kalan kısımları blastokonidyum-lardan; besiyeri yüzeyinin altında ise yalancı hif-lerden oluşmuştur. *Candida* türleri, besiyerlerinde saptanan blastokonidyumların özellikleri ile blas-tokonidyumların yalancı hif boyunca dizilimlerine göre farklar gösterir. Ayrıca türlerin kesin tanısı için şeker fermentasyonu ve biyokimyasal testler yapılır [22, 31].

C. albicans'ın diğer *Candida* türlerinden ayrı-mında iki morfolojik test uygulanır. Serumda germ tüp oluşturması ve mısır unlu Tween 80 agarda klamidospore oluşumu *C. albicans*'ın karakteristik özelliğidir. *C. tropicalis* gerçek hif oluşturabilir, nadiren klamidospore oluşumu gözlenir, sukrozu asi-mile eder. *C. krusei* dekstrozu fermente eder ancak galaktozu asimile edemez [15].

Candida spp. türleri arasında en patojen tür *C. albicans* olup *C. tropicalis* ile *C. krusei*'ye bağlı enfeksiyonlarda da artış görülmektedir. *C. albicans*, hücre duvarında bulunan ve immünojen olan mannan tabakasının yapısal değişikliğine bağlı olarak A ve B olmak üzere iki serotipe ayrılır. *C. albicans*'ın mannan dışında diğer antijenleri; salgısal proteazlar, enolaz ve ısı şok proteinleridir [20].

Biyofilm oluşturma özelliğine sahip olmaları gıda sektörü açısından risk teşkil etmektedir. Biyofilm tabakada *Staphylococcus* spp. gibi bazı *Candida* türleri de slime benzeri yapılar oluşturmaktadır. Mikroorganizmalar bu slime tabakası içinde çoğalarak kalın bir film tabakasının şekillenmesine neden olur. *Candida* biyofilminin antifungal direnç gelişimine katkısının olduğu belirtilmektedir [18, 24].

Candida türleri normal floranın bir parçasıdır. İnsanların %40-50'sinin gastrointestinal kanalında,

geçici ya da kalıcı olarak bulunurlar. Ayrıca insanlarda ağız, deri, tırnak, kıl folliküllerine yerleşebilir [23]. Bunlara ilave olarak gıda ve su ile alınarak hastalık meydana getirmektedir [5, 6, 30, 33]. *Candida* spp., vulvovaginitis, endokarditis, pnömoni, meninjitis ve septisemi meydana getirebilir [23, 35].

Bu çalışmada, perakende satışı yapılan etsiz çiğ köftelerde patojen *Candida* spp. varlığının ortaya konulması ile gıda kaynaklı muhtemel enfeksiyonlardaki rollerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Bu çalışmada, sadece çiğ köfte üretimi yapan işletmelerden 100 adet etsiz çiğ köfte örneği alındı. Örnekler aseptik şartlar altında ve soğuk zincirde laboratuvara getirilerek analizleri yapıldı [14].

Referans izolatlar

Kontrol suşları olarak seçilen *C. albicans* (ATCC 97012), *C. tropicalis* (ATCC 13803), *C. krusei* (ATCC 14243) olmak üzere toplam 3 referans izolat kullanılmıştır.

Besiyerleri

Maya ve küf sayımı, pH'sı 3.5'e düşürülmüş Potato Dextrose Agar (PDA) (Difco B 13) besiyeri ile 22±1 °C'de 5 gün inkübe edilerek yapıldı [14]. Patojen *Candida* spp. saptanması amacıyla CHROMAgar™ *Candida* agar (CAC) kullanılmıştır [25].

Örneklerin analizi

Sadece çiğ köfte üretimi yapılan işletmelerden toplam 100 adet etsiz çiğ köfte örneği toplanarak soğuk zincir altında laboratuvara getirildi. Her bir gıda örneği aseptik koşullarda steril plastik torbalara 10'ar g tartılıp üzerine 90'ar ml steril peptonlu su (%0.1) ilave edildikten sonra 2-3 dakika süre ile stomacher'da homojenize edildi. Elde edilen homojenize karışımdan 10⁻⁵'e kadar desimal sulandırılmaları hazırlanarak PDA ve CAC besiyerine yayma plak tekniği ile ekimleri yapıldı [3, 21, 27]

Candida spp. şüpheli kolonilerden Gram boyama, germ tüp testi, karbonhidrat fermentasyon testleri (glikoz, maltoz, sukroz ve galaktoz) ile üreaz testleri gibi testler, biyokimyasal özelliklerin tespiti amacıyla yapıldı [8, 15].

Tablo 1. Patojen *Candida spp.*'nin CHROMagar *Candida* besiyerinde koloni görünümü ve türlerinin ayırımında kullanılan testler [8, 15, 26].

Tür ismi	CHROMagar koloni görünümü	Gram boyama	Germ tüp	Üreaz	Karbonhidrat Fermentasyon Testleri			
					Glikoz	Maltoz	Sukroz	Galaktoz
<i>C. albicans</i>	Yeşil koloniler	Gram (+)	+	-	AG	AG	A	AG
<i>C. tropicalis</i>	Metalik mavi-koyu mavi koloniler	Gram (+)	-	-	AG	AG	AG	AG
<i>C. krusei</i>	Açık pembe koloniler	Gram (+)	-	+	AG	-	-	-

A= asit oluşumu, AG= asit ve gaz oluşumu

Bulgular

Bu çalışmada, tüketime sunulan 100 adet etsiz çiğ köfte örneği patojen *Candida spp.* yönünden analize alındı. Etsiz çiğ köfte örneklerinin 10'unda (%10) patojen *Candida spp.* saptandı. Pozitif örneklerin tamamı (%10) *Candida albicans* pozitif olarak tespit edildi. *Candida spp.* kontaminasyonu olan etsiz çiğ köfte örneklerinin 2'sinde (%2) *C. albicans* ve *C. krusei*, 2'sinde de (%2) *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* olmak üzere diğer patojen türlerle kontaminasyon olduğu tespit edildi. Ayrıca analiz edilen 100 etsiz çiğ köfte örneğinde maya-küf sayılarının minimum 3.00 log kob/g ile maksimum 7.34 log kob/g arasında olduğu, ortalama ise 4.934±0.093 log kob/g düzeyinde olduğu saptandı.

Tartışma ve Sonuç

Çiğ köftede hijyen ve patojen mikroorganizma varlığı yönünden yapılan birçok çalışma bulunmasına rağmen, yüksek mortalite oranına sahip patojen *Candida spp.* varlığının analizine yönelik herhangi bir çalışmanın olmadığı görülmüştür. Gıdalarda yapılan mikrobiyolojik analizlerde, toplam maya-küf sayısının uygun bulunması özellikle patojen *Candida spp.* içermediğini göstermemektedir. Toplam maya-küf sayısının yanında patojen mayaların da analizinin yapılması halk sağlığı açısından meydana gelebilecek risklerin önlenmesi bakımından önemlidir.

Etsiz çiğ köfte örneklerinde 4,934±0,093 log kob/g olarak bulduğumuz ortalama maya-küf değeri karşılaştırıldığında; Vural ve Yeşilmen [34] ile Cetin ve ark. [9] tarafından bulunan değerden daha düşük, Cerit ve ark. [7] tarafından bulunan değerden yüksek, Sancak ve İşleyici [29], Aslan ve ark. [2] ve

Küplülü ve ark. [17] tarafından bulunan değerlere benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

TSE K 144 Standardına [1] göre çiğ köftede maya-küf sayısı yönünden analiz edilen 5 örnekten 2 tanesinde bulunabilecek maksimum değer 10³ kob/g olarak belirtilmiştir. Analize alınan etsiz çiğ köfte örneklerinin %99'u TSE K 144 Standardında verilen değerlerin üzerinde olduğu görülmüştür. Ticari olarak satışa sunulan etsiz çiğ köftelerin ilave katkı maddesi ve bol miktarda baharat içermesi, açıkta yoğurulması, üretimde kullanılan ekipman ve malzemelerin temizliği, satış yerinin hijyenik koşulları ve personel hijyeninin kötü olması gibi nedenlerle tüketimi riskli gıdalardan biri olduğu düşünülmektedir. Etsiz hazırlansa bile herhangi bir ısıl işleme tabi tutulmadan tüketime sunulması, gıda zehirlenme olgularının görülmesine neden olabilir [9, 29]. Uzunlu [32] yaptığı çalışmada çiğ köftelerin içerisine katılan karabiberde 4,00 log kob/g, kuru soğanda 5.32 log kob/g ve yeşil soğanda 4.11 log kob/g maya-küf sayısı olduğunu tespit etmiştir. Baharatlarda ve katkı maddelerinde yüksek maya-küf sayısı üretim sonrası da mikrobiyal yükün yüksek olmasına neden olur. Diğer önemli bir risk ise tüketim sırasında organoleptik değişiklik gözlenmemesi tüketicinin ürünün tüketmesini engellemektedir.

Gıda örneklerinin mikrobiyolojik incelemesinde toplam maya ve küf sayısını gösteren besiyerlerinin yanında patojen mayaların varlığının da incelenmesi toplum sağlığı bakımından önemli olduğu düşünülmektedir. İnsanlarda büyük sağlık problemleri oluşturan patojen *Candida spp.*'nin kontamine gıdalar ile de vücuda alınarak hastalık oluşturabilir. Mikrobiyolojik kriterlere uygun gıdalarda bile patojen mayaların özellikle *Candida spp.*'ler bulunabilir. Gıdalarda kromojenik besiyerinin patojen *Candida*

spp.'lerin saptanmasında ve tür identifikasyonun da etkili olduğu, aynı zamanda kısa sürede sonuç verdiği görülmüştür.

Sonuç olarak; gün geçtikçe önemli sorunlar meydana getiren enfeksiyonlar içinde en sık görülen patojen *Candida* spp. türlerinin gıdalarda da tanımlaması, protokoller ve tebliğlerin içerisinde bulunması halk sağlığı açısından faydalı olacaktır.

Kaynaklar

- Anonim, (2012). Tüketime Hazır Etsiz Çiğ Köfte Standardı. TSE K 144. TSE, Ankara.
- Arslan A, Güven A, Saltan S, Patır B, (1992). Elazığ'da tüketime sunulan çiğ köftelerin mikrobiyolojik kalitesi. FÜ Sağlık Bil Derg. 6, 13.
- Bacteriological Analytical Manuel, (2001). Chapter 18 Yeasts, Molds and Mycotoxins. <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm071435.htm>. Erişim tarihi: 14.04.2017
- Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, Nicolau J, Coignard B, Tattevin P, Che D, Dromer F, (2014). Populationbased analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010. Emerg Infect Dis. 20, 1149-1155.
- Buck JD, (1978). Comparison of an in situ and in vitro survival of *Candida albicans* in seawater. Microb Ecol. 4, 291-302.
- Buck JD, Bubucis PM, (1978). Filter procedure for enumeration of *Candida albicans* in natural waters. Appl Environ Microbiol. 35, 237-242.
- Cerit İ, Deniz G, Yülecı T, Ergün BE, Aygün MG, Karaduman İ, Can C, Demirkol O, (2014). Sakarya İlinde Satışa Sunulan Etsiz Çiğ Köftelerin Fiziko-Kimyasal Özelliklerinin ve Monosodyum Glutamat İçeriğinin Belirlenmesi. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi. 9(3), 10-17.
- Cooper BH, Margarita SH, (1985). Yeast of medical importance. Balows A, Hausler WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. eds. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, DC. p.526-41,
- Çetin O, Bingöl EB, Akkaya H, (2008). The Microbiological, Serological and Parasitological Quality of Cig Kofte (Raw Meatball) and Its Lettuce Marketed in Istanbul. Polish J Environ Stud. 17, 701-706.
- Delikanlı B, Sönmez B, Özdemir Y, (2014). Bursa Merkezinde Tüketime Sunulan Etsiz Çiğ Köftelerin Mikrobiyolojik Kalitesi. Harran Üniv Vet Fak Derg. 3(1), 13-17.
- Dixon DM, Fromtling RA (1995). Morphology, taxonomy, and classification of the fungi. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA. eds. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington, DC. p.699-708.
- Gieraltowski L, Julian E, Pringle J, Macdonald K, Quilliam D, Marsden-Haug N, (2013). Nationwide outbreak of Salmonella Montevideo infections associated with contaminated imported black and red pepper: warehouse membership cards provide critical clues to identify the source. Epidemiol Infect. 141(6), 1244-52.
- Hampikyan H, Bingöl EB, Colak H, Aydın A, (2009). The evaluation of microbiological profile of some spices used in Turkish meat industry. J Food Agric Environ. 7(3/4), 111-15.
- Koburger JA, Marth EH, (1984). Yeasts and Moulds. Speck ML. ed. Compendium of Methods for the Examination of Foods A.P.H.A. Washington D.C. p.197-202
- Konemann WE, Allen SD, Janda MW, (1997). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. New York: Lippincott, p.983-1069.
- Kölgeliler S, Küçük A, Demir NA, Özçimen S, Demir LS, (2012). Yoğun Bakımlardaki Hastane Enfeksiyonları: Etiyoloji ve Predispozan Faktörler. Kafkas J Med Sci.2(1), 1-5.
- Küplülü Ö, Sarımehtemoglu B, Oral N, (2003). The microbiological quality of çiğ köfte sold in Ankara. Turk J Vet Anim Sci. 27, 325-329.
- Mogha KV, Shah NP, Prajapati JB, Chaudhari AR, (2014). Biofilm - A threat to dairy industry. Indian J Dairy Sci. 67(6).
- Moreira PL, Lourenço TB, Pinto JPAN, Rall VLM, (2009). Microbiological quality of spices marketed in the city of Botucatu, São Paulo, Brazil. J Food Prot. 72(2),421-424.
- Morrison CJ, Hurst SF, Reis E, (2003). Competitive binding inhibition enzyme-linked immunosorbent assay that uses the secreted aspartyl proteinase of *Candida albicans* as antigenic marker for diagnosis of disseminated candidiasis. Clin Diagn Lab Immunol. 10, 835-848.
- Mossela DAA, Kleynen-Semmeling MC, Vincenti HM, (1970). Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract Agar for Selective Enumeration of Moulds and Yeasts in Foods and Clinical Material. J Appl Bad. 33, 454-467.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, (2005). Fungal classification, structure, and replication. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. eds. Medical microbiology, 5th edn. Mosby, Philadelphia, Pennsylvania. p.67-73
- Odds FC, (1988). Candida and Candidosis. A review and bibliography. 2nd ed. London: BailliereTindall.
- Pascual A, (2002). Pathogenesis of catheter-related infections:Lessons for new designs. Clin Microbiol Infect. 8, 256-264.
- Pfaller MA, Diekema DJ, (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 20, 133-163.
- Pfaller MA, Houston A, Coffmann S, (1996). Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata* . J Clin Microbiol. 34, 58-60.
- Reisner BS, Woods GL, (1999). Specimen processing. Murray PR. eds. Manual of Clinical Microbiology 7.th edition, ASM Press Washington DC. p.64-104.
- Sagun E, Sancak YC, Durmaz H, Akkaya L, (1997). A study on hygienic quality of raw meat balls consumed in Van. YYU Vet Fac J. 3, 64.

29. Sancak YC, İşleyici Ö, (2006). Çiğ köftelerin mikrobiyolojik kalitesi üzerine bir araştırma. YYÜ Vet Fak Derg. 17, 81-86.
30. Spanamberg A, Ramos JP, Leoncini O, Alves SH, Valente P, (2009). High frequency of potentially pathogenic yeast species in goat's raw milk and creamed cheese in Southern Brazil. Acta Sci Vet. 37, 133-141.
31. Tümbay E, Seeliger HPR, Ang O, eds, (1991) *Candida* and *Candidamycosis*. New York: Plenum Press.
32. Uzunlu S, (2002). Çiğ Köftelerin Mikrobiyolojik Kalitesi ve Farklı Muhafaza Sıcaklık ve Sürelerinde Mikrobiyal Değişimin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
33. Valdes-Collazo L, Schultz AJ, Hazen TC, (1987) Survival of *Candida albicans* in tropical marine and fresh waters. Appl Environ Microbiol. 53(8), 1762-1767.
34. Vural A, Yeşilmen S, (2003). Diyarbakır'da satışı sunulan çiğ köftelerin mikrobiyolojik kalitesi üzerine bir araştırma. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 33, 350-355.
35. Warren NG, Haznen KC, (1999). *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. Murray PR. eds. Manual of Clinical Microbiology 7.th edition, ASM Press, Washington DC. p.1184-1199.

Evaluation of Different PCR Systems for the Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in Chicken Trachea

Serpil Kahya Demirbilek

Uludağ University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Bursa, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 19.04.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 17.05.2017

Abstract: In this work, we detected the MG-serologic condition by rapid plate agglutination tests, used Air Thermal Cycler (ATC PCR) (Idaho Technologies) and LightCycler real-time PCR system (LC PCR) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) for rapid and reliable detection of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) from tracheal swab samples of naturally infected breeder chickens, and determined MG-DNA detection limit by MG LC PCR from both pure culture and artificially spiked samples. One hundred and seventy seven tracheal swab samples from 16 flocks of 3 different companies were tested by LC PCR. Despite 117 chickens from 10 flocks were diagnosed as MG-seropositive, only 41 (35%) of tracheal swab samples from 3 (%30) flocks were found positive by LC PCR. Sixty (33.8%) of the samples from 6 MG-seronegative flocks were also found to be MG negative by LC PCR. Two hundred twelve MG-seropositive samples from 4 companies (3 of them are same companies tested previously by LC) were tested by ATC PCR and detected only 4 (1.8%) tracheal swab samples MG-positive. The LC PCR gives the results in approximately 6 hours DNA extraction, and is rapid and reliable confirmation and detection test ready to be implemented for screening MG-infected flocks in poultry companies.

Key words: Chicken, *Mycoplasma gallisepticum*, PCR

Farklı PCR Sistemlerinin Tavuk Trakeasından *Mycoplasma gallisepticum* Tespiti için Değerlendirilmesi

Özet: Bu çalışmada, *Mycoplasma gallisepticum* (MG) ile doğal enfekte damızlık tavuklarda kümeslerin MG seropozitivitesine çabuk serum aglütinasyon testiyle bakıldı, MG-DNA'sının tespitinde; Air Thermal Cycler (ATC) PCR (Idaho Technologies) ve hızlı, güvenilir bir metot olan LightCycler real-time PCR sistemleri (LC PCR) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) kullanıldı ve MG LC PCR'in hem saf kültür ve hem deneysel olarak kontamine edilmiş örneklerden MG DNA'sını tespit etme limiti belirlendi. Üç farklı firmaya ve 16 kümese ait 177 trakeal swap LC PCR ile çalışıldı. On kümeden 177 tavuk MG-seropozitif olarak teşhis edilmesine rağmen bunlardan sadece 3 (30%) kümeden alınan 41 (%35) tracheal örnek LC PCR ile pozitif bulundu. Altı MG-seronegatif kümeden alınan 60 örnek (%33.8) aynı zamanda LC PCR ile de MG negatif olarak bulundu. Daha önce aynı kümeslerin de dahil olduğu 4 farklı firmadan alınan 212 MG-seropozitif örneklerden sadece 4 tanesi (%1.8)'i ATC PCR ile pozitif bulunmuştu. Geliştirdiğimiz LC PCR, DNA ekstraksiyonu ile birlikte yaklaşık olarak 6 saatte sonuç vermektedir. Aynı zamanda kanatlı şletmelerinde MG-enfekte kümeslerin taranmasında kullanılabilecek hızlı ve güvenilir, hazır bir tespit ve doğrulama sistemidir.

Anahtar kelimeler: Tavuk, *Mycoplasma gallisepticum*, PCR

Introduction

Mycoplasma gallisepticum (MG) is a well-known cause of economically important diseases of domesticated chickens and turkeys [11]. MG account for substantial financial losses, owing to decreased egg production and increased mortality, as well as to additional costs for prevention and control of diseases [5]. MG can be transmitted vertically to affect progeny individually and can be spread horizontally to uninfected birds [13]. The flock screening is done by serological assays and the confirmation can be done by cultivation, recombinant DNA probes or

polymerase chain reaction (PCR) [15]. A presumptive Serum Plate Agglutination (SPA) test is routinely used for diagnosis of MG infection of chickens. However this test has drawbacks, the most important one being that seroconversion behind infections require a minimum of 1 week after infection for antibodies to be detected in agglutination and up to 3 weeks for positivity in Hemagglutination Inhibition (HI) test [6].

The gold standard for MG detection is the isolation and/or identification of the organism [12]. However, both procedures can take 10-20 days and

sometimes is unproductive because of overgrowth by bacteria or because of suppression effect by antibiotic therapy [15], and often have problems with specificity and sensitivity [16].

Real-Time PCR is one of the most sensitive methods for detecting and quantitating DNA, especially for low-abundance templates. Also, melting curve analysis after PCR enables identification of the specific PCR product [8]. With this approach, we were able to monitor the amplification of the newly synthesized MG-specific PCR product as a proportionally increasing fluorescent signal by using the double-stranded DNA binding dye SYBR Green I, for detecting MG in chicken tracheal swabs [4] by LightCycler (LC) PCR system.

In this work, we tested tracheal swab samples to optimize and detect MG by LC PCR system and Air Thermal Cycler (ATC) system.

Material and Methods

Bacterium and culture media

Mycoplasma gallisepticum S6 strain was kindly obtained from Pendik Veterinary Research Institute, İstanbul, Turkey. Strain propagation and enumerations were applied in Mycoplasma broth (Frey) (BD, Cat no: 212346) and PPLO agar base (Mycoplasma agar base) (BD, Cat no: 211456).

Field samples

Tracheal swabs were taken by scraping the mucosal surface of the trachea, partially cut off and put in microcentrifuge tubes containing 1 ml sterile physiological saline water and transferred to the laboratory. 212 live chickens belonging to 4 companies, with no antibiotic treatment, which were found to be seropositive by RPA tests, were tested by ATC PCR in first 2 year. Then, 177 samples of 16 flocks, with no antibiotic treatment from 3 different companies were tested with LC PCR.

Primers

The PCR primers (MG1 and MG2) were selected from a region within the sequence of MG lipoprotein gene partial codons, as previously described [4] to amplify the 400 bp product.

MG Serology

RPA (rapid plate agglutination tests) were performed using MG antigen (Soleil MG RPA-test) with sera samples. Sera and antigen were pre-heated to room temperature before used.

Isolation of DNA

MG S6 strain DNA and all tracheal swab DNAs were isolated with QIAMP DNA mini kit (QIAGEN Cat no: 51304, Germany), and 2 µl was used as template in PCR.

LC PCR

Each reaction had a volume of 20 µl including 18 µl of reaction mixture containing 1X FastStart DNA SYBR Green I Master Mix (Roche), MgCl₂ (4 mM), and 0,5 µM concentration of each primer and 2 µl of template DNA. Cycling parameters were: Initial denaturation at 95°C for 10 min; followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 10 sec, annealing at 50 °C for 5 sec, and extension at 72 °C for 20 sec. melting curve analysis was automatically performed by LightCycler 2.0 Software (Version 3), and the melting peaks were expected to have melting temperature (T_m) of 80°C.

ATC PCR

Each reaction contained; 2.5 µl 10 X MG PCR buffer (Roche), 0.3 µl Taq polymerase (Roche), 0.5 µl dNTP (Roche), 2 µl of each primer (50 pmol/µl), 1.5 µl MgCl₂ (25 mmol/µl) (Roche), 16.7 µl PCR grade water, and 2 µl template with cycling parameters as indicated above.

Template preparations for detection limit determination from pure culture and artificially spiked samples

For detection limit determination from pure culture, tenfold dilutions of stock MG S6 strain culture, with an initial concentration of 10⁸ CFU ml⁻¹, were prepared up to 10¹ in Mycoplasma broth (Frey). 100 µl was taken from each dilution in 900 µl sterile physiological saline water and vortexed. Suspensions were transferred to 1.5 ml microcentrifuge and their DNAs were isolated. For detection limit determination with artificially spiked samples, tracheal swabs artificially spiked with MG S6 strain were used. For this, 100 µl of ten fold dilutions from 10⁸ to 10¹ CFU ml⁻¹ of MG S6 strain culture was mixed indi-

vidual tracheal swabs were rinsed in 900 µl sterile saline water and vortexed 2 min. Swabs were discarded and 2 µl of the DNA was used as template in PCR.

Results

Detection limit of LC PCR with pure MG S6 strain culture and with artificially spiked samples

Sensitivity was found 1 and 100 CFU ml⁻¹ with pure MG S6 strain culture and artificially spiked samples, respectively.

Specificity of LC PCR

PCR yield specific Tm peaks of 78.4-80°C with all MG strains and all seropositive field samples, tested.

ATC PCR and LC PCR with field samples

One hundred and seventy seven tracheal swab samples from 25 flocks from 3 different companies were tested by LC PCR (Table1). Despite 117 chickens from 10 flocks were diagnosed as MG-seropositive only 41 (35%) of tracheal swab samples from 3 flocks were found positive by LC PCR. Sixty (33.8%) of the samples from 6 MG-seronegative flocks were also found to be MG negative by LC PCR. Two hundred twelve MG-seropositive samples from 4 companies (3 of them are same companies tested previously by LC) were tested by ATC PCR and detected only 4 (1.8%) tracheal swab samples MG-positive (Table 2).

Table 1. MG LC PCR results of seropositive and seronegative samples from flocks tested

Sample number	Company	Number of total flocks	Number of total samples	Number of positive flocks/serology	Number of positive samples
1	A	1	20	0/-	0
2	B	8	54	1/+	25
3	C	4	26	0/-	0
4	C	1	43	1/+	11
5	B	1	14	0/-	0
6	A	1	20	1/+	5
Total	3	16	177	3	41

Table 2. MG ATC PCR results from seropositive field samples

Sample number	Company	ATC PCR result/number of samples tested
1	A	-/15
2	B	-/6
3	C	1(+)/10
4	B	-/2
5	B	-/10
6	A	-/5
7	B	-/14
8	B	-/21
9	A	-/13
10	B	-/25
11	C	1(+)/14
12	B	-/11
13	A	-/10
14	C	1(+)/ 11
15	A	-/10
16	D	1(+)/35
Total	4	4/212

Discussion

In this study, we found that serology had higher sensitivity than LC PCR and ATC PCR. This can be explained by the presence of nonspecific agglutinations related to immunization with oil-adjuvanted vaccines, presence of either non-pathogenic *Mycoplasma* strains or other pathogenic *Mycoplasma* species in chickens [2,7]. Also this type of high reactor rate results can be related to the use of agglutination tests, which would occasionally give false positive responses due to their high sensitivity. Therefore, samples from seropositive flocks should absolutely be retested/confirmed by bacteriology or PCR as indicated [1]. Ley [11] and Lauerman [10] have indicated that infections caused by atypical MG strains might not be detected by SPA or HI tests, in which the antigens of the standard reference MG strains are used. This situa-

tion was related to the possible difference in antigenic make-up or tissue tropism of MG field strain leading to lower virulence and weaker antibody response, but still be detectable by PCR [9].

We observed a relatively higher detection sensitivity with pure culture than previously reported [4], where the authors indicated that this might have arisen from some inhibitory substances in tracheal swabs effecting template quality in PCR. In this study, we used a commercial DNA isolation kit, which enable us to obtain a standard quality template DNA and increased the sensitivity of LC PCR assay. Use of similar isolation kits to obtain template DNA for PCR have also been reported in several other studies [3,9,10,14].

We were able to detect MG specific PCR product in 25-30 minutes directly from crude DNA templates extracted from tracheal swabs of infected chickens. We have observed that there was a higher correlation between SPA and PCR positivity in LC than ATC PCR, indicating the superiority of LC specificity and sensitivity over ATC PCR. We conclude here that this optimized LC PCR is specific and sensitive enough to be reliably used for the detecting/screening MG-infected flocks.

This work was presented and published in 2. Mediterranean Poultry Summit of World of Poultry Science Association proceeding book.

References

1. Anonymous (2008). Manual of Diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.3.5. Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*). http://www.oie.int/eng/normes/manual/2008/pdf/2.03.05_%20avian_MYCO.pdf
2. Avakian AP, Kleven, SH, Glisson, JR, (1988). Evaluation of the specificity and sensitivity of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits, the serum plate agglutination test and the hemagglutination-inhibition test for antibodies formed in response to *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* 32, 262-272.
3. Callison SA, Riblet SM, Sun S, Ikuta N, Hilt D, Letting V, Kleven SH, Suarez DL, Garcia M, (2006). Development and validation of a real-time Taqman polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* in naturally infected birds. *Avian Dis.* 50, 527-544.
4. Carli KT, Eyigor A, (2003). Real-time polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken trachea. *Avian Dis.* 47, 712-717.
5. Garcia M, Jackwood MW, Levisohn S, Kleven SH, (1995). Detection of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* by multi-species polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Avian Dis.* 39, 606-612.
6. Garcia M, Ikuta N, Levisohn S, Kleven SH, (2005). Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Avian Dis.* 49, 125-132.
7. Glisson JR, Dawe JF, Kleven SH, (1984). The effect of oil-emulsion vaccines on the occurrence of nonspecific plate agglutination reactions for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.* 28, 397-405.
8. Harasawa R, Mizusawa H, Fuji M, Yamamoto J, Mukai H, Uemori T, Asada K, Kato I, (2005). Rapid detection and differentiation of the major *Mycoplasma* contaminants in the cell cultures using Real-Time PCR with SYBR Green I and melting curve analyses. *Microbiol Immunol.* 49, 859-863.
9. Kleven SH, (1998). Mycoplasmas in the etiology of multifactorial respiratory diseases. *Poult Sci.* 77, 1146-1149.
10. Lauerman LH, (1998). *Mycoplasma* PCR assays, In: Lauerman LH (Ed) *Nucleic Amplification Assays for Diagnosis of Animal Disases*, American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Auburn, AL, USA, pp. 41-52.
11. Ley DH, Berkhoff JE, McLaren JM, (1996). *Mycoplasma gallisepticum* isolated from house finches (*carpodacus mexicanus*) with conjunctivitis. *Avian Dis.* 40, 480-483.
12. Ley DH, (2003). *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: Saif YM, Barnes HJ, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR & Seayne DE (Eds), *Diseases of Poultry*. Ames, Iowa State University Press, USA, 11th ed., pp. 122-144.
13. Moscoso H, Thayer SG, Kleven SH, (2004). Materials and methods optimization and application of PCR for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.* 48, 841-850.
14. Raviv Z, Kleven SH, (2009). The development of diagnostic real-time PCR's for the four pathogenic avian *Mycoplasmas*. *Avian Dis.* 53, 103-107.
15. Silveria RM, Fiorentin I, Marques EK, (1996). Polymerase chain reaction optimization for *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* diagnosis. *Avian Dis.* 40, 218-222.
16. Slavik MF, Wang RF, Cao WW, (1993). Development and evaluation of polymerase chain reaction method for diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* infections in chickens. *Mol Cell Probes.* 7, 459-463.

Çörek Otu (*Nigella sativa*) Yağının Gökkuşluğu Alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) Karaciğer Yağ Asidi Profiline Etkisi

Mustafa Öz

Su Ürünleri ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Veteriner Fakültesi, Aksaray Üniversitesi, Aksaray, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 17.04.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 03.06.2017

Özet: Bu çalışmada gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yemine %0.0, %0.10, %0.40, %0.70, %1.0 ve %1.3 oranında çörek otu yağı ilave edilmiş ve 120 gün besleme yapılmıştır. Çalışmada alabalık yemine ilave edilen çörek otu yağının karaciğer yağ asidi profiline etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın başında ortalama ağırlığı 90 gram olan balıklara günde 3 defa serbest yemleme yapılmıştır. Besleme periyodu sonunda balıklar sırası ile; 260 g, 270 g, 272 g, 265 g, 290 g ve 285 g canlı ağırlığa ulaşmıştır. Araştırmada karaciğer temel yağ asitleri miristik asit, palmitik asit, palmitoleik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asit, linolenik asit, eikosapentaenoik asit ve dekosaheksaenoik asit olarak belirlenmiştir. Balık karaciğerinin toplam doymuş yağ asitleri (SFA) 19.28 – 21.13; Toplam tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) 24.13 – 29.89 ve toplam çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) 47.23 – 52.23 arasında değişmektedir. Sonuç olarak; alabalık yemine ilave edilen çörek otu yağı oleik asit, adrenik asit, linoleik asit ve miristik asit seviyelerinde artışa sebep olurken; palmitik asit, stearik asit, eikosapentaenoik asit ve dokosaheksaenoik asit seviyelerinde ise azalmalara sebep olmuştur. Ayrıca yeme ilave edilen çörek otu yağı karaciğerin toplam SFA ve toplam PUFA miktarının azalmasına, toplam MUFA'nın ise artmasına sebep olmuştur.

Anahtar kelimeler: Çörek otu yağı, gökkuşluğu alabalığı, karaciğer, yağ asitleri

Effect of Black Cumin Oil (*Nigella sativa*) on Liver Fatty Acid Profile of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Abstract: In this study, rainbow trout were fed for a total of 120 days with different feed mixes containing 0.00%, 0.10%, 0.40%, 0.70%, 1.00% and 1.30% black cumin oil. In the study, the effect of black cumin oil added to the trout diet on the fatty acid profile of the liver was investigated. At the beginning of the study, fish with an average weight of 90 grams were free-fed three times a day. At the end of the feeding period, fish weight reached; 260 g, 270 g, 272 g, 265 g, 290 g and 285 g respectively. The effect of black cumin oil on liver fatty acid composition of rainbow trout was researched. The predominant fatty acids in liver were found as myristic acid, palmitic acid, palmitoleic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. In the study, total saturated fatty acids (SFA) of fish liver were found 19.28 - 21.13; Total monounsaturated fatty acids (MUFA) 24.13 - 29.89 and total polyunsaturated fatty acids (PUFA) 47.23 - 52.23 respectively. As a result, the addition of black cumin oil the meal caused increases in oleic acid, adrenic acid, linoleic acid and myristic acid levels while causing decreases in Palmitic Acid, Stearic Acid, Eicosapentaenoic acid and Dokosaheksaenoic acid levels. In addition, black cumin oil added to the fish diet led to a decrease in the total saturated fatty acids and total polyunsaturated fatty acids in the liver and an increase in total monounsaturated fatty acids.

Key words: Black cumin oil, liver, rainbow trout, fatty acids

Giriş

Artan dünya nüfusu ile birlikte insanlığın protein ihtiyacının karşılanmasında su ürünleri önemli bir yere sahiptir. Doğadan avlanan su ürünlerini dünya nüfus artışı ve protein ihtiyacına paralel olarak arttırmak mümkün değildir. İnsanlığın su ürünleri ihtiyacının karşılanmasında avcılık değil de yetiştiricilikle sağlanan ürün miktarını arttırmak zorunlu hale gelmiştir. Dünya su ürünleri üretiminde avcılık değerlerine bakıldığında 2008 yılı ile 2014 yılların-

da 90 milyon ton ile 93 milyon ton arasında dalgalanma görülmüştür. Fakat yetiştiricilik yolu ile elde edilen üretim miktarlarına bakıldığında sürekli bir artış göze çarpmaktadır [1].

Ülke nüfusunun hayvansal protein açığının kapatılmasında, yeterli ve dengeli beslenme düzeyine erişilmesinde su ürünleri son derece önemli bir yere sahiptir. Entansif koşullarda balık yetiştiriciliğinin amaç; ekonomik koşullarla en kısa sürede balıkların istenilen düzeye getirilmesidir. Bunun sağlanması

için uygun şekilde hazırlanmış yemlerle balıkların yeterli bir şekilde beslenmesi gerekmektedir [2, 3].

Balıklarda enerji ihtiyacı lipitlerden karşılanır ve lipitler, balıklarda farklı dokularda, özellikle kas dokusunda, iç organlar arasında ve karaciğerde depolanır. Balık karaciğerinin incelenmesi, diyetteki besin maddelerinin gelişme ve büyüme üzerindeki etkilerini görmemizi ve balığın sağlıklı bir şekilde beslenip beslenmediğini anlamamızı sağlayan en önemli işlemlerden biridir. Diyetlerin lipit oranın yüksek olması ve kullanılan lipitlerin dengeli bir şekilde esansiyel yağ asitlerini içermemesi, balık karaciğerinde yüksek oranda lipit depolanmasına neden olur. Bu durumun karaciğer dejenerasyonuna neden olduğu bildirilmiştir [4].

Akua kültürdeki temel amaç, yeterli sayıda yavru üretilip bunları mümkün olan en kısa zamanda ve en düşük maliyetle pazar ağırlığına ulaştırmaktır. Balıkların yaşaması, büyümesi, üremesi, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklı olabilmesi için yetiştiriciliği yapılan balık türünün yeterli ve kaliteli yemlerle beslenmesi gerekmektedir. Besin maddeleri bakımından yeterli ve dengeli rasyonlarla yapılacak besleme, balık üretimini ekonomik bir hale getirecek ve balık yetiştiriciliğinin gelişmesini hızlandıracaktır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde performansı artırmak, balık sağlığını korumak ve birim alandan elde edilen ürün miktarını ve kalitesini olumlu yönde etkilemek için çeşitli yem katkı maddeleri kullanılmaktadır [5, 6].

Çörek otu çok eskiden beri bilinen bir kültür bitkisidir ve çörek otunun besin içeriği; %20.8 ham protein, %3.7 ham kül, %7.0 nem, lipit % 34.8 ve % 33.7 karbonhidrattan oluşmaktadır [7]. Çörek otunun; Antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiprotozoan, antihistaminik, antioksidan, antiinflamatuvar ve immünostimulant etkileri olduğu bildirilmiştir. Özellikle de astım, hipertansiyon, enflamasyon, öksürük, bronşit, baş ağrısı, egzama, grip, ateş, baş dönmesi gibi birçok hastalıklarda kullanılmaktadır [8]. Balık yemine çörek otu yağı ilave edilmesi balıklarda büyüme hızını arttırmak ve balık sağlığını korumak için tavsiye edilmektedir [5].

Bu çalışmada gökkuşacağı alabalığının karaciğer yağ asitlerindeki değişimler incelenerek, depo organ olan karaciğerin verilen yemlerden etkilenip etkilenmediği ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Materyal ve Metod

Denemenin hazırlanması

Araştırmada özel bir yem firmasından alınan ticari alabalık yemi (Abalıoğlu Blueaq, Denizli, Türkiye) kullanılmıştır. Balık yemi üzerine soğuk presle üretilmiş çörek otu yağı püskürtme tekniği ile ilave edilmiş ve homojen bir hal alana kadar karıştırılmıştır. Alabalık yemine ilave edilen soğuk preste üretilen çörek otu yağının yağ asidi profili Tablo 1 de verilmiştir.

Tablo 1. Balık yemine ilave edilen çörek otu yağının yağ asitleri

Çörek otu yağının yağ asitleri (%)		
C14:0	Miristik asit	0.46±0,02
C14:1	Miristoleik asit	0.72±0,27
C16:0	Palmitik asit	12.47±0,08
C16:1	Palmitoleik asit	1.10±0,22
C18:0	Stearik asit	3.45±0,11
C18:1 n9	Oleik asit	27.37±0,82
C18:2 n6	Linoleik asit	49.72±1,44
C18:3 n3	Linolenik asit	0.355±0,03
C20:1	Ekosenoik asit	2.295±0,02

n=5

Bu çalışmada Adana-Pozantı bölgesinde bulunan Öz Alabalık Üretim Tesisi'nden temin edilen 90 g ağırlığındaki gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) materyal olarak kullanılmıştır. Denemeye 3 tekerrürlü olarak, 18 havuzda 150'şer adet balık ile başlanmış toplamda 2700 adet balık kullanılmıştır. Kullanılan balıkların başlangıç ağırlığı 90 gram olup besleme periyodu sonunda balıklar sırasıyla; 260 g, 270 g, 272 g, 265 g, 290 g ve 285 g canlı ağırlığa ulaşmıştır. Deneme sonunda her bir havuzdan rastgele 30 adet balık alınarak soğuk muhafaza koşulları altında Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Avlama İşleme Teknolojisi Bölümü İşleme Teknolojisi ABD Laboratuvarına götürülmüş ve balıkların karaciğeri alınarak analizlere başlanmıştır.

Yağ Asitleri Tayini

Lipit analizi Bligh ve Dyer [9]'in uyguladığı yöntem göre yapılmıştır. 10-15g homojenize edilmiş örnek, üzerine 120 ml metanol/kloroform (1/2) eklendikten sonra Ultratoraks (T 25 basic IKA-WERKE) ile karıştırılmıştır. Daha sonra bu örnekler üzerine

20 ml %0,4'lük CaCl₂ solüsyonundan eklenerek filtre kâğıdından (Schleicher & Schuell, 5951/2 185 mm) süzülen örnekler, 105°C'de 2 saat etüvde bekletilip darası alınmış olan balon jöjelere süzdürülmüştür. Bu balonlar ağzları hava almayacak şekilde kapatılıp 1 gece karanlık bir ortamda bekletilmiş ve ertesi gün metanol-sudan oluşan üst tabaka bir ayırma hunisi yardımıyla alınmıştır. Balonların içinde kalan kloroform-lipit kısmından kloroform +60°C'de su banyosunda rotary evaporatör kullanılarak uçurulmuştur. Daha sonra balonlar etüvde 1 saat süreyle 60°C'de bekletilerek içerisindeki kloroformun tamamının uçması sağlanmış ve bir desikatör içerisinde oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Tartımları yapılan balonların içerisine 2ml n-heptan eklenerek yağlar çözdürülmüş ve yağ asidi tayini için 15 ml'lik falcon tüplerine alınmıştır.

Ekstrakte edilmiş lipitten, yağ asidi metil esterleri Ichibara ve ark., [10] metoduna göre yapılmıştır.

Bulgular

Yemlerine farklı oranlarda çörek otu yağı ilave edilmiş yemle beslenen gökkuşluğu alabalığının karaciğer yağ asidi profili Tablo 2'de gösterilmiştir. Bütün gruplardaki balıkların karaciğerlerinde 20 farklı yağ asidi belirlenmiştir. Balık karaciğerlerinde temel yağ asitleri; miristik asit (C14:0), palmitik asit (C16:0), stearik asit(C18:0), oleik asit (C18:1 n9), linoleik asit (C18:2 n6), vakkenik asit (C18:1 n7), linolenik asit (C18:3 n3), eikosenoik Asit (C20:1), eikosapentaenoik asit (C20:5 n3), gamma-linolenik asit (C20:3 n6), dokosaheksaenoik asit (C22:6 n3) olarak belirlenmiştir. Ayrıca çalışmamızda balık karaciğerinin toplam doymuş yağ asitleri (SFA) 19.28 – 21.13; toplam tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) 24.13 – 29.89 ve toplam çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) 47.23 – 52.23 arasında değişmekte olduğu bulunmuştur.

Tablo 2. Çörek otu yağı ilave edilmiş yemle beslenen gökkuşluğu alabalığı karaciğerinin yağ asitleri

Yağ Asitleri	Gruplar					
	G1	G2	G3	G4	G5	G6
C14:0 (Miristik Asit)	1,21	1,64	1,68	1,79	1,87	1,99
C16:0 (Palmitik Asit)	13,18	13,07	12,63	12,31	12,22	12,03
C16:1 (Palmitoleik Asit)	1,60	2,71	2,17	2,52	1,93	1,98
C17:0 (Margarik asit)	0,31	0,17	0,21	0,25	0,3	0,23
C18:0 (Stearik Asit)	6,27	5,77	5,66	5,75	5,08	4,72
C18:1n9 (Oleik Asit)	17,24	18,5	19,04	20,43	21,21	21,71
C18:1n7 (Cis-vakkenik asit)	2,73	2,84	2,88	2,98	3,05	3,09
C18:2 n6 (Linoleik Asit)	6,69	7,57	7,81	8,22	8,27	8,59
C18:3 n6 (Gamma-linolenik asit)	0,19	0,11	0,18	0,15	0,14	0,26
C18:3 n3 (Linolenik asit)	1,29	1,33	1,46	1,53	1,66	1,69
C20:0 (Araşidik asit)	0,16	0,35	0,35	0,43	0,27	0,31
C20:1 (Cis-11-Eikosenoik Asit)	2,56	2,91	2,91	3,01	2,74	3,11
C20:2 cis (Eikosadienoik)	1,43	1,24	1,34	1,22	1,36	1,59
C20:3 n6 (Gamma-linolenik asit)	4,01	3,72	3,43	2,56	2,98	2,57
C20:4 n6 (Araşidonik asit)	0,32	0,31	0,32	0,32	0,30	0,30
C20:3 n3 (Eikosatrienoik asit)	0,55	0,67	0,73	0,83	0,62	0,72
C20:5 n3 (Eikosapentaenoik asit)	4,95	4,48	4,2	4,01	3,62	3,27
C22:4 n6 (Adrenik asit)	0,47	0,91	0,99	1,06	1,11	1,12
C22:5 n3 (Dokosapentaenoik asit)	1,37	0,69	1,38	1,68	1,42	1,29
C22:6 n3 (Dokosaheksaenoik asit)	30,96	28,68	28,41	26,11	26,62	25,83
ΣSFA	21,13	21,00	20,53	20,53	19,74	19,28
ΣMUFA	24,13	26,96	27,00	28,94	28,93	29,89
ΣPUFA	52,23	49,71	50,25	47,69	48,1	47,23
Toplam	97,49	97,67	97,78	97,16	96,77	96,4
Belirlenemeyen	2,51	2,33	2,22	2,84	3,23	3,60

n=5

Tartışma ve Sonuç

Gökkuşacağı alabalığının karaciğer yağ asidi bileşimleri beslenme ve lipit kaynağından etkilenmiş ve birçok yağ asidi miktarında azalma ya da artışlar gözlenmiştir. Araştırmada balık yemine çörek otu yağı ilavesi miristik asit seviyesinde artışa sebep olurken palmitik asit ve palmitoleik asit seviyesinde düşme olduğu belirlenmiştir. Dernekbaşı [11] yaptığı çalışmada bizim çalışmamızla benzer şekilde palmitik asit ve palmitoleik asit seviyesinde düşme olduğunu rapor etmiştir.

Stearik Asit (C18:0) seviyesi 4.72 - 6.27 arasında bulunmuştur. Daha önce yapılan bir çalışmada da stearik asidin 8.17-10.62 arasında değiştiği rapor edilmiştir [12].

Araştırmada, besleme periyodu sonunda Linoleik Asit (C18:2 n6) ve Oleik Asit (C18:1n9) seviyelerinde artış olmuştur. Çalışmamızla benzer şekilde Dernekbaşı yaptığı çalışmada kanola yağı içeren yemle yapılan besleme sonunda gökkuşacağı alabalığı karaciğerinde linoleik asit (C18:2 n6) ve oleik asit (C18:1n9) seviyelerinin arttığı bildirmiştir [11]. Başka bir çalışmada da benzer şekilde, yapay diyetle beslenmeleri nedeniyle kültür gökkuşacağı alabalığı kasında linoleik asit (C18: 2n-6) ve oleik asit (18: 1n-9) yüksek miktarda gözlenmiştir [13]. Başka bir çalışmada da gökkuşacağı alabalığı yemine ilave edilen bitkisel yağlar palmitik asit (C16:0), stearik asit (C18:0) ve linoleik asit (C18: 2n-6) seviyesinde artışa sebep olmuştur [14].

Araştırmada EPA miktarı 4.95 ile 3.27, DHA miktarı ise 30.96 – 25.83 arasında değişmektedir. Başka bir çalışmada da tatlı su ve denizde yaşayan gökkuşacağı alabalığının karaciğer EPA miktarı 6.16 - 2.45 DHA miktarı ise 25.9 - 24.9 arasında değiştiği rapor edilmiştir [15]. Gökkuşacağı alabalığının karaciğer EPA ve DHA düzeyleri, araştırmada kullanılan çörek otu yağı içeren diyetlerden önemli derecede etkilenmiş ve kontrol gurubu ile kıyaslandığında DHA ve EPA miktarlarının düşmesine sebep olmuştur. Çalışmamızla benzer şekilde başka çalışmalarda da yeme ilave edilen bazı yağ kaynakları DHA ve EPA miktarlarında düşüşe sebep olmuştur [16, 11]. Şener ve Yıldız [14] yaptıkları çalışmada balık yağı, soya yağı ve ayçiçeği yağının gökkuşacağı alabalığı karaciğer yağ asitleri üzerine etkilerini araştırmışlar. Bizim çalışmamızla benzer şekilde bitkisel yağ

kullanılan gruplarda DHA ve EPA miktarında düşüş gözlenmiştir.

Araştırmada balık karaciğerinin toplam SFA 19.28 ile 21.13; Toplam MUFA 24.13 ile 29.89 ve toplam PUFA 47.23 ile 52.23 arasında değişmektedir. Çalışmamızda elde edilen bu sonuçlar literatür ile de uyumludur.

Farklı bitkisel yağların (hindistan cevizi yağı, zeytin yağı, ayçiçeği yağı, keten tohumu yağı ve balık yağı) Labeo rohita'nın büyümesi ve yağ asit profili üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada toplam SFA 36.36 ile 40.33; toplam MUFA 29.85 ile 32.66 ve toplam PUFA ise 31.45 ile 28.97 arasında rapor edilmiştir [17].

Susam yağının gökkuşacağı alabalığı karaciğeri yağ asitleri üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada toplam SFA 18.96 ile 21.91; toplam MUFA 28.23 ile 40.73 ve toplam PUFA ise 36.55 ile 45.58 arasında rapor edilmiştir [18].

Bu çalışmada farklı oranlarda çörek otu yağı ilave edilmiş yemle beslenen gökkuşacağı alabalığının karaciğer yağ asidi profili incelenmiştir. Araştırma sonunda balık yemine ilave edilen çörek otu yağının gökkuşacağı alabalığının karaciğer yağ asitlerini önemli seviyede değiştirdiği tespit edilmiştir. Çörek otu yağı oleik asit, adrenik asit, linoleik asit ve miristik asit seviyelerinde artışa sebep olurken, palmitik asit, stearik asit, eikosapentaenoik asit ve dokosaheksaenoik asit seviyelerinde ise azalmalara sebep olmuştur. Ayrıca balık yemine ilave edilen çörek otu yağının karaciğerin toplam SFA ve toplam PUFA miktarının azalmasına, toplam MUFA miktarının artmasına sebep olmuştur.

Kaynaklar

- Öz M, (2016b). Nutrition and Gender Effect on Body Composition of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). JAVST 2016; 1(1): 20-25.
- Öz M, (2016a). Türkiye Su Ürünleri Üretiminde Gökkuşacağı Alabalığının Yeri. 4th International Kop Local Development Symposium, 21-23/10/2016 Karaman, Turkey.
- Keskin YE, Erdem M, (2005). Gökkuşacağı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Yetiştiriciliğinde Farklı Oranlarda Ekstrüde Yem Kullanımının Balıkların Gelişmesine Etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi. Cilt I, Sayı I, 49-57 (2005).
- Caballero MJ, Lopez-Calero G, Socorro J, Roo FJ, Izquierdo MS, Fernandez AJ, (1999). Combined effect of lipid level

- and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 179:277-290.
5. Öz M, Dikel S, Durmuş M, Özoğul Y, 2017. Effects of Black Cumin Oil (*Nigella sativa*) on Sensory, Chemical and Microbiological Properties of Rainbow Trout during 23 Days of Storage at $2 \pm 1^\circ\text{C}$. *Journal Of Aquatic Food Product Technology*, <http://dx.doi.org/10.1080/10498850.2016.1253631>.
 6. Erdem M, (2000). Balık Besleme ve Yem Teknolojisi Ders Notları. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sinop Su Ürünleri Fakültesi, Sinop, 140 sayfa.
 7. Atta MB, (2003). Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chem*. 83: 63–68.
 8. Altınterim B, (2010). Çörek otu (*Nigella sativa*, L) Yağının Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 250 1792)'nın İmmün Sistemine Etkisinin Araştırılması. Doktora tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Sayfa 6–7. Elazığ.
 9. Bligh EG, Dyer WJ, (1959). "A Rapid Method of Total Lipid Ekstraktion and Purification, Can". *J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917.
 10. Ichibara K, Shibahara A, Yamamoto K, Nakayama T, (1996). "An improved method for rapid analysis of the fatty acids of glycerolipids". *Lipids* 31:535-539.
 11. Dernekbaşı S, (2012). Digestibility and liver fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed by graded levels of canola oil. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12 (1), 105-113.
 12. Görgün S, Akpınar MA, (2007). Liver and muscle fatty acid composition of mature and immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two different diets. *Biologia*, 62 (3), 351-355.
 13. Öksüz A, (2000). Quality indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*): A comparative study, Ph.D. Thesis, University of Lincolnshire & Humberside.
 14. Şener E, Yıldız M, (2003). Effect of the different oil on growth performance and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792) juveniles. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 3(2).
 15. Haliloğlu Hİ, Bayır A, Sirkecioğlu AN, Aras NM, Atamanalp M, (2004). Comparison of fatty acid composition in some tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) living in sea water and fresh water. *Food Chemistry*, 86 (1), 55-59.
 16. Fonseca-Madruga LJ, Karalazos V, Campbell PJ, Bell JG, Tocher DR, (2005). Influence of dietary palm oil on growth, tissue fatty acid compositions, and fatty acid metabolism in liver and intestine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, 11(4), 241-250.
 17. Karanth, S, Sharma P, Pal AK, Venkateshwarlu G, (2009). Effect of different vegetable oils on growth and fatty acid profile of rohu (*Labeo rohita*, Hamilton); evaluation of a return fish oil diet to restore human cardio-protective fatty acids. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22(4), 565-575.
 18. Köse I, Yıldız M, (2013). Effect of diets containing sesame oil on growth and fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology*, 29(6), 1318-1324.

