

ISSN 1016-3573



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



ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ

JOURNAL OF ETLİK VETERINARY MICROBIOLOGY
ANKARA – TURKEY

Cilt/Volume 30 ♦ Sayı/Number 1 ♦ 2019

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi
Cilt/Volume 30 ♦ Sayı/Number 1 ♦ 2019
Journal of Etlik Veterinary Microbiology
Yılda iki kez yayımlanır (Haziran-Aralık)
Published two times per year (June-December)

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

Özcan Yıldırım

Editör / Editor in Chief

Dr. Erdem Danyer

Dr. Selçuk Pekkaya

Bilimsel Kurul / Editorial Board

Dr. Erhan Akçay

Dr. Ali Erkurt

Doç.Dr. Burhan Toprak

Dr. Yeliz Yıkılmaz

Dr. Özlem Altıntaş

Uzm. Yusuf Ziya Kaplan

Uzm. Sabri Hacıoğlu

Uzm. Bahadır Kılınç

Ufuk Erol

Çağla Korkmaz

Neslihan Akbulut Tosun

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 : <https://vetkontrol.tarimorman.gov.tr/merkez>

E-posta : etlikdergi@tarimorman.gov.tr

Hakem Listesi / Referee List*

Dr. Zafer ATA	Gemlik Askeri Veteriner Okulu Gıda Kontrol ve Araştırma Merkezi Başkanlığı
Dr. Ceren AŞTI	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD.
Dr. Nüvit COŞKUN	Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji AD.
Prof. Dr. T. Haluk ÇELİK	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknoloji AD.
Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Doç. Dr. Hüsamettin EKİCİ	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji AD.
Dr. Aysel EKİNCİ	Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Parazitoloji Laboratuvarı
Doç. Dr. Serkal GAZYAĞCI	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıklar AD.
Prof. Dr. Muammer GÖNCÜOĞLU	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknoloji AD.
Doç. Dr. Elçin GÜNAYDIN	Hitit Üniversitesi Alaca Avni Çelik Meslek Yüksekokulu
Dr. Ahmet Burak GÜNGÖR	Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enst. Müdürlüğü Antraks Aşı Üretim Lab.
Doç. Dr. Esin GÜVEN	Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD.
Prof. Dr. Mehmet HALIGÜR	Çukurova Üniversitesi Ceyhan Veteriner Fakültesi Patoloji AD.
Dr. Güzin İPLİKÇİOĞLU ÇİL	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknoloji AD.
Dr. İlke KARAYEL HACIOĞLU	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji AD.
Dr. Erhan KEYVAN	Mehmet Akif Ersoy Üniv. Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi AD.
Prof. Dr. Oğuz KUL	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji AD.
Doç. Dr. Hamit Kaan MÜŞTAK	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Doç. Dr. Ertan Emek ONUK	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fak. Su Ürünleri ve Hastalıkları AD.
Doç. Dr. Taraneh ÖNCEL	Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Parazitoloji Laboratuvarı
Prof. Dr. Serap SAVAŞAN	Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Dr. Emrah ŞİMŞEK	Erciyes Üniversitesi Parazitoloji AD.
Doç. Dr. Armağan Erdem ÜTÜK	Çukurova Üniversitesi Ceyhan Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD.
Doç. Dr. Banu YARDIMCI	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fak. Su Ürünleri ve Hastalıkları AD.
Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD.
Prof. Dr. Yakup YILDIRIM	Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji AD.

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

Bu sayıya kadar dergimizin yazı işleri müdürlüğü görevini yürüten Dr. A. Burak Güngör ve editörlük görevini yürüten Dr. T. Onur Kevenk'e özverili çalışmaları ve bu sayıya olan katkılarından dolayı teşekkürlerimizi sunarız.

ULAKBİM Yaşam Bilimleri, Türkiye Atf Dizini ve CAB Abstracts veritabanları kapsamında bulunan "çift hakemli" bir dergidir.

Copyright © Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2019, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

Basım Tarihi / Publishing Date: Haziran / June 2019, 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

Araştırma Makalesi / Research Article

Köpeklerde Burun Boşluğundan *Pseudomonas aeruginosa*'nın İzolasyonu ve Antibiyotik Duyarlılıkları

Isolation and Antibiotic Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from Nasal Cavity in Dogs

Seyfullah Zeyrek, Göksel Erbaş 1

Sığır, Koyun ve Keçilerin Bovine Parainfluenza 3 Virus Enfeksiyonuna Duyarlılıklarının Saha Şartlarında Serolojik Olarak Karşılaştırılması

Serological Comparison of Sensitivity of Cattle, Sheep and Goats to Bovine Parainfluenza 3 Virus Infection in Field Conditions

Sibel Gür 7

The Investigation of Cell Adhesion Molecules in the Lung Tissues of Cattle with Cystic Echinococcosis

Kistik Ekinokokkozisli Sığır Akciğerlerinde Hücre Adezyon Moleküllerinin Araştırılması

Orhan Yavuz, Güngör Çağdaş Dinçel, Sami Gökpinar, Ali Evren Haydardedeoğlu 14

Aydın İlinde Tüketime Sunulan Çöp Şişlerin Mikrobiyolojik Kalitesinin İncelenmesi

Examination of the Microbiological Quality of Çöp Şiş Available for Consumption in the Province of Aydın

Hilal Demirpençe, Devrim Beyaz, Sadık Savaşan 20

Erken Olgunlaşma Dönemindeki Geleneksel Peynir Mikrobiyomunun Metagenomik Analizi

Metagenomic Analysis of the Early Ripened Continental Cheese Microbiome

Sadık Savaşan, Devrim Beyaz 27

Şanlıurfa'da Yerleşik Damızlık Atlarda Batı Nil Virüsü (BNV) Enfeksiyonu'nun Serolojik ve Virolojik Olarak Araştırılması

Serological and Virological Investigation of West Nile Virus Infection in Resident Breeder Horses at Şanlıurfa Province

Rahime Adalet Duyum, Taner Karaoğlu 36

Zencefil'in Antibakteriyal Etkisi

Antibacterial Effect of Zingiber Officinale (Ginger)

Çiğdem Güceyü, Gülşen Goncagül, Elçin Günaydın, Pınar Akpınar 44

***Brucella abortus* S-19 Aşısının Liyofilizasyon Öncesi Farklı Liyoprotektanlar ile Kritik Formülasyon Sıcaklıklarının Araştırılması**

Investigating the Critical Formulation Temperatures of *Brucella Abortus* S-19 Vaccine With Different Liyoprotectants Prior to Liyophilisation

Mustafa Sencer Karagül, Buket Eroğlu 51

***Borrelia burgdorferi* ile Doğal Enfekte Köpeklerin Nötrofil-Lenfosit, Monosit-Lenfosit ve Platelet-Lenfosit Oranlarının Belirlenmesi**

Detection of Neutrophil–Lymphocyte, Monocyte- Lymphocyte and Platelet–Lymphocyte Ratios in Dogs Naturally Infected with *Borrelia burgdorferi*

Kübra Çakır, Didem Pekmezci58

Molecular Characterization of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Raphidascarididae) Larvae Infecting *Merlangius merlangus euxinus* (Linnaeus, 1758) from the Turkish Black Sea Coast Based on Mitochondrial Small Subunit Ribosomal RNA Gene Analysis

Türkiye'nin Karadeniz Kıyılarındaki *Merlangius merlangus euxinus*'u (Linnaeus, 1758) Enfekte Eden *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Raphidascarididae) Larvasının Küçük Alt Ünite Ribozomal RNA Gen Bölgesine Göre Moleküler Karakterizasyonu

Gökmen Zafer Pekmezci.....64

Enfeksiyöz Nekrotik Hepatit Aşısının Üretiminde Poli (D, L-Laktik-Ko-Glikolik Asit) (PLGA) Biyopolimerinin Adjuvant Etkisinin Araştırılması

Investigation of Adjuvant Effect of Poly (D, L-Lactic-Co-Glycolic Acid) (PLGA) Biopolymer in the Vaccine Production Against Infectious Necrotic Hepatitis

Zehra Akıncı, Hakan Kalender70

Atık Yapan Sığırlarda Anti-*Neospora caninum* Antikorlarının Yaygınlığının Araştırılması

Distribution of Anti-*Neospora caninum* Antibodies in Cattle with Abortion History

Ufuk Erol, Erdem Danyer, Selim Tuncer, Çağla Korkmaz, Ahmet Deniz78

Altın Çakal'da (*Canis aureus* Linnaeus, 1758) Bulunan Helmint Enfeksiyonları ve Zoonotik Önemi

Helminth Infections in Golden Jackals (*Canis aureus* Linnaeus, 1758) and Their Zoonotic Importance

Ufuk Erol, Gökben Özbakış Beceriklisoy, Erdem Danyer, Dilek Tekyiğit, H. Oğuz Sarımehtemtoğlu82

Derleme / Review Article

Laboratuvar Hayvanlarında Ötenazi Yöntemleri

Euthanasia Methods in Laboratory Animals

Sedat Gökmen, Aylin Pehlivan, Abdurrahman Aksoy87

Probiyotik Olarak Tanımlanan Yeni Mikroorganizmalar

Novel Microorganisms Accepted as Probiotics

Şeyma Delice Ürkmez, Ali Gücükoğlu.....95

Antiviral İlaçlar

Antiviral Drug

Ali Küçük, Yakup Yıldırım100

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayın Koşulları

1. Türkçe ve İngilizce olarak hazırlanacak metinler 12 pt, Times New Roman yazı karakterinde, iki yana yaslanmış düz metin olarak, tüm kenarlarda 25 mm boşluk bırakılarak ve tek aralıklı sayfa düzeninde A4 (210 × 297 mm) boyutunda yazılmalıdır. Yazıların tamamı, şekil ve tablolar dahil olmak üzere orijinal bilimsel araştırmalarda 16, derlemelerde 10, olgu sunumlarında ve kısa bildirimlerde 6 ve editöre mektuplarda 4 sayfayı kaynaklar hariç geçmemesi istenir.

2. *.doc ve *.docx biçimindeki metin ile en az 300 dpi çözünürlükteki *.jpeg veya *.tiff biçimindeki şekillerin ve tabloların tamamı DergiPark üzerinden gönderilmelidir.

Başvuru sırasında sunulacak dosyalar:

a. Başlık sayfası:

3. Yazı tipi (orijinal araştırma, güncel/davetli derleme, olgu sunumu, kısa bildirimler, editöre mektup) belirtilir.

4. Konuyu özetleyen kısa başlık yazılır. On kelimeyi geçmemesi önerilir.

5. Tüm yazarların adlarının ilk harfleri ve soyadlarının tümü büyük olacak şekilde yazıldıktan sonra üst simge ile numaralandırılarak çalıştıkları kurum ve adres bilgileri verilmelidir. Adreslerde şehir ve ülke adları belirtilmelidir. ORCID numarası verilmesi zorunlu değildir. ORCID numaraları harflerle belirtilerek adreslerden sonra yazılabilir.

6. Sorumlu yazar "*" ile belirtilerek açık adres satırlarından sonra açık adres, telefon, e-posta bilgilerine yer verilmelidir. Kurum bilgileri birden başlayarak numaralandırılıp, adres, şehir, ülke bilgisi yazar isimleri altına eklenmelidir. Bu sayfada "sorumlu yazar" belirtilmeli isim, açık adres, telefon ve e-posta bilgileri eklenmelidir. Örnek olarak;

Farelerde Papilla Filiformislerin Işık ve Taramalı Elektron Mikroskopik Yapısı

Burhan Toprak^{1,a,*}

¹Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Genetik Laboratuvarı, 06020, Ankara, Türkiye

^aORCID: 0000-0003-1082-4559

*burhan.toprak@tarimorman.gov.tr, Ahmet Şefik Kolaylı Cad. No: 23-1 06200, Keçiören-Ankara Tel: +903123254826

Deney hayvanları kullanımı etik kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinler: İlgili kararlara ilişkin bilgiler (Alındığı kuruluş, tarih ve sayı) bu başlık altında verilmelidir.

Teşekkürler: Kısmi başlık sayfasında yer almalıdır. Daha önce kongrelerde sunulan her çeşit bildirinin, başlık sayfasında kongre adı, yer ve tarih verilerek belirtilmelidir.

Maddi destek ve çıkar ilişkisi: Makale sonunda varsa çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi ve kuruluşlar ve varsa bu kuruluşların yazarlarla olan çıkar ilişkileri belirtilmelidir. (Olmaması durumu da "Çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi/kuruluş yoktur ve yazarların herhangi bir çıkara dayalı ilişkisi yoktur" şeklinde yazılmalıdır.

b. Makalenin ana metni:

7. Başlık, özet ve en çok beşer adet anahtar kelime, Türkçe ve İngilizce olarak, ana metin ve kaynaklarla birlikte Başlık sayfasından ayrı bir dosya olarak sisteme yüklenmelidir.

8. Orijinal bilimsel araştırmalarda, olgu sunumlarında ve kısa bildirimlerde Türkçe ve İngilizce başlık, özet ve en az beş adet anahtar sözcük, giriş, gereç ve yöntem, bulgular, tartışma ve sonuç, kaynaklar sırası ile hazırlanmalıdır. Olgu sunumlarında olgu geçmiş kısmı da oluşturulabilir.

9. Tablo ve şekiller hem ayrı olarak sisteme yüklenmeli hem de yazı içinde olması gereken yere yerleştirilmelidir.

10. Oluşturulan bu ana metin dosyasında kesinlikle yazar adı, kurum, e-posta bilgisi vb. detaylar olmaması gerekmektedir. Tüm satırlara sürekli olarak devam eden numara verilmelidir.

11. **Özet**, Türkçe ve İngilizce olarak, tek paragraf halinde en fazla 250 sözcük olmalıdır.

12. **Anahtar kelimeler**, makale içeriğine uygun olarak seçilmeli, alfabetik sıraya göre yazılmalı ve beş sözcüğü geçmemelidir.

13. **Giriş**, konu ile ilgili özet literatür bilgisi içermeli, son paragrafında çalışmanın amacı vurgulanmalıdır.

14. **Gereç ve Yöntem**, ayrıntıya girmeden, anlaşılır biçimde yazılmalıdır. İstenilirse alt başlık kullanılabilir. Alt başlıklar italik yazı tipiyle belirtilmelidir. (Ekstraksiyon işlemi, İstatistiksel yöntem, Deney deseni vb.)

15. **Bulgular**, bölümünde veriler, tekrarlama yapmadan açık bir şekilde belirtilmelidir. Bulgular tablo ve şekillerle desteklenerek kısa olarak sunulmalıdır. Tablo başlıkları tablonun üstünde, şekil ve grafik başlıkları ise şeklin altında belirtilmelidir. Tablo ve şekillerin kodlanması nümerik veya alfa nümerik sembollerle gösterilmelidir.

16. **Tartışma ve Sonuç** bölümünde, araştırmanın sonucunda elde edilen bulgular, diğer araştırmaların bulguları ile karşılaştırılmalı ve literatüre olan katkısı belirtilmelidir.

17. **Kaynaklar**, kaynaklar listesi soyadına göre alfabetik ve kronolojik olarak sıralanmalıdır. Metin içerisindeki kaynak, yazar soyadı ve yayın tarihi yazılarak Toprak (2006); Toprak ve Erol (2007); Toprak ve ark. (2008); Toprak (2012, 2013) cümle sonunda ise sadece parantez içerisinde yazar soyadı ve yayın tarihi noktalama işaretinden önce yazılmalıdır (Toprak 2006; Toprak ve Toprak 2007; Toprak ve ark. 2008; Toprak 2012, 2013); Cümle sonunda birden çok kaynak belirtilecek ise kaynaklar tarih sırasına göre küçükten büyüğe doğru sıralanmalıdır. Metin içerisinde ikiden çok yazarlı kaynak kullanımlarında ilk yazarın soyadı yazılmalı diğer yazarlar ise "ve ark." kısaltması ile belirtilmelidir. Yazılarda ve yerine & işareti kullanılmamalıdır.

18. 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 ibare koyularak belirtilmelidir.

19. Kaynak yazımı ve sıralaması aşağıdaki gibi yapılmalıdır;

Sürelî Yayın:

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

Yazarlı Kitap:

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

Editörlü Kitap:

Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, 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:

Resmi kuruluşlar (Tarım ve Orman Bakanlığı, OIE, FAO vb.) internet sitesi harici kaynakların kullanımı önerilmez. 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.

20. Kaynakların sonuna mevcut ise doi numarası yazılmalıdır.

c. **Tam makale:** Başlık ve ana metin içeriğinin birleştirilmesiyle oluşturulan tam yazı *.pdf dosyası olarak sisteme yüklenmelidir.

21. Kaynaklar alfabetik olarak sıralandıktan sonra ayrıca numaralandırmaya gerek yoktur.

22. Simgelerin kullanımına dikkat edilmelidir. Örnek olarak çarpma işareti olarak "x" yerine "×" kullanılmalıdır.

23. Latince cins ve tür isimleri italik yazı tipi ile yazılmalıdır (*Monachus monachus*, *Anisakis* sp.). Tüm ölçüler SI'e (Systeme Internationale) göre verilmelidir.

24. Deneylerde kullanılan kimyasal, kit vb. gereçlerin marka, model, üretim yeri bilgileri yer almalıdır. Örnek: Blu-T4 ETVAC aşısı (Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara, Türkiye).

25. Başlık sayfası, makalenin ana metni ve tam makale olmak üzere üç dosya başvuruda bulunmalıdır.

26. Yayınlanması uygun görülen çalışmaların basılmasına ilişkin karar yazar(lar)ına bildirilir.

27. Türkçe yazılar hazırlanırken dil ve kelime bilgisi kuralları için Türk Dil Kurumu'nun hazırladığı kaynaklar esas alınmalıdır.

28. Dergiye gönderilen yazılar kabul tarihine göre yayınlanır. Dergi gerekli gördüğü durumlarda sıralamayı değiştirme hakkını saklı tutar.

Yayın, Hakemeleme, Etik İlkeleri ve Yasal Sorumluluklar

Bu dergi öncelikli olarak bakteriyoloji, parazitoloji, viroloji, halk sağlığı, epidemiyoloji, aşı üretimi, laboratuvar kalite yönetim sistemleri olmak üzere, diğer tüm veteriner bilim alanlarını kapsamaktadır. Etik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi araştırma ve yayın etiği standartlarına bağlıdır. İntihal tespit edilmesi kabulden sonra bile bir yazının reddedilmesine neden olabilir. Editörler, herhangi bir etik suistimal şüphesinde, ilgili uluslararası yayın ve araştırma etiği kurallarına (COPE guidelines, Cse White Paper on Publication Ethics, ORI) uygun olarak hareket eder. Dergimizde yayınlanması için gönderilen bilimsel çalışmaların European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes, Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar için Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik hükümlerine uygun olarak yapıldığını, gerekli tüm kurumsal etik ve yasal izinlerin alındığını varsayarak, bu konuda dergi yönetimi olarak sorumluluk kabul etmemektedir. Çalışmada "Hayvan" ögesi kullanılmış ise yazarlar, yazının Gereç ve Yöntem bölümünde çalışmalarında hayvan haklarını koruduklarını ve ilgili etik kuruldandan onay aldıklarını belirtmek zorundadır. Dergimiz gönderilen bilimsel çalışmalarda European consensus-platform for alternatives stratejilerine uygun olarak deney hayvanlarının kullanımında 3R (Replacement, Reduction ve Refinement) kuralına uygun davranılmasını bekler ve destekler. Farklı etik kurul onayı ya da izin alması

(Örneğin klinik araştırmalar etik kurul onayı gibi) değerlendirme süresince fark edilen yazıların değerlendirmesine ara verilerek gerekli izinleri alması için sorumlu yazar uyarılır, gerekli izinlerin tamamlanmasından sonra yayın sürecine devam edilir. Söz konusu onay bilgileri gereç ve yöntem kısmına eklenir. Çalışmalarla ilgili uluslararası ve ulusal düzenlemeler çerçevesince gerekli kurum ve kuruluşlardan alınması gereken tüm izinlerin (Örneğin yaban hayatına yönelik çalışma izin belgesi gibi) alınarak çalışmaya başlanması yazarların sorumluluğundadır. Dergi bu konuda sorumlu tutulamaz. Yazının sorumlu yazarı tarafından sistem aracılığıyla gönderilmesi ile yazının bir bölümünün veya tamamının başka bir yerde yayınlanmadığı ve aynı anda bir diğer dergide değerlendirilme sürecinde olmadığı şeklinde değerlendirilir. Tüm yazarlar yayın içeriği ve hakkında hem fikir olduklarını beyan etmiş sayılırlar. Maddi destek ve çıkar ilişkisi durumu ayrıca başvuru sırasında editöre bildirilmelidir. Yazıların Türkçe ve İngilizce tam metinlerinin gönderilmesi ve yayına kabul edilmesi halinde tek bir yazı olarak kabul edilerek sırasıyla Türkçesi ve İngilizcesi yayınlanır. Gönderilen yazıların basım düzeltmeleri orijinal metne göre yapıldığından, yazıların her türlü sorumluluğu (etik, bilimsel, yasal, vb.) yazarlara aittir. Dergide yayınlanmak üzere gönderilen yazılar tüm yazarlar tarafından imzalanan "Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi" ile dergiye gönderilir.

Etik Veteriner Mikrobiyoloji dergisi açık erişimi desteklemektedir. Yayınlanmak üzere kabul edilen yazıların her türlü yayın hakkı yayıncıya aittir. Ancak yazarlar "Eğitim amaçlı, kendi kişisel kullanım hakkı, Makalenin tümünü veya bir kısmını bir toplantıda veya konferansta kullanma, Makalenin tümünü veya bir kısmını bir toplantıda veya konferansta kullanma, Çalışmalarını çevrimiçi olarak kurumsal depolarda veya internet sitelerinde yayınlama, Makalelerinin görünürlüğünü arttırmak için herhangi bir sosyal medya platformu kullanma, Makalede açıklanan herhangi bir işlem veya prosedür için patent ve ticari marka haklarını saklı tutar. Yayınlanması uygun görülen çalışmaların basılmasına ilişkin karar yazar(lar)ına bildirilir. Türkçe yazılar hazırlanırken dil ve kelime bilgisi kuralları için Türk Dil Kurumu'nun hazırladığı kaynaklar esas alınmalıdır. Dergiye gönderilen yazılar kabul tarihine göre yayınlanır. Dergi gerekli gördüğü durumlarda sıralamayı değiştirme hakkını saklı tutar. Yazıların basım işleri ve yayınlanması için herhangi bir ücret talep edilmez. Yazarlara da yazıların basılması karşılığında herhangi bir ödeme yapılmaz. Yayınlanmayan yazılar, yazarına iade edilmez. Gönderilen makalelere ilişkin İtirazda veya şikâyette bulunmak isteyen yazarlar, ilk olarak, sorumlu yazı işleri müdürüne bir itiraz mektubu göndermelidir. Mektupta, itiraz veya şikâyet konusu hakkında ayrıntılı bilgi verilmelidir. Böyle bir durumda, sorumlu yazı işleri müdürü konuyu en kısa sürede incelemesi için editör veya yayın kurulu üyelerinden birini görevlendirir. Gerekirse, sorunu araştırmak için arabulucu olarak harici bir uzman atanabilir. Ancak sorumlu yazı işleri müdürü, tüm temyiz ve şikâyetler için karar verme sürecindeki nihai otoritedir. Dergi, itiraz ve şikâyetlerini incelerken COPE kurallarına uyar. Yayın hakkı devri sözleşmesine [buradan](#) ulaşabilirsiniz.

Tarihçe ve Arşiv

1960-1976 yılları arasında Etik Veteriner Bakteriyoloji Enstitüsü Dergisi,

1977-1986 yılları arasında Etik Veteriner Mikrobiyoloji Enstitüsü Dergisi,

1987 yılından günümüze kadar Etik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi adıyla yayımlanmıştır.

Journal of Etlik Veterinary Microbiology Publication Conditions

1. Manuscripts in Turkish and English languages should be written as a justified text leaving 25 mm from all margins, in 12pt Times New Roman text character, in single-spaced page format and A4 (210 × 297 mm) size. All manuscripts including figures and tables should not exceed 16 pages for scientific articles, 10 pages for reviews, 6 pages for case reports and short communications and 4 pages for letters to the editor except references.

2. The manuscripts in *.doc or *.docx formats and figures of maximum 300dpi resolution in *.jpeg or *.tiff formats and tables should be sent via DergiPark.

Three files to be submitted during the Application

a. Title Page

3. Type of manuscript (original research, up-to-date/invited review, case report, short communication, letter to the editor) is indicated.

4. Title summarizing the subject is written. It is suggested not to exceed 10 words.

5. After the first letter of names and all letters of surname of authors are written in capital letters, institutions and addresses of authors should be written via enumerating the names by superscripts. Names of cities and countries should be indicated in addresses. ORCID number submission is not obligatory. ORCID numbers can be written after addresses with an indication of letters.

6. The responsible author should be indicated with “*” and after address lines, full address, e-mail, and phone number should be added. Institution information should be enumerated starting with 1 and address, name of city and country should be added under authors' names. Example:

The Structure of Papilla Filliforms in Mice Under Light and
Scanned Electron Microscope
Burhan Toprak^{1,a,*}

¹Veterinary Control Central Research Institute, Laboratory of Genetics, 06020, Ankara, Turkey

^aORCID: 0000-0003-1082-4559

*burhan.toprak@tarimorman.gov.tr, Ahmet Şefik Kolaylı Cad. No: 23-1 06200, Keçiören-Phone: +903123254826

Use of laboratory animals Ethics Committee and other decisions of Ethics Committee and Permissions: Information about related decisions (Issue of institution, date, and number) should be given under this title.

Acknowledgment: This part should take place in the title page. All communications presented in congresses earlier should be indicated in title page with name, place, and date of congress.

Financial Support and Conflict of interest: All persons and institutions in support of finance and, if any, conflict of interest with authors should be disclosed at the end of the article. In case of no conflict of interest, it should be stated as “There is no person/institution funding the work and authors have no conflicts of interest.”

b. The main text of Article

7. Title, abstract and up to five keywords should be uploaded in both Turkish and English. They should also be uploaded to the system with the main text and resources, but as a separate file from the title page. For non-Turkish language speakers, a Turkish language title, summary and keywords will be written by the editorial staff.

8. In original scientific research, case reports and short reports should be prepared according to the following range. Turkish and English titles, abstracts, at least five keywords, introduction, materials and methods, findings, discussion and conclusions and references.

9. Tables and figures should be separately uploaded to the system and also placed where they should be in the text.

10. Name of the author, institution, e-mail information and so on. details don't should be In this main text file. All lines should be numbered continuously.

11. **The summary** should briefly describe the results and conclusion, less than 250 words.

12. **Five keywords** should be selected from Medical Subject Headings, should be written in alphabetical order.

13. **The introduction** should include summary literature relaventing subject of the article and the purpose of the study should be emphasized in the last paragraph.

14. **Materials and methods** should be written in a comprehensible way and be aware giving details. Subtitle can be used if desired. Subtitles must be defined in italic font. (Extraction process, Statistical method, Experimental design, etc.)

15. **In the findings**, the data should be clearly indicated without repetition. Findings should be supported by tables and figures and presented briefly. Table headings should be indicated above the table and figure and graphic headings should be given below the figure. The coding of tables and figures should be indicated by numeric or alpha-numeric symbols.

16. **In the Discussion and Conclusion**, the findings obtained from the research should be compared with the findings of other researchers and their contribution to the literature should be specified.

17. **References** should be listed and numbered alphabetically and chronologically according to the surnames. References in the text should be written as author surname and date of publication, for example, Toprak (2006); Toprak and Erol (2007); Toprak et al. (2008); Toprak (2012, 2013). If the references are at the end of the sentence, references should be written only in parenthesis as the surname of the author and date of publication and the surname of the author and the date of publication should be also written before the punctuation mark. For example (Soil 2006; Soil and Soil 2007; Soil et al. 2008; Soil 2012, 2013); If more than one reference is to be given at the end of the sentence, the references should be ordered from small to large in order of date. “&” mark should not be used instead of “and”.

18. Abbreviations of journals should be made based on the last edition of “Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation”. In the list of references, if the author has more than one publication of the same year, it should be indicated with “a” and “b next to the publication date.

19. Reference writing and ranking should be done as follows;

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

For the 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 trematoda from the *Alosa fallax* in Turkey. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII), October, 10-14, İzmir-Turkey.

For dissertations:

Aksoy E, (1997). Sığır Vebası hastalığının histolojik ve İmmunoperoksidaz yöntemle tanısı üzerine çalışmalar. Ph.D. Thesis, Ankara University Institute of Health Sciences, Ankara

Anonymous:

It is not recommended to use other internet sites other out of website of the official institutions (Ministry of Agriculture and Forestry, OIE, FAO, etc.). Anonymous, (2009). Contagious equine metritis. Access address: HTTP:// www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdf, Date of access: 17.10.2009.

Peter AT (2009). Abortions in dairy cows. Access address: HTTP:// www.wcds.afns.ualberta.ca.htm, Date of access: 14.11.2009.

20. If doi number available, Doi number should be written at the end of the references.

c. Full article: Full text created by combining title and main text content should be uploaded to the system as *.pdf file.

21. If the references are ranked alphabetically, there is no need to renumber them.

22. It should be attention to the use of symbols. For example, as multiplication sign, "x" should be used instead of "×".

23. Latin genus and species names should be written in italics (*Monachus monachus*, *Anisakis sp.*). All dimensions should be given according to SI (Système Internationale).

24. The brand, model and production place information of the chemical and kit used in the experiments should be written. Example: Blu-T4 ETVAC vaccine (Central Veterinary Control and Research Institute, Ankara, Turkey).

25. It should be applied with three files consisting of the title page, the main text of the article, and the full article.

26. The decision to publish works that are deemed appropriate to publish shall be notified to the author(s).

27. When writing articles in Turkish, the vocabulary rules should be based on the sources prepared by the Turkish Language Association.

28. Articles sent to the journal are published according to the date of acceptance. The journal may change the publishing rank when it deems necessary.

Publication, Arbitration, Ethical Principles, and Legal Responsibilities

This journal covers primarily bacteriology, parasitology, virology, public health, epidemiology, vaccine production, laboratory quality management systems, and all other veterinary sciences.

Journal of Etlik Veterinary Microbiology is subject to research and publication ethics standards. Plagiarism can lead to rejection of an article even after acceptance. The editors act in accordance with the relevant international publication and research ethics rules (COPE guidelines, CSI White Paper on Publication Ethics, ORI) in case of any ethical misuse. Assuming that the scientific studies submitted for publication in our journal are carried out in accordance with the provisions of the Regulation on Welfare and Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes with European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes, and that all necessary institutional ethics and legal permissions are taken, the journal management does not accept responsibility as a matter of responsibility. If the "Animal" element is used in the study, the authors must state that they protect animal rights in their studies and that they have taken approval from the relevant ethics committee. Our journal expects and supports the compliance of 3R (Replacement, Reduction, and Refinement) rules in the use of experimental animals in accordance with the European consensus-platform for alternatives strategies in scientific studies.

Approval of different ethics committee or permission (for example, clinical research ethics committee approval) during the evaluation of the discontinuation of the review of the articles that are required to receive the necessary authorizations are warned, the publication process is continued after the necessary permissions are completed. The approval information should be added to the material and method section.

It is the authors' responsibility to ensure that all permits (such as work permits for wildlife) are obtained from the relevant institutions and organizations in accordance with international and national regulations. The journal cannot be held responsible for this matter.

History and Archive

Journal was published between 1960-1976 as Journal of Etlik Veterinary Bacteriology Institute,

Between 1977-1986 as Journal of Etlik Veterinary Microbiology Institute Dergisi,

From starting 1987 till today as Journal of Etlik Veterinary Microbiology.

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi*

Aşağıda başlığı bulunan ve yazarları belirtilen yazının;

Başlığı:

1. Yazar(lar) olarak, yazım(ız)ın orijinal olduğunu, değerlendirilmek üzere eşzamanlı olarak başka bir dergiye sunulmadığını, halen başka bir dergide değerlendirme aşamasında olmadığını, bildiri özeti olmak dışında daha önce başka bir dergide yayınlanmadığını, bilimsel ve etik sorumluluğunun tarafım(ız)a ait olduğunu, diğer yazarlara ulaşılamaması halinde, tüm yazarların bu başvurudan haberdar olduklarını ve tüm yazarların araştırmanın her sürecine aktif katıldıklarını beyan ederim(z).
2. Yapılan çalışmanın derginin yayın kurallarında belirtilen tüm etik değerleri ve kuralları gözeterek, toplumu, herhangi bir kurumu ya da kişiyi rencide edici herhangi bir şekilde yapılmadığını, deney hayvanlarının kullanımında etik kurallarına uyulması için gerekli özenin gösterildiğini, dergi sahibi, sorumlu yazı işleri müdürü, editörü ve yayın kurulunun yapılan çalışmadan ve yazıdan dolayı doğabilecek tüm hukuki işlemlerde sorumluluk taşımadığını kabul ederim(z).
3. Yazım(ız)ın yayınlanmak üzere kabul edilmesi halinde, gerekli görülen düzeltmelerle birlikte, derginizin belirttiği tüm yazım basılı ve elektronik olarak yayın kurallarına uygun basılması, çoğaltılması, dağıtılması gibi tüm haklarını yayın kurallarında belirtilen diğer haklarım(ız) saklı kalmak koşuluyla Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'ne devrettiğimizi gayri kabili rücu olarak kabul ederim(z).

Yazar Adı ve Soyadı**	Sorumlu Yazar	İmza	Tarih/Yer

*Yazının yayınlanmak üzere Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'ne kabul edilmemesi durumunda bu sözleşme geçersizdir. Sözleşmenin bağımsız kopyaları farklı kuruluşlarda çalışan yazarlar tarafından ıslak olarak imzalanarak ayrı ayrı sisteme yüklenebilir. İmzalar özgün olmalıdır.

**Yazarlar yazıda belirtildiği gibi sıralanmalıdır.

Sorumlu Yazara ait telefon ve yazışma adresi:

Journal of Etlik Veterinary Microbiology Copyright Release Form*

Author(s) of the manuscript of which title and authors are undermentioned declare(s) that

Title:

1. The manuscript is original and has not been submitted or considered for publication elsewhere, is not published elsewhere except in the form of abstract, and scientific and ethical responsibility belong(s) to me/us. In case all authors are not reached, all authors have been informed of the application and all authors have participated in the work process actively.
2. The work has been performed in consideration of ethical values and rules of the journal indicated in the publication rules; has been performed in a way not to offend any society, foundation or person and special care are shown to comply with ethical rules during animal testing. The owner of the journal, editor in chief, the editorial board are not responsible for the legal acts generated from the work and the manuscript.
3. In case of acceptance for publication of the manuscript, with the corrections considered necessary I/ we hereby grant the Journal of Etlik Veterinary Microbiology, without recourse, the right to publish, distribute, reproduce the manuscript according to your Journal's all printing and electronic printing rules reserving the other rights indicated in the publication rules.

Full Name of the Author**	Corresponding Author	Signature	Date/Place

*The contract is invalid in case the submitted manuscript is not accepted. Independent copies of the contract can be ink signed by the authors working in different institutions and be uploaded separately.

**Authors' name must be in order as they are in the manuscript.

Contact Number and Address of the Corresponding Author:

Köpeklerde Burun Boşluğundan *Pseudomonas aeruginosa*'nın İzolasyonu ve Antibiyotik Duyarlılıkları

Seyfullah Zeyrek¹, Göksel Erbaş²

¹Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Işıklı/Aydın

²Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Işıklı/Aydın

Geliş Tarihi / Received: 06.02.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 14.05.2019

Özet: *Pseudomonas aeruginosa* inatçı bir patojendir ve antibiyotik dirençliliği nedeniyle de mücadelesi zordur. Araştırmamızda Aydın'ın Kuşadası ilçesinde bulunan özel bir Veteriner kliniğine 2017 yılı Ekim - Kasım - Aralık aylarında gelen köpeklerin burun boşluğundan alınan 100 adet sürüntü örneği *P. aeruginosa* yönünden incelenmiştir. Örnekler alındıktan sonra soğuk zincir altında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Rutin Teşhis laboratuvarına getirilmişlerdir. Yapılan mikrobiyoloji analizler neticesinde 11 adet *P. aeruginosa* izole ve tanımlanmış ve izolasyonları Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. *P. aeruginosa* izolatlarının tamamı Amoksisilin klavulonik asit, Ampisilin/sulbaktam, İmipemen, Kloksasilin ve Penisilin/Novobiosin'e karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir. Kanamisin/Cephaleksin'e karşı izolatlardan 7'sinin dirençli (%64), 4'ünün ise duyarlı (%36) olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte 5 izolatin Oksitetrasiklin'e orta düzey duyarlı (%45), 6 izolatin ise duyarlı (%55) olduğu belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen 11 izolatin tümünün Enrofloksasin ve Gentamisin'e karşı duyarlı olduğu saptanmıştır. Köpeklerde solunum yolunu etkileyen bakteriyel hastalıklarda etkenin tanımlanması ve doğru antibiyotik seçimi oldukça önemlidir. Çalışma sonuçları *P. aeruginosa* izolatlarının çoklu antibiyotik direncine sahip olduklarını göstermiştir. Bununla birlikte klinik olarak karşılaşılabilecek vakalarda tedavide Enrofloksasin ve/veya Gentamisin etken maddeleri tavsiye edilmektedir.

Anahtar kelimeler: Köpek, *Pseudomonas aeruginosa*, burun boşluğu, antibiyotik duyarlılık

Isolation and Antibiotic Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from Nasal Cavity in Dogs

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa* is a persistent pathogen and it is difficult to control because of its antibiotic resistance. In our study, a sample of 100 swabs taken from the nasal cavity of dogs from October to December 2017 in a private veterinary clinic in Kuşadası district of Aydın were examined. After the samples had been taken, they were brought to Aydın Adnan Menderes University Veterinary Faculty Microbiology Routine Diagnosis laboratory under cold chain. In consequences of performed microbiological tests, 11 *P. aeruginosa* were isolated and identified, and antibiotic susceptibility tests were performed by using Kirby Bauer disc diffusion method. All of the 11 identified strains were determined resistant to Amoxicillin clavulonic acid, Ampicillin/sulbactam, Imipemen, Cloxacillin and Penicillin/Novobiosin. Seven of the isolates were resistant to Kanamycin/Cephalexin (64%) while 4 of them (36%) were sensitive. However, 5 isolates were detected moderately-sensitive (45%) and 6 isolates were sensitive (55%) to oxytetracycline. And all identified bacteria were reported to be sensitive to Enrofloxacin and Gentamicin. In bacterial diseases, affecting the respiratory tract in dogs, identification of the agent and selection of the correct antibiotic are very important. The results showed that *P. aeruginosa* isolates had multiple antibiotic resistances. However, in the clinically relevant cases, Enrofloxacin and / or Gentamicin are recommended for treatment.

Key words: Dog, *Pseudomonas aeruginosa*, nasal cavity, antibiotic susceptibility

Giriş

Köpeklerde gastrointestinal sistem ve deri hastalıklarının takiben, en sık karşılaşılan hastalıklar solunum sistemi hastalıklarıdır [18]. Köpeklerde solunum sistemi hastalıkları diğer türlere istinaden az olsa da; barınak, araştırma üniteleri ve petshoplar gibi köpeklerin sık barındırıldığı ortamlarda yoğun karşılaşılan sağlık problemlerindedir [11, 21].

Köpeklerdeki alt solunum yolu hastalıkları; viral, bakteriyel, riketsiyal, paraziter, fungal ve protozoal kökenli enfeksiyonlar; hipersensitivite ve immün kökenli hastalıklar; tromboembolizm, hipertansiyon, neoplazi ve travmatik akciğer hastalıklarının içerir [3]. Köpeklerde enfeksiyöz kökenli solunum sistemi hastalıklarının oluşmasında, bakteriler önemli bir rol oynamaktadır. Sağlıklı köpeklerin alt solunum yollarında düşük miktarda mikroorganizma

(alfa-hemolitik streptokok, stafilokok, *Bordatella bronchiseptica*, *P. aureginosa*, *Pasteurella multocida* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi) bulunmaktadır [12, 16]. Mukosilyer mekanizmanın işlevinin azalması ve bağışıklık sisteminin zayıflaması durumunda, normal florada yer alan fırsatçı veya enfeksiyon etkeni mikroorganizmaların çoğalması söz konusudur [12]. *Escherichia coli*, *P. multocida*, *Klebsiella* türleri, *Streptokokal* türler, *B. bronchiseptica* ve *Staphylococcus* türleri, *Pseudomonas* ve *Mycoplasma* türleri gibi fırsatçı bakteriler, bakteriyel pnemonilerde yaygın izole edilen bakterilerdir [25].

P. aeruginosa fırsatçı patojen bakteri olarak kabul edilmektedir. Bu bakterinin patojenik ve patojenik olmayan suşları arasındaki temel farklılık, patojenik suşların virulans faktörleri üretebilme özelliği bulunmaktadır. Çeşitli virulans faktörleri olabildiği içinde çok farklı enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bunların başında akut veya kronik yapıda akciğer enfeksiyonu, septisemi, üriner sistem enfeksiyonu, endokardit, dermatit ve osteokondrit gibi enfeksiyonlara neden olmaktadır [23].

Pneumoni, özellikle köpeklerde barınaklarda, yetiştiriciliğin yapıldığı bölgelerde yüksek mortaliteye sahip bir sorundur. Bu nedenle pneumoni, pek çok viral, bakteriyel, fungal, paraziter nedenlerden dolayı ortaya çıkabilir. Solunum sistemi yaşamı ciddi anlamda tehdit eden bir durumdur. Bu sebeple *P. aeruginosa* çok fazla araştırılmamış olması ve antibiyotik dirençliliğinin de çok fazla olması nedeniyle tedavilere cevap vermemesi sebebiyle bu konu üzerine çalışma yapılması planlanmıştır.

Bu araştırma ile Aydın ili, Kuşadası ilçesindeki köpeklerde solunum yolu hastalıklarına sebebiyet verebilen ve aynı zamanda zoonoz özelliğe sahip *P. aeruginosa* isimli bakterinin köpeklerin burun boşluğundan izolasyonu ve bu bakterinin antibiyotiklere karşı olan duyarlılığının saptanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Örnekler

Çalışmada Aydın'ın Kuşadası ilçesinde bulunan özel bir Veteriner kliniğine 2017 yılı Ekim - Kasım - Aralık aylarında getirilen köpeklerin burun boşluğundan alınan 100 adet sürüntü örneği kullanıldı.

Bu örneklerin 50'si dişi köpeklerden 50'si ise erkek köpeklerden alındı. Örnekler alındıktan sonra soğuk zincir altında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Rutin Teşhis laboratuvarına getirildi.

Örneklerden *P. aeruginosa* İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Köpeklerin burun boşluğundan alınan ve soğuk zincir altında laboratuvara getirilen sürüntü örnekleri, %7 koyun kanlı agarlara (Oxoid, CM0055) ve MacConkey (Oxoid, CM0115) besiyerlerine inokule edildi ve 37°C'de yaklaşık 24 saat süre ile inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonucunda morfolojik yönden *Pseudomonas* kolonilerine benzeyen koloni oluşumları öze yardımı ile alınarak tekrar MacConkey agar ve *Pseudomonas* selektif besiyerlerine (Oxoid, CM0559) pasajlandı ve 37°C'de 24 saat inkubasyona bırakıldı. Daha sonra üreme görülen bakteriyel kolonilerinden Gram boyama yapıldı. Gram negatif, oksidaz ve katalaz testi pozitif olan kolonilerden pasajlanarak izolatların saf kültürleri elde edildi [17, 20]. Bu izolatlara *P. aeruginosa* yönünden biyokimyasal testler uygulandı [5, 6, 15]. Ayrıca izolatlar TSB'ye inokule edildi ve 24-48 saat 37°C'de ve 25°C'de oda ısısında inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrası sarı-yeşil renkte pyosiyanın pigment varlığı saptanan koloniler *P. aeruginosa* olarak doğrulandı.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

İzole edilen suşların antibiyotik duyarlılık testleri Kirby Bauer Disk Diffüzyon yöntemine göre yapıldı [4]. Çalışmada Antibiyotik duyarlılık testlerinde, Amoxicillin-Clavulanik asit (Oxoid, 20/10 µg), Gentamisin (Oxoid, 10 µg), Ampisilin/sulbaktam (Oxoid, 10/10 µg), Kanamisin+Cephaleksin (Oxoid, 75 µg), Enrofloksasin (Oxoid, 5 µg), İmipemen (Oxoid, 10 µg), Kloksasilin (Oxoid, 5 µg), Oksitetrasiklin (Oxoid, 30 µg) ve Penisilin + Novobiosin (Oxoid, 10U/30 µg) etken maddeleri kullanıldı. Özetle içinde 1 ml TSB bulunan tüplere McFarland No:1 yoğunluğunda ekilerek 37°C'de inkube edildi. Mueller Hinton agar petrilere bu buyyon kültürlerinden 0,1 ml pipet aracılığı ile aktarılarak cam bagetle yayıldı ve kurumaya bırakıldı. Standart antibiyotik diskleri steril bir pens yardımı ile eşit aralıklarla petri üzerine yerleştirildi. Petri 37°C'de 18 saat inkube edildi. İnkubasyon sonrasında her

diskin çevresinde bulunan inhibisyon zon çapları milimetrik olarak ölçüldü ve standartları ile karşılaştırıldı [4, 7].

Bulgular

Araştırmada köpeklerin burun boşluğundan alınan toplam 100 adet sürüntü örneğinden genel amaçlı ve spesifik besiyerleri kullanılarak ve de yapılan biyokimyasal testler sonucunda 11 (%11) adet *P. aeruginosa* izolatu tanımlanmıştır.

Örneklerin, cinsiyete göre dağılımı incelendiğinde, *P. aeruginosa* izolatlarından 4'ü (%36) erkek, 7'si (%64) dişi köpeklerden elde edilmiştir. Bununla birlikte bu 11 köpeğin 3'ünün (%27) ev ortamında beslendiği, 8'inin (%73) ise dış ortamda bakılan köpeklerden oluştuğu belirlenmiştir. Ek olarak köpeklerin 2'si (%18) küçük köpek ırklarından, 9'u (%82) ise iri cüsseli ırklardandı.

P. aeruginosa izolatlarına yapılan antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda 11 suşun tamamı Amoksisilin klavulonik asit, Ampisilin/sulbaktam, İmipenem, Kloksasilin ve Penisilin/Novobiosin'e karşı dirençli olarak tespit edilmiştir. Elde edilen izolatlardan 7'si ise Kanamisin/Cephaleksin'e dirençli (%64), 4'ü ise duyarlı (%36) olarak bulunmuştur. Bununla birlikte 5 izolat Oksitetrasiklin'e orta düzey duyarlı (%45), 6 izolat ise duyarlı (%55) olarak belirlenmiştir. Çalışmada izole ve tanımlanılan 11 bakterinin tümü ise Enrofloksasin ve Gentamisin etken maddelerine karşı duyarlı bulunmuştur.

Elde edilen antibiyogram sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo1. *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Antibiyogram Sonuçları (n=11)

Antibiyotik Etken Maddesi	S*	I*	R*
Amoksisilin klavulonik asit (20/10 µg)			11
Gentamisin (10 µg)	11		
Ampisilin/sulbaktam (10/10 µg)			11
Kanamisin/Cephaleksin (75 µg)	4		7
Enrofloksasin (5 µg)	11		
İmipenem (10 µg)			11
Kloksasilin (5 µg)			11
Penisilin/Novobiosin (10U/30 µg)			11
Oksitetrasiklin (30 µg)	6	5	

* S = Duyarlı, I = Orta derece Duyarlı, R = Dirençli

Tartışma ve Sonuç

Solunum sistemi hastalıkları köpek ve kedilerde sık görülür. Solunum yolunun primer problemleri olan öksürük ve nefes darlığı gibi klinik belirtiler ile ortaya çıkmakta, diğer organ sistemlerinde (örneğin konjestif kalp yetmezliği) bozukluklara neden olabilmektedirler [3].

Hem genç hem de yaşlı hayvanlar, solunum yolu hastalığı geliştirme riski altındadır. Doğumda, solunum ve bağışıklık sistemleri tamamen gelişmemiştir; bu, akciğerlere patojenlerin girmesini ve yayılmasını kolaylaştırır ve alveoler bulaşma meydana gelebilir. Yaşlı hayvanlarda normal mukosilyer klirensi ve immünolojik anerjiyi bozan kronik dejeneratif değişiklikler, akciğerleri havadaki patojenlere ve toksik partiküllere karşı daha savunmasız hale getirebilir [1].

Normalde köpeklerde çeşitli kommensal bakteri florası (*P. multocida*, *B. bronchiseptica*, *Streptococci*, *Staphylococci*, *P. aeruginosa* ve koliform bakteriler dahil) vardır ve bu bakteriler burun, nazofarinks ve üst trakeanda ve en azından aralıklı olarak klinik bulgulara neden olmadan akciğerlerde bulunmaktadırlar. Bu bakterilerden kaynaklanan fırsatçı enfeksiyonlar genellikle, solunum savunma mekanizmalarının birincil bir patojenle (örneğin, distemper, parainfluenza virüsü veya köpeklerde köpek tipi 2 adenovirüs ve kedilerde rinotracheitis virüsü veya kedilerde kalikivirüs) enfeksiyonu ile ortaya çıkmaktadır [25].

Solunum yolu hastalığını meydana getiren patojenler, iyileşme gösteren hayvanların solunum yolunda kalmaya devam ederler. Çeşitli stres ortamlarında, bu hayvanlarda enfeksiyon tekrarlayabilir; ayrıca diğerleri için bir enfeksiyon kaynağı olarak da tehdit oluştururlar. Kötü yönetim uygulamaları (örneğin, aşırı kalabalıklaşma) genellikle kötü hijyenik ve çevresel koşullar ile ilişkilendirilir ve ortaya çıkan stres, enfeksiyonların görülme sıklığını ve şiddetini artırır. Enfeksiyonların yayılmasını destekleyen koşullar, genellikle, kulübelere, evcil hayvan dükkanlarında, yatılı tesislerde ve barınaklarda meydana gelir [2].

Solunum yolu enfeksiyonu bulunan köpeklerde klinik olarak; halsizlik, iştahsızlık gibi genel semptomlarla birlikte öksürük, yüksek ateş, burun akıntısı ve trakeal duyarlılık olduğu bildirilmekte-

dir. *P. aeruginosa* enfeksiyonunda mortalitenin asıl sebeplerinden olan akciğer, enfeksiyonda en çok etkilenen organdır. Bakteriyemik *P. aeruginosa* pnömonisinin patolojik özellikleri 1917 yılı başlarında tanımlanmış olup, kan damarı invazyonu ve nekroz ile karakterizedir [22].

Köpeklerde solunum yolu ile ilgili çalışmalar incelendiğinde *P. aureginosa* izolasyon oranının genelde %5 ile 10 arasında olduğu gözlemlenmektedir. Angus ve ark [1] solunum yolu hastalığı şüpheli köpeklerde %7.8 oranında *P. aureginosa* izole etmişlerdir. Knotek ve ark [13] ise kronik rinitli bir köpekten *P. aeruginosa* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Johnson ve ark [10] 2001-2011 yılları arasında yaptıkları retrospektif çalışmada, bronkoalveoler lavaj yöntemi kullanarak solunum sistemi problemlili köpeklerden aldıkları 105 numunenin 6 (%6)'sının *P. aeruginosa* olduğunu tespit etmişlerdir. Koçhan ve ark [14] Diyarbakır'da İnfeksiyöz Trakeabronşitis semptomları gösteren hayvanlarda yaptıkları bir çalışmada %10 oranında *P. aeruginosa* izole etmişler ve izolatlar ile yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde ampicilin, sefurüksim ve sefurüksim aksetil'e orta düzey, gentamisin, amikasin, sefoksitin, amoksisilin+klovulonik asit, piperasin/tazobaktam, kolitsin ve tetrasiklin etken maddelerine ise duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışma sonuçlarımız daha önce yapılan araştırmalar ile karşılaştırıldığında *P. aureginosa* izolasyon oranımızın az da olsa yüksek olduğu görülmektedir.

P. aeruginosa antibiyotiklere dirençli olduğundan dolayı tehlikeli bir patojendir. Bakteri doğal olarak sahip olduğu lipopolisakkarit (LPS) yapısındaki dış membran ile (permeabilite bariyerleri mevcut olduğundan) bir çok antibiyotiğe rezistanslık kazanmaktadır. Terapötik dozlardaki antibiyotik konsantrasyonlarına karşı, yüzeylerinde, hücrelerin içine girişi engelleyen, hava ve su geçirmez özellikte biyofilm oluşturma eğilimindedirler. Ayrıca, doğal olarak yaşadığı çevrede basiller, aktinomycesler, küfler ve mayalarla ilişkili olarak yaşadıklarından, çevrelerinde doğal olarak bulunan antibakteriyellere dirençli bulunmaları doğaldır. Ayrıca bünyelerinde antibiyotik rezistant plazmidlerini de barındırırlar. R faktörleri ve RTFs ile birlikte, genlerin transdüksiyon ve konjugasyon gibi bakteriyel proseslerle aktarılabilecekleri anlamındadır. Sadece birkaç antibiyotik *Pseudomonas*'lara karşı etkilidir

ki bunlar, flourokinolonlar, gentamisin ve imipenem'dir. Yine de bunların herbiri tüm serotiplere karşı etkili değildir [19, 24]. Köpeklerde *P. aeruginosa* ile ilişkili bronşiektazi enfeksiyonlarında, amoksisilin klavulanik asit kombinasyonu hariç betalaktamlar uygun seçim değildir çünkü solunum yollarına penetrasyonları zayıftır. Florokinolonlar, tetrasiklinler, klindamisin, metronidazol ve azitromisin solunum yollarına iyi penetre olmaları sebebiyle uygun seçimlerdir. Makrolidler (özellikle azitromisin) biyofilm formasyonuna neden olan *P. aeruginosa*'yı inhibe etmek için çok daha iyi bir seçimdir [9]. Araştırmamızda izole ve identifiye edilen 11 *P. aeruginosa* izolatının tamamı literatür bilgisinde de bahsedildiği üzere Amoksisilin klavulonik asit (%100), Ampicilin/sulbaktam (%100), İmipemen (%100), Kloksasilin (%100) ve Penisilin/Novobiosin (%100) etken maddelerine dirençli olarak tespit edilmiştir. Sonuçlarımız irdelendiğinde, literatür bilgide de verildiği [24] üzere İmipemen etken maddesinin *Pseudomonas*'ların tüm suşlarına karşı etkili olmadığı görülmüştür. Bunun yanında bahsedilen bilgilere paralel bir şekilde izole edilen tüm suşlar Gentamisin'e karşı duyarlı bulunmuşlardır.

Harihahan ve ark [8] tarafından Grenada'daki köpeklerden çeşitli klinik koşullarda 44 *P. aeruginosa* suşu elde edilmiştir. İzolatların çoğunluğu otitis, dermatitisi de kapsayan deri hastalıkları, yara ve apselerden izole edilmiştir. İzolatlar 6 antibiyotiğe karşı standart disk difüzyon testiyle test edilmiştir. En az direnç sırasıyla gentamisine (%9.8), enrofloksasine (%15.8) ve neomisine (%41.8) karşı gelişmiştir. Tetrasikline % 85.3 oranında direnç oluşmakla beraber, tüm izolatlar amoksisilin klavulanik asit ve cephalothin'e doğal direnç göstermiştir [8]. Araştırmamızda elde edilen izolatlardan 7'si Kanamisin/Cephaleksin'e dirençli (%64), 4'ü ise duyarlı (%36) olarak bulunmuştur. Bununla birlikte 5 izolat Oksitetrasiklin'e orta düzey duyarlı (%45), 6 izolat ise duyarlı (%55) olarak belirlenmiştir. Çalışmada izole ve identifiye edilen 11 bakterinin tümü (%100) ise Harihahan ve ark [8] araştırmasında ki sonuçlara benzer şekilde Enrofloksasin ve Gentamisin etken maddesine karşı duyarlı olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, araştırmada köpeklerin burun boşluğundan alınan toplam 100 adet sürüntü örneğinden genel amaçlı ve spesifik besiyerleri kullanı-

arak ve de yapılan biyokimyasal testler sonucunda 11 (% 11) adet *P. aeruginosa* izolatu elde edilmiştir. *P. aeruginosa*'nın köpeklerin burun boşluğunda kommensal olarak bulunabileceği bilinmektedir. Ancak bakterinin immun sistemin zayıfladığı durumlarda virülens faktörleri yardımı ile patojenite kazanabileceği ve başta pneumoni olmak üzere çeşitli enfeksiyonlara yol açabileceği unutulmamalıdır. Araştırma sonuçlarında da görüldüğü üzere bakterinin birçok antibiyotiğe karşı kuvvetli bir dirençliliği olduğu tespit edilmiştir. Bundan dolayıdır ki özellikle inatçı pneumoni vakalarında mutlaka etken izolasyonu ve antibiyogram yapılması zorunluluğu vardır. Doğru antibiyotik etken maddesi kullanılmadığı sürece hem bakterilerde ki hızlı direnç gelişimi hem de hastalığın sağaltılamaması gibi durumlar kaçınılmazdır.

Teşekkür

Bu çalışma Veteriner Hekim Seyfullah Zeyrek'in Yüksek Lisans tez çalışmasından özetlenmiştir ve Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-17051 proje numarası ile desteklenmiştir. Araştırmada yalnızca sürüntü örnekleri kullanıldığından dolayı Etik kurul kararı gerekmemektedir.

Kaynaklar

1. Angus CA, Jang SS, Hirsh DC, (1997). *Microbiological study of transtracheal aspirates from dogs with suspected lower respiratory tract disease: 264 cases (1989-1995)*. J Am Vet Med Ass. 1, 55-58.
2. Aslan V, (1998). *Solumun sistemi hastalıkları. İmren HY, ed. Kedi ve Köpek Hastalıkları*. 1st ed. Medisan Yayınevi, Ankara, 37
3. Ayodhya S, Tirumala Rao DS, Narsimha Reddy Y, Syam Sundar N, Girish Kumar V, (2013). *Isolation and characterization of bacteria from canine respiratory diseases in and around Hyderabad city, Andhra Pradesh*. Indian Veterinary World. 6(9), 601-604.
4. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turek M, (1966). *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method*. Am J Clin Pathol. 45(4):493-496
5. Bilgehan H, (1995). *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. Fakülteler Kitapevi. 2. Basım.
6. Chakraborty M, Roy JP, (2001). *Prevalance Biochemical Characterisation and Pathogenicity of P. aeruginosa Isolated from Human and Animal Sources*. Indian Veterinary Journal. 78 (12), 1079-1081
7. CLSI, (2002). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standard, CLSI Document M31-A2*. Second ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA
8. Harihahan H, McPhee L, Heaney S, Bryenton J, (1995). *Antimicrobial drug susceptibility of clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa*. Canadian Veterinary Journal. 36(3), 166-168
9. Imperi F, Leoni L, Visca P, (2014). *Antivirulence activity of azithromycin in Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol. 5:178.
10. Johnson LR, Queen EV, Varnau W, Sykes JE, Byrne BA, (2013). *Microbiologic ve cytologic assesement of bronchoalveolar lavage fluid from dogs with lower respiratory tract infection: 105 cases (2001-2011)*. J Vet Intern Med. 27: 259-267
11. Kennerman E, Yılmaz Z, Gölcü E, Yalçın E, (2000). *Köpeklerde alt solumun yolu hastalıklarında arteriyel kan gazlarındaki değişikliklerin belirlenmesi*. Van Veterinary Journal. 11(1), 57-60.
12. King RR, Pressel MA, (2007). *Parenchymal disorders and diseases. Rubin SI, Carr AP, editors. Canine Internal Medicine Secrets*. 1st ed. Elsevier Mosby, Missouri. 196-204.
13. Knotek Z, Fichtel T, Kohout P, Benak J, (2001). *Diseases of the nasal cavity in the dog. Aetiology, symptomatology, diagnostics*. Acta Vet Brno. 70, 73-82
14. Koçhan A, İçen H, Simten YA, (2017). *İnfeksiyöz Trakeabronşitisi Köpeklerde Transtrakeal Yıkama Yöntemi ile Etiyolojik Ajanların Belirlenmesi, Prognostik Kriterler ve Sağaltım Seçenekleri*. Fırat University Medical Journal of Health Sciences. 31 (1), 11 - 19
15. Koneman E, Allen DS, Jonda WM, Schreckenberger PC, Winn WCJ, (1997). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5. Edi., pp. 268
16. Kuehn NF, (2005). *Respiratory system introduction*. 9th ed. New Jersey: Merck & Co., Inc.
17. Lappin MR, Blondeau J, Boothe D, Breitschwerdt EB, Guardabassi L, Lloyd D H, Papich MG, Rankin SC, Sykes JE, Turnidge J, Weese JS, (2017). *Antimicrobial use Guidelines for Treatment of Respiratory Tract Disease in Dogs and Cats: Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases*. J Vet Intern Med. 31(2), 279-294.
18. Maden M, Birdane FM, Alkan F, Hadimli HH, Şen İ, Aslan V, (2000). *Köpeklerde solumun yolu hastalıklarının klinik, sitolojik, bakteriyolojik ve radyografik analizi*. Veteriner Bilimleri Dergisi. 16(1): 43-50.
19. Park KM, Nam HS, Woo HM, (2013). *Successful Management of Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Pneumonia after Kidney Transplantation in a Dog*. J Vet Med Sci. 75(11): 1529-1533.
20. Peabody CR, Chung YJ, Yen MR, Vidal-Ingigliardi D, Pugsley A, Saier MH, (2003). *Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella*. Microbiology-Sgm. 149, 3051- 3072.
21. Peeters D, Day MJ, Farnir F, Moore P, Clercx C, (2005). *Distribution of leucocyte subsets in canine respiratory tract*. J of Comp Path. 132, 261-272.

22. Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS, (2005). *Pathogen–host interactions in pseudomonas aeruginosa pneumonia*. Am J Respir Crit Care Med. 171(11), 1209-1223
23. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warriner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV, (2000). *Complete genome sequence of P. aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen*. Nature. 406, 959-964.
24. Todar K (2002). *Bacteriology at UW*. Madison, University of Wisconsin –Madison, Erişim adresi: www.bact.wisc.edu./ Bact 330 / Lecture pseudomonas, Erişim Tarihi: 11.06.2018.
25. Viitanen SJ, Lappalainen AK, Koho NM, Pessa-Morikawa T, Ressel L, Rajamäki MM, (2019). *Recurrent bacterial pneumonia in Irish Wolfhounds: Clinical findings and etiological studies*. J Vet Intern Med. 1–10.

Sığır, Koyun ve Keçilerin Bovine Parainfluenza 3 Virus Enfeksiyonuna Duyarlılıklarının Saha Şartlarında Serolojik Olarak Karşılaştırılması

Sibel Gür

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar.

Geliş Tarihi / Received: 09.02.2019, **Kabul Tarihi / Accepted:** 29.03.2019

Özet: Sığır Parainfluenza tip 3 virusu (BPI3V), tüm ruminantlarda özellikle sığırlarda solunum bozukluklarına neden olan en önemli etkenler arasındadır. Koyun, keçi ve sığırların bu enfeksiyona duyarlılık seviyelerini karşılaştırmak için aynı çiftlik koşullarında en az bir yıl veya daha fazla bir süredir birlikte yetiştirilen hayvanlardan kan örnekleri alındı. Örnekler Kütahya, Manisa ve Afyonkarahisar illerindeki 12 küçük-orta ölçekli özel çiftliklerden elde edildi. 117 sığır, 432 koyun ve 302 keçinin serumları BPI3V için Serum Nötralizasyon Testi ile incelendi. Test sonuçlarına göre, seropozitiflik sığır, koyun ve keçilerde sırasıyla %76.9, %21.9 ve %27.8 olarak belirlendi. Antikor titrelerinin geometrik ortalaması sığırlarda 1:28, koyunlarda 1:10.9 ve keçilerde 1:10 idi. Enfeksiyona maruz kalmanın tüm türlerde, özellikle de sığırlarda yaygın olduğu bulundu. Koyun ve keçilerin duyarlılığı neredeyse aynıydı ancak sığırlardan daha azdı. Sonuç olarak, koyun ve keçilerin sığırlar için rezervuar konakçı olamayacağı, ancak sığırların bu diğer iki tür için daha yüksek risk potansiyeline sahip olabileceği belirlendi.

Anahtar kelimeler: Bovine Parainfluenza 3 Virus, Koyun, Keçi, Sığır.

Serological Comparison of Sensitivity of Cattle, Sheep and Goats to Bovine Parainfluenza 3 Virus Infection in Field Conditions

Abstract: Bovine Parainfluenza type 3 virus (BPI3V) are among the prominent agent that cause respiratory disorders in all ruminant species especially in cattle. In order to determine the susceptibility levels of sheep, goats and cattle to this infection, blood samples were obtained from animals that have been breeding together at the same farm conditions for at least one year or more. Samples were obtained from 12 small-medium scale private farms in Kütahya, Manisa and Afyonkarahisar provinces. The sera of 117 cattle, 432 sheep and 302 goats were examined by Serum Neutralization Test for BPI3V. According to test results, seropositivity was determined as 76.9%, 21.9% and 27.8%, in cattle, sheep and goats, respectively. The geometric mean of antibody titres was 1: 28 in cattle, 1: 10.9 in sheep and 1:10 in goats. Exposure to the infection was common in all species, especially in cattle. The sensitivity of sheep and goats was almost the same and less than that of cattle. As a result, sheep and goats could not be reservoir hosts for cattle, but cattle could have higher risk potential for other two species.

Key words: Bovine Parainfluenza 3 Virus, Serology, Turkey

Giriş

Evcil ruminant yetiştiriciliğinde tüm dünyada, özellikle gelişmiş ülkelerde en önemli sağlık sorunlarından biri solunum sistemi bozukluklarıdır [9]. Et ve süt veriminde azalma, ilaç ve tedavi giderleri ile işçilik maliyetindeki artışlar nedeniyle ciddi ekonomik kayıplara yol açar [33]. Akut solunum sistemi bozukluklarının (SSB) ortaya çıkmasında etkili olan birçok faktörün başında son derece çeşitli olabilen etiyolojik ajanlar gelir. Bakteri ve virüsler birlikte veya ayrı olarak etkin olabilir iseler de [4], asıl ajan genellikle viruslardır [8]. Solunum sistemi enfeksiyonlarının gelişimine neden olabilen çok sayıda viral etken bulunmakla birlikte, sahada en sık

izole edilen virüsler Bovine Parainfluenza tip 3 virusu (BPI3V), Bovine Herpesvirus tip 1 (BoHV1), Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV), Bovine Viral Diarrhea Viruslarıdır (BVDV) ve bu virüslerin sıklıkla miks seyrettiği bildirilmektedir [8, 10, 12, 17, 19, 28, 29, 31]. Ülkemizde de solunum sistemi virüslerinin varlık ve yaygınlıklarına yönelik çok sayıda araştırma bulunmaktadır [2, 6, 11, 30, 34].

BPI3V, *Paramyxoviridae* familyasının *Paramyxovirinae* alt familyası içerisinde bulunan *Respirovirus* genusuna dahil, zarlı, negatif polariteli, tek iplikcikli RNA virüsü olup, monopartit genom ile helikal simetrik nükleokapside sahip bir virustur

[18, 28]. Referans suşu Shipping Fever 4'tür (SF4). Saha izolatlarının filogenetik analizi sonucunda virus a, b ve c olarak üç genotip altında sınıflandırılmış, bunların da alt tipleri olduğu bildirilmiştir [23, 25, 27]. Başlıca solunum sistemini etkileyen virus, saha şartlarında son derece yaygın olarak bulunması nedeniyle, dengesiz beslenme, kapalı intensif yetiştirme, hayvanların taşınmaları gibi immundepresyona yol açan şartların varlığında akut olarak görülür ve diğer bakteriyel ve viral etkenlerin gelişimine predispozisyon oluşturarak enzootik bronko-pneumonilerin şekillenmesine yol açar [10, 12, 16, 19].

Deneysel enfeksiyonlarda sığır, koyun ve keçilerde benzer bozuklukların şekillendiği görülmüştür. Bryson ve ark. [5] kolostrum verilmemiş 13 danada yaptıkları deneysel çalışmada tipik semptomların 12 danada geliştiğini bildirmişler, patolojik incelemede ise, tüm solunum sisteminde antijen varlığı, üst ve alt solunum sisteminde epitel hücrelerinde ve alveolar makrafajlarda hiperplazi ve nekroz, siliyal hücrelerde silyum kayıpları ile tip 2 pnömonositlerde hiperplazi sonucu interalveoler septalarda kalınlaşmalar olduğunu tespit etmişlerdir. Keçilerde yapılan deneysel bir çalışmada [1], 11 keçi enfekte edilmiş, viral saçılımın 6. güne kadar devam etmesine rağmen semptom görülmediği ve BPI3V spesifik antikorların en erken 12. günde ortaya çıktığı bildirilmiştir. Hayvanlar 2-16 günler arasında ötenazi yapılarak alınan örneklerde trake, tonsil, retrofaringeal ve bronşial lenf nodülleri ve akciğer dokularında 2-5. günler arasında virus varlığı saptanmıştır. Lehmkul ve Cutlip [22], bir haftalık kolostrum almamış 5 kuzuya virus inokule etmişler, bifazik ateş, öksürük ve solunum güçlüğü, anoreksi, akciğerlerde multifokal konsolidasyon alanları, nazal mukozada ülserasyonlar belirlemiş, antijen varlığı nazal sekresyonlarda, trakeal sıvıda ve akciğer dokusunda tespit edilmiş ve tüm kuzuların serokonversiyon gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Koyun ve keçilerin BPI3V enfeksiyonuna duyarlı oldukları hem deneysel enfeksiyonlar [1, 22], hem de saha çalışmaları [3, 14, 20, 26, 32, 37, 38] ile gösterilmiş ise de, tür duyarlılıkları açısından dikkate değer bir farklılık olup olmadığı bilinmemektedir. Bu çalışmada aynı işletmede, aynı koşullar altında birlikte yetiştirilen sığır, koyun ve keçilerde BPI3V enfeksiyonunu serolojik olarak araştırarak tür duyarlılıklarına ilişkin olası farklılıklar ile, küçük ru-

minantların sığırlar için potansiyel rezervuar rolünün olup olmadığına dair bilgi edinmek ve ayrıca Afyonkarahisar ili ve çevresinde enfeksiyonun bu türlerdeki varlık ve oranlarını belirlemek amaçlandı.

Materyal ve Metot

Hayvan Materyali: Bu çalışmada en az bir yıl veya daha uzun süre aynı çiftlikte birlikte yetiştirilen sığır, koyun ve keçilerden kan serum örnekleri elde edildi. Afyonkarahisar, Manisa ve Kütahya illerinde bulunan, küçük-orta ölçekli 12 özel çiftlikten 117 sığır, 432 koyun ve 302 keçi, toplamda ise 851 örnek elde edildi (tablo 1). Örnekleme sırasında hayvanlar klinik olarak sağlıklı görünümlü idi. İşletmelerde düzenli tutulmuş sağlık kayıtları bulunmamakla birlikte çalışılması hedeflenmiş olan enfeksiyonla ilgili her hangi bir aşı uygulamasının yapılmadığı öğrenildi. Çalışmada doğal enfeksiyona yönelik araştırma yapmak amaçlandığı için, maternal antikor bulunma riskine karşı en az 6 aylık ve üstü bireyler örneklendi. Sığırlar çoğunlukla 1-4, koyun ve keçiler ise 1-3 yaş aralığında idi. Örneklemede cinsiyet açısından bir tercih yapılmamış olmakla birlikte, yaygın yetiştirme tercihleri nedeniyle her üç türde de hayvanların tamamına yakını dişi idi.

Kan örnekleri Vena Jugularis'ten silikonlu vakumlu tüplere alındı ve soğuk zincir altında laboratuara ulaştırıldı. Santrifüj edildikten sonra (3000 devir/dk, 10 dk) ayrıştırılan kan serumları stok tüplerine aktarıldı ve benmaride 56°C'de 30 dk tutularak inaktive edildikten sonra testlerde kullanılınca ya kadar -20°C'de saklandılar.

HücreKültürü: Virusun üretilme aşaması, titrasyon ve serum nötralizasyon testlerinde Madin Darby bovine kidney (MDBK) (ATCC, CCL-22) hücre hattı tercih edildi. Vasat olarak da Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) ve testin tipi ile hücrelerin gelişim aşamalarına göre %1 ile 5 aralığında değişen oranlarda Fötal Dana Serum (FDS) kullanıldı. Hücreler üretildikten sonra testlere başlanmadan önce Direkt ELISA ile pestivirus kontaminasyonu açısından kontrol edildiler.

Test Virusu: Çalışmada Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalından sağlanmış olan BPI3V'un referans suşu SF-4 kullanıldı.

Titrasyon: Kontrol virus vasat ile logaritma 10 tabanına göre 8 basamak sulandırıldı ve her sulandırmadan mikropleytin 4 gözüne 100'er µl konuldu. Virus kontrol için 50'şer µl saf virus ile vasat, hücre kontrol için 100'er µl serumlu vasat konuldu ve tüm kuyucuklara 50 µl hücre süspansiyonu (300.000 hücre/ml) ilave edilerek etüve kaldırıldı. Viral üremeye bağlı olarak gelişen sitopatolojiler 24 ve 48. saatlerde incelenerek DKID₅₀ ve 100DKID₅₀ değerleri hesaplandı.

Serum Nötralizasyon testi: Bu çalışmada BPI3V spesifik antikorlarının tespiti için mikro serum nötralizasyon test (SNT) kullanıldı. Elde edilen kan serumları vasat ile 1/5 oranında sulandırıldıktan sonra 96 gözlü mikropleytin ikişer gözüne 50 µl olarak konuldu. Üzerine eşit miktarda 100DKID₅₀ oranında sulandırılmış referens kontrol virus konularak etüvde (%5 CO₂, 37°C) 1 saat inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda tüm gözlerle aynı miktarda hücre ilave edilerek etüve kaldırıldı. Bir gün sonra doku kültürü mikroskopuyla değerlendirilen örneklerden pozitif olanlar Serum Nötralizasyon₅₀ (SN₅₀) testine tabi tutuldular. Serum örneklerinin 1/5, 1/10...1/160

aralığında seri sulandırmaları aynı yöntemle tekrar test edilerek antikor titre değerleri saptandı.

Bulgular

Titrasyon Sonuçları: Titrasyon testi sonucunda kontrol virusun doku kültür infektif dozu (100DKID₅₀/0.1ml) 10^{-4.5} olarak tespit edildi.

Serolojik veriler: Serumlarının en az 1/5 oranında yapılan sulandırılmasında viral üreme görülmeyen örnekler pozitif olarak kabul edildi. BPI3V spesifik antikorlar tüm işletmelerde sığır ve koyunlarda tespit edilirken 3 işletmede (2, 4 ve 12 nolu işletmeler) keçilerin tamamının negatif olduğu görüldü. Sığırlarda en düşük oran 9 nolu işletmede %28.5 (2/7) olarak belirlenirken, 7, 11 ve 12 nolu işletmelerde %100 seropozitiflik olduğu görüldü, toplamda ise 117 sığırın 90'ının (%76.9) antikor taşıdığı tespit edildi. Koyunlarda %12.5 ile %43.1 aralığında değişen seropozitiflik, tümünün %21.9'unda (95/432) saptandı. Keçilerde ise en yüksek oran %58.3 (14/24) ile 6 nolu işletmede saptandı, tüm keçilerin 84'ünün (%27.8) BPI3V antikorunu taşıdıkları belirlendi (tablo 1).

Tablo 1. Örneklenen sığır, koyun ve keçi sayıları ile BPI3V spesifik antikor verileri

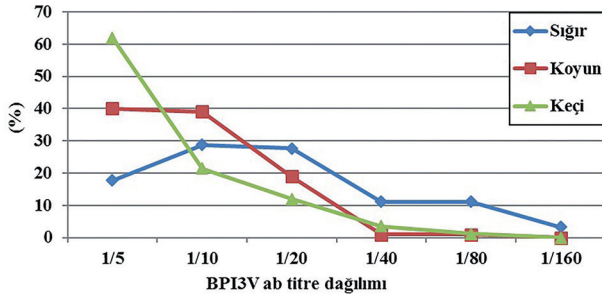
Çiftlik No	İller	Sığır			Koyun			Keçi		
		HS*	Ab	%	HS	Ab	%	HS	Ab	%
1	Kütahya	12	6	50	8	1	12.5	9	3	33.3
2	Kütahya	17	16	94.1	7	1	14.2	7	0	0
3	Kütahya	15	14	93.3	6	1	16.6	13	4	30.7
4	Manisa	9	3	33.3	29	6	20.6	2	0	0
5	Manisa	9	8	88.8	55	7	12.7	8	2	25
6	Afyon	4	2	50	27	9	33.3	24	14	58.3
7	Afyon	11	11	100	71	10	14	57	9	15.7
8	Afyon	9	6	66.6	56	12	21.4	15	3	20
9	Afyon	7	2	28.5	80	15	18.7	56	13	23.2
10	Afyon	4	2	50	58	25	43.1	66	13	19.6
11	Afyon	10	10	100	25	6	24	40	23	57.5
12	Afyon	10	10	100	10	2	20	5	0	0
Toplam	Gözlenen	117	90	76.9	432	95	21.9	302	84	27.8
	Beklenen	117	37	31.6	432	137	31.7	302	95	31.6
ATGO**		28			10.9			10		

HS*, Hayvan Sayısı BPI3V Ki-Kare=131.63; p<0.05 ATGO

**Antikor titrelerinin Geometrik Ortalamaları

Türlere göre BPI3V antikor titre dağılımları incelendiğinde, sığırlarda 1/10 ile 1/20 titrelerde en yüksek seviyenin olduğu ancak 1/5 sulandırmadan

itibaren keçilerde titrenin hızla azaldığı, koyunlarda ise keçilere oranla daha ılımlı bir azalma gösterdiği belirlendi.



Şekil 1. BPI3V seropozitif sığır, koyun ve keçilerde anti-kor titre dağılımları

İstatistiksel Analiz: Çalışılan virusa karşı, ki-kare testi kullanılarak yapılan incelemeler sonucunda türler arasında duyarlılık bakımından fark bulunduğu tespit edildi ($p < 0.05$). Enfeksiyonlara maruz kalma açısından seropozitiflik dağılımları incelendiğinde koyun ve keçilerin her iki enfeksiyona da duyarlılıklarının benzer olduğu ancak sığırların koyun ve keçilere nazaran daha duyarlı olduğu sonucuna ulaşıldı (BPI3V için Ki-kare=131.63; $p < 0.05$). Çiftlikler arasında fark bulunmakla birlikte bazı çiftliklerde istatistiksel değerlendirme yapabilmek için yeterli sayıda hayvan bulunmadığı için analizlerde tüm sürülerden elde edilen veriler birlikte değerlendirildi.

Tartışma ve Sonuç

Her ne kadar koyun ve keçilerin BPI3V enfeksiyonuna duyarlı oldukları biliniyor olsa da, tür duyarlılık farklılıklarına dair net bir veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada söz konusu virusun bölgedeki insidenslerinin ortaya konulmasından daha önemli olarak, saha şartlarında yaygın olarak yetiştirilen bu üç ruminant türünde, tür duyarlılık seviyelerine dair veri elde etmek amaçlandı. Örneklerin alınacağı çiftlikler belirlenirken hayvanların yerli olmaları, söz konusu viruslar için aşısız olmaları, en az son 1 yıl veya daha fazla bir süredir aynı çiftlik şartlarında yetiştirmekte oldukları, çiftlik çalışanlarının değişken olmadığı küçük-orta ölçekli özel çiftlikler olmalarına dikkat edildi. Çalışılan işletmelerin hiç birinde sürü hekimi/danışman bulunmadığı ve bakanlık tarafından yürütülen rutin aşılamalar dışında bir aşı uygulaması yapılmadığı kaydedildi. Sahada bu niteliklere haiz, 3 türün birlikte yetiştirildiği çiftliklere oldukça nadir rastlanmaktadır. İşletmelerdeki hayvan sayıları son derece değişken olduğundan

ve istatistiksel değerlendirme yapmaya uygun hayvan sayısına her işletmede ulaşılamadığı için çiftlik bazında analizler yapılamadı ve istatistiksel analiz toplam hayvan sayısı üzerinden değerlendirildi.

Bu çalışmada örnek alınan sürüler yeni oluşturulmuş sürüler değildi ve tümünde toplam sığır sayısı 30'dan az idi. Sadece birkaç işletmede 100'ün üstünde koyun keçi bulunmakta idi. Sığırlar kış aylarında kapalı ahır şartlarında yetiştirilmekle birlikte hava şartlarının uygun olduğu aylarda küçük ruminantlarla birlikte meraya çıkarılmakta oldukları bilgisi alındı. Koyun ve keçilerin tamamen karışık olarak, sığır barınağı ile bitişik veya çok yakınında yarı açık ağıllarda tutulmakla oldukları, yılın büyük bölümünde meraya çıkarıldıkları ve sulama üniterinin çiftlik içinde tüm hayvanlar tarafından ortak kullanıldığı bildirildi. Ayrıca örnek alınan işletmelerin tamamı aile tipi küçük işletmeler oldukları için, hiç birinde profesyonel çalışan bulunmadığı ve çiftliğin tüm işlerinin aile üyeleri tarafından yapıldığı öğrenildi. Bu şartlar altında virusun direkt-indirekt ve aerosol bulaşma riskinin çok yüksek olabileceği görülmektedir. Ayrıca barınak temizliklerinin genelde tek bir kişi tarafından yapıldığı ve hayvan sağımının aynı veya farklı ancak yine tek bir kişi tarafından yapıldığı bilgisi göz önüne alındığında, bireyler ve türler arası bulaşmalarda insan faktörünün de önemli olabileceği anlaşılmaktadır.

Elde edilen test sonuçlarına göre, örnek alınan tüm çiftliklerde, tüm sığır ve koyunlarda BPI3V spesifik antikorlar tespit edildi. Keçilerde pozitifliğin gözlenmediği 12 işletmenin 3'ünde (2, 4 ve 12 nolu işletmeler) alınan örnek sayısı oldukça az idi (2-7 arası). Tüm işletmeler değerlendirildiğinde en yüksek oranlar; sığırlarda 3 işletmede %100, koyunlarda 10 nolu işletmede %43.1 ve keçilerde ise 6 nolu işletmede %58.3 olarak belirlendi (tablo 1). Toplamda ise sığırlarda %76.9, koyunlarda %21.9 ve keçilerde 27.8 oranları belirlendi. Bu güne kadar ülkemizin farklı yerlerinde bu üç türde yapılan serolojik incelemeler örnekleme yapıldığı andan geriye dönük olarak yaklaşık bir yıl içindeki virusa maruz kalma durumunu ortaya koyan saha çalışmalarıdır. Ayrıca örnekleme yapılan işletmelerin genellikle tek bir türün yetiştiriciliğinin yapıldığı işletmeler oldukları dikkat çekmektedir. Araştırmalar BPI3V enfeksiyonunun tüm dünyada olduğu gibi [13, 19, 21, 24], ülkemizin farklı bölgelerinde

yapılan araştırmalarda sığırlarda oldukça yüksek seviyedeki yaygınlığını ortaya koymaktadır. Alkan ve ark. [2] bir çok ilden aldıkları örneklerde % 52.7 (229/434) oranında BPI3V spesifik antikor varlığı belirlenmiştir. Malatya'da %89.7 (897/1.000) [26], Kuzeybatı Anadolu'da %43 (251/584) [36], Konya'da %91.1 (164/180) [15], Aydın'da %38.2 (110/288) [11], Doğu ve Güneydoğu Anadolu'da %18 (85/471) [7] oranları bildirilmiştir. Küçük ruminantlarda yürütülen araştırmalar sığırlara göre daha azdır ancak koyunlarda akut solunum sistemi bozukluklarında yüksek seviyede spesifik antikor varlığını bildiren araştırmalar vardır. Yüzbaşıgil [38] 200 adet pnömonili kuzunun akciğer dokusunu incelemiş, 8'inde immuno-histokimyasal yöntemlerle BPI3 antijeni tespit etmiş, bu dokularda yaptığı bakteriyolojik incelemeler sonucunda %45.50 oranında bakteri izolasyonu yapmış, BPI3V pozitif olan örneklerde örneklerde *M. Haemolytica* ile *P. multocida* bakterilerini de izole etmiş, en çok izole edilen etkenin *M. haemolytica* (%20.50) olduğunu bildirmiştir. Kuzeybatı Anadolu'da yapılan bir araştırmada toplam 288 koyunda %8.8 ve 160 keçide %19.7 seropozitiflik bildirilmiştir [37]. Elazığ ve Malatya illerinde yapılan bir başka çalışmada keçilerde %16, koyunlarda %7.6 oranı tespit edilmiştir [20]. Keçilerde yapılan çalışmalarda Turan ve Bolat [32] Diyarbakır ve Şanlıurfa illerinde %47.1, Van ilinde Ataseven ve ark. [3] %5.2 (21/407) seropozitiflik bildirmişlerdir. Yener ve ark. [35] Bitlis ve Van illerinde çalışmış, histopatolojik olarak pnemoni teşhisi koydukları keçi akciğer dokularında %66.6 oranında antijen tespit etmişlerdir. Bu çalışmanın yapıldığı bölgede, Gür ve ark. [14] Afyonkarahisar, Konya ve Eskişehir illerinden elde ettikleri 1.346 keçi örneğinde %43.3 seropozitiflik saptamışlardır. Bu araştırmada keçilerde belirlenen oranlar biraz daha az olmakla birlikte örneklerin bölge, zaman ve sürü farklılıkları göz önünde tutulduğundan normal karşılanabilir. Tespit edilen oranlar ülkemizde son yıllarda yapılan araştırmalarla karşılaştırıldığında uyumlu kabul edilebilecek değerlerdir.

Virusun epidemiyolojik özellikleri ve işletmelerdeki yetiştirme şartlarına bağlı bulaşma dinamikleri göz önüne alındığında enfeksiyonun tüm türlerde eşzamanlı seyredeceği öngörüldü. Genel olarak, tüm türlerde antikor titreleri yüksek değildi. Her ne kadar grafik 1'de verilen antikor titre dağı-

lımları çiftlik bazında değil, tüm veriler üzerinden hazırlanmış ise de, söz konusu enfeksiyonun örneklemenin yapıldığı zamana çok yakın bir dönemde geçirilmediği anlaşılmaktadır. Yine de yaklaşık son bir yıl içinde klinik veya subklinik olarak doğal enfeksiyona maruz kalındığı ve serokonversiyon şekillendiği görülmektedir. Çalışılan türler içinde BPI3V enfeksiyonuna en duyarlı tür sığırlardır. Koyun ve keçilerin daha az duyarlı oldukları fakat bu iki türde belirlenen oranların birbirine çok yakın olması dolayısıyla duyarlılıklarının da benzer olduğu sonucuna varıldı. Spesifik antikor varlığı üzerinden yapılan istatistik analizlerin ortaya koyduğu bu değerlendirmeyi tam olarak destekleyen bir diğer veri de, seropozitif hayvanlarda belirlenen antikor titre oranlarıdır. Antikor titrelerinin geometrik ortalamaları sığırlarda 1:28 iken, bu değer koyun ve keçilerde sırasıyla 1:10.9 ve 1:10 olarak belirlendi. Bu veriler ışında koyun ve keçilerin, sığırlar için rezervuar konakçı rollerinin olamayacağı fakat tam tersinin daha mümkün olabileceği kanısına varıldı. Yine de söz konusu üç türün birlikte yetiştirildiği veya sahada daha sık rastlanan şekli ile koyun ve sığırın birlikte bulundurulduğu işletmelerde, türler arası bulaşmaların her zaman mümkün olduğu göz önünde tutularak, genel yetiştirme şartlarının optimal seviyelerde sağlanmasının yanı sıra, viral enfeksiyonlar ile mücadele çalışmalarında bu türlerin birlikte değerlendirilmeleri gerekmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Komisyonu tarafından 17.KARİYER.117 nolu proje olarak desteklenmiştir. Yazar, çalışmaya istatistiksel analiz konusunda destek veren Doç.Dr.İbrahim KILIÇ'a teşekkür eder.

Kaynaklar

1. Afshar A, Terlecki S, (1979). *Experimental infection of goats with parainfluenza virus type 3*. Zentralbl Veterinarmed B. 26, 641-651.
2. Alkan F, Özkul, A, Karaoğlu MT, Bilge S, Akça Y, Burgu İ, Yesilbağ K, Oğuzoğlu TÇ, (1997). *Sığırlarda viral nedenli solunum sistemi enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi*. Ankara Univ Vet Fak Derg. 44, 73-80.
3. Ataseven VS, Başaran Z, Yılmaz V, Bilge-Dağalp S, (2010). *Van Bölgesi Keçilerinde Parainfluenza Virus-3 (PIV-3) ve Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) Enfeksiyonlarının Seroprevalansı*. Y YUniv Vet Fak Derg. 21, 7-9.

4. Autio T, Pohjanvirta T, Holopainen R, Rikula U, Pentikainen J, Huovilainen A, Rusanen H, Soveri T, Sihvonen L, Pelkonen S, (2007). *Etiology of respiratory disease in non-vaccinated, non-medicated calves in rearing herds*. Vet Microbiol. 119, 256-265.
5. Bryson DG, McNulty MS, Ball HJ, Neill SD, Connor TJ, Cush PF, (1979). *The experimental production of pneumonia in calves by intranasal inoculation of parainfluenza type III virus*. Vet Rec. 105, 566-573.
6. Burgu İ, Öztürk F, Akça Y, Tokar A, (1984). *Karacebey harası sığırlarında parainfluenza-3 virusunun neden olduğu viral pnömoni olayı*. Ankara Univ Vet Fak Derg. 31, 180-185.
7. Çabalar M, Can- Şahna K, (2000). *Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde Süt Sığırlarında Parainfluenza Virus-3, Bovine Herpes Virus-1 ve Respiratory Syncytial Virus Enfeksiyonlarının Seroepidemiolojisi*. Y Y Ü Vet Fak Derg. 11, 101-105.
8. Caldwell GL, Edwards S, Peters AR, Nixon P, Ibata G, Sayers R, (1993). *Associations between viral infections and respiratory disease in artificially reared calves*. Vet Rec. 133, 85-89.
9. Callan RJ, Garry FB, (2002). *Biosecurity and bovine respiratory disease*. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 18, 57-77.
10. Ellis JA, (2009). *Update on viral pathogenesis in BRD*. Anim Health Res Rev. 10, 149-153.
11. Erol N, Gür S, Yıldırım Y, Tan MT, (2007). *Serological Investigation on Parainfluenza-3 (PI-3) and Bovine Adenovirus (BAV) Infections in Dairy Cow Enterprises in Aydın Province*. Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 13, 43-47.
12. Fulton RW, Purdy CW, Confer AW, Saliki JT, Loan RW, Briggs RE, Burge LJ, (2000). *Bovine viral diarrhea viral infections in feeder calves with respiratory disease: interactions with Pasteurella spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus*. Can J Vet Res. 64, 151-159.
13. Gay E, Barnouin J, (2009). *A nation-wide epidemiological study of acute bovine respiratory disease in France*. Prev Vet Med. 89, 265-271.
14. Gür S, Erol N, Yapıcı O, (2009). *Afyon, Konya ve Eskişehir İllerinde Keçilerde Pestivirus ve Parainfluenzavirus Tip 3 Enfeksiyonlarının Serolojik Olarak Araştırılması*. Kocatepe Vet J. 2, 23-27.
15. Gürses E, (2008). *Sığırların viral solunum yolu Enfeksiyonlarının Serolojik olarak araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
16. Hartel H, Nikunen S, Neuvonen E, Tanskanen R, Kivela SL, Aho R, Soveri T, Saloniemi H, (2004). *Viral and bacterial pathogens in bovine respiratory disease in Finland*. Acta Vet Scand. 45, 193-200.
17. Hay KE, Barnes, TS, Morton JM, Gravel JL, Commins MA, Horwood PF, Ambrose RC, Clements ACA, Mahony TJ, (2016). *Associations between exposure to viruses and bovine respiratory disease in Australian feedlot cattle*. Prev Vet Med. 127, 121-133.
18. Henrickson KJ, (2003). *Parainfluenza Viruses*. Clin Microbiol Rev. 16, 242-264.
19. Jericho KWF, Darcel Cle Q, Langford EV, (1982). *Respiratory Disease in Calves Produced with Aerosols of Parainfluenza-3 Virus and Pasteurella haemolytica*. Can J Comp Med. 46, 293-301.
20. Kandil M, Özdarendeli A, Metin N, Gülcü BH, (1996). *Elazığ ve Malatya illerinde Koyunlarda ve Keçilerde Parainfluenzavirus Tip-3'e Karşı Hemaglutinasyonu Önleyici Antikorlar Üzerinde Serolojik Araştırma*. VHAG-Proje No: 1038.
21. Lamontagne L, Descoteaux JP, Roy R, (1985). *Epizootiological survey of parainfluenza-3, reovirus-3, respiratory syncytial and infectious bovine rhinotracheitis viral antibodies in sheep and goat flocks in Quebec*. Can J Comp Med. 49, 424-428.
22. Lehmkuhl HD, Cutlip RC, (1983). *Experimental parainfluenza type 3 infection in young lambs: clinical, microbiological, and serological response*. Vet Microbiol. 8, 437-442.
23. Neill JD, Ridpath JF, Valayudhan BT, (2015). *Identification and genome characterization of genotype B and genotype C bovine parainfluenza type 3 viruses isolated in the United States*. BMC Vet Res. 11, 112.
24. Norstrom M, Skjerve E, Jarp J, (2000). *Risk factors for epidemic respiratory disease in Norwegian cattle herds*. Prev Vet Med. 44, 87-96.
25. Oem JK, Lee EY, Lee KK, Kim SH, Lee MH, Hyun BH, (2013). *Molecular characterization of a Korean bovine parainfluenza virus type 3 isolate*. Vet Microbiol. 162, 224-227.
26. Özdarendeli A, Kandil M, (2001). *Malatya'da Sığırlarda Parainfluenzavirus Tip-3 Enfeksiyonu Üzerinde Serolojik Araştırma*. Turk J Vet Anim Sci. 25, 223-226.
27. Qiao D, Janke BH, Elankumaran S, (2009). *Molecular characterization of glycoprotein genes and phylogenetic analysis of two swine paramyxoviruses isolated from United States*. Virus Genes. 39, 53-65.
28. Reisinger RC, Heddleston KL, Manthei CA, (1959). *A myxovirus (SF-4) associated with shipping fever of cattle*. J Am Vet Med Assoc. 135, 147-152.
29. Richer L, Marois P, Lamontagne L, (1988). *Association of bovine viral diarrhea virus with multiple viral infections in bovine respiratory disease outbreaks*. Can Vet J. 29, 713-717.
30. Şimsek A, Gürçay M, Parmaksız A, İçen H, Sekin S, Koçhan A, Çelik ÖY, Çakmak F, (2017). *Diyarbakır Yöresindeki Sığırların Sindirim ve Solunum Sistemi Problemlerinde Enzootik Bovine Leukosis (EBL), Bovine Viral Diare (BVD), Enfeksiyöz Bovine Rhinotracheitis (IBR) ve Mavi Dil (BT) Enfeksiyonlarının Rollerinin Araştırılması*. Dicle Üniv Vet Fak Derg. 10, 13-18.
31. Snowden GD, Van Vleck LD, Cundiff LV, Bennett GL, (2006). *Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Environmental, genetic, and economic factors*. J Anim Sci. 84, 1999-2008.

32. Turan T, Bolat Y, (1999). Diyarbakır ve Şanlıurfa yöresinde yetiştirilen keçilerde Parainfluenzavirus tip-3 enfeksiyonunun seroepidemiolojisi. Fırat Üniv Sağlık Bil Derg. 13, 49-55.
33. Van Der Fels-Klerx HJ, Sorensen JT, Jalvingh AW, Huirne RB, (2001). An economic model to calculate farm-specific losses due to bovine respiratory disease in dairy heifers. Prev Vet Med. 51, 75-94.
34. Yavru S, Şimşek A, Yapkiç O, Kale M, (2005). Serological evaluation of viral infections in bovine respiratory tract. Acta Vet Beograd. 55, 219-226.
35. Yener Z, Sağlam YS, Timurkan N, İlhan F, (2005). Immunohistochemical detection of Parainfluenza Type 3 Virus antigens in paraffin sections of pneumonic caprine lungs. J Vet Med. 52, 268-271.
36. Yeşilbağ K, Güngör B, (2007). Seroprevalence of Bovine Respiratory Viruses in North- Western Turkey. Trop Anim Health Prod. 40, 55-60.
37. Yeşilbağ K, Güngör B, (2009). Antibody prevalence against respiratory viruses in sheep and goats in North-Western Turkey. Trop Anim Health Prod. 41, 421-425.
38. Yüzbaşıgil AF, (2010). Kuzu pnömonilerinde patolojik ve Bakteriyolojik incelemeler ile Parainfluenza 3 (PI3) virüsünün Etiyolojideki rolü. Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

The Investigation of Cell Adhesion Molecules in the Lung Tissues of Cattle with Cystic Echinococcosis

Orhan Yavuz¹, Güngör ağdaş Dinel², Sami Gkpnar³, Ali Evren Haydardedeoęlu⁴

¹Aksaray University, Faculty of Veterinary Medicine Department of Pathology, Aksaray Turkey.

²Aksaray University, Eskil Vocational School, Veterinary Department, Aksaray Turkey.

³Kırıkale University, Faculty of Veterinary Medicine Department of Parasitology, Kırıkale, Turkey.

⁴Aksaray University, Faculty of Veterinary Medicine Department of Internal Medicine, Aksaray Turkey.

Geliş Tarihi / Received: 06.02.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 22.05.2019

Abstract: Cystic echinococcosis is a zoonotic disease with worldwide distribution caused by *Echinococcus granulosus*, represents a substantial global health problem. Hydatid cyst (*Echinococcus*) has a remarkable negative effect on the health of people and the economic development of the country. The objective of this study was to investigate the CD68, nicotinamide nucleotide adenyltransferase 3 (NMNAT 3), Neuregulin 1 (NRG1) and Neuregulin 2 (NRG2) expressions in bovine lungs infected with *E. granulosus* and to identify whether they have any correlation with pulmonary pathology. For this purpose, 30 bovine lung tissues were used between January 2016 and December 2016 collected in Kırıkale slaughterhouse. In histopathologic examinations, proliferation of fibrous connective tissue and infiltration of mononuclear cells were detected in the lung tissues of the bovine. Most of the cysts were seen to be quite thick capsule. There was also a cellular line rich in abundant fibroblasts and mononuclear cells. The cyst wall was found to be an eosinophilic laminar structure. There was infiltration with lymphocytes and macrophages, especially eosinophils and giant cells. Immunohistochemically, CD68 positivity was seen around the bronchi, bronchioles and cystic matter. However; NMNAT 3, NRG1 and NRG2 showed no positive reactions in macrophages, bronchi, bronchioles and alveolar epithelium. These results indicate that NMNAT 3, NRG1 and NRG2 pathways were not used in pulmonary pathology. Therefore, it is the most important result of the study that the adhesion molecules in pulmonary pathology are not originating from NMNAT 3, NRG1 and NRG2.

Key words: CD68, NMNAT 3, Neuregulin 1, Neuregulin 2, Pathology

Kistik Ekinokokkozisli Sığır Akciğerlerinde Hücre Adezyon Molekllerinin Araştırılması

zet: Kistik ekinokokkozis, dünya çapında *Echinococcus granulosus*'un neden olduğu geniş dağılımı olan zoonotik bir hastalıktır ve önemli bir küresel sağlık sorunudur. Kist hidatid (*Echinococcus*), insan sağlığı ve ülkenin ekonomik gelişimi üzerinde dikkate değer bir olumsuz etkiye sahiptir. Bu çalışmanın amacı *E. granulosus* ile enfekte olmuş sığır akciğerlerinde CD68, nikotinamid nükleotid adenililtransferaz 3 (NMNAT 3), Neuregulin 1 (NRG1) ve Neuregulin 2 (NRG2) ekspresyonlarını araştırmak ve pulmoner patoloji ile herhangi bir korelasyon olup olmadığını saptamaktır. Bu amaçla Kırıkale kesimhanesinde Ocak 2016 ile Aralık 2016 arasında toplanan 30 adet büyükbaş akciğer dokusu kullanıldı. Histopatolojik incelemede, sığırların akciğer dokularında fibröz bağ dokusu proliferasyonu ve mononükleer hücrelerin infiltrasyonu saptandı. Kistlerin çoğunun oldukça kalın bir kapsülü olduğu görüldü. Ayrıca fibroblastlar ve mononükleer hücreler bakımından zengin bir hücresel hat vardı. Kist duvarının eozinofilik bir laminar yapı gösterdiği tespit edildi. Lenfosit, makrofaj, özellikle eozinofil infiltrasyonları ve dev hücrelerinin de grldğu yangısal alanlar dikkati çekti. İmmünhistokimyasal olarak, CD68 ekspresyonları bronş, bronşiyol ve kistik yapının etrafında gözlendi. NMNAT 3, NRG1 ve NRG2 makrofajlarda, bronş, bronşiyol ve alveolar epitellerinde hiçbir pozitif reaksiyon göstermemiştir. Bu sonuçlar, pulmoner patolojide NMNAT 3, NRG1 ve NRG2 yollarının kullanılmadığını göstermektedir. Bu nedenle, çalışmanın en önemli sonucu, pulmoner patolojide adezyon moleküllerinin NMNAT 3, Neuregulin 1 ve Neuregulin 2'den kaynaklanmadığıdır.

Anahtar kelimeler: CD68, NMNAT 3, Neuregulin 1, Neuregulin 2, Patoloji

Introduction

Cystic echinococcosis (CE), also known as hydatid cyst, is a zoonotic disease caused by *Echinococcus granulosus* and is widely observed in our country and in the world. The definitive host of *E. granulo-*

sus is varies where there are many wild carnivores except the dog and red foxes. Human and animals such as sheep, cattle, and swine are the intermediate host of the parasite. The definitive hosts are infected by taking the infected organs by the alimentary

route. Adult parasites are consist of the released protoscolexes. The final host contaminates the environment with pregnant rings thrown from adult parasites [19].

Clinical findings of hydatid cyst may not be seen for years due to the slow development of the cyst and its importance in organelle localization. The size of the lesions is directly proportional to the location of the cyst in the host [21]. Molecular characterization studies have shown that there are genetic differences among *E. granulosus* isolated from different hosts and countries [29]. Therefore, the control of CE is important for revelation of the strains seen in endemic regions, and it is important to control the disease [8].

NAD is the coenzyme that involved in many metabolic enzymatic reactions. Nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 3 (NMNAT-3) regulates the mitochondrial NAD level in the mitochondria in cells. Previous studies have shown that NMNAT-3 is expressed in lung tissue [3]. However, there were no studies found about this molecule in domestic animals in CE cases. Neuregulin 1 (NRG1) is a trophic factor that is indicative of an epidermal growth factor (EGF) signaling by inducing ErbB receptor tyrosine kinases [10,28]. Neuregulin 2 (NRG2), an insert variant of NRG1, is a transmembrane protein that assists in the regulation of cell proliferation, cellular differentiation and survival [4, 5]. As shown by the studies, NRG1 and NRG2 were expressed in the lung epithelial tissues [22]. It has been reported, these molecules found especially in alveolar, bronchial and bronchiolar epithelia. In recent years, the effectiveness of these molecules has been investigated in lung cancers and inflammatory cases. It has been concluded that it has anti-inflammatory action in inflammatory cases. Cluster of Differentiation 68 (CD68) is a protein that is excreted in large amounts from tissue macrophages in tissues and monocytes in the blood [16].

In this study, the presence of NMNAT 3, NRG1, NRG2 and CD68 expressions were investigated in *E. granulosus* in naturally infected bovine lungs. In addition, it was aimed to investigate the role of inflammatory response of these molecules in lung in CE. Thus, it has been try to determine whether there is a relationship between pulmonary pathology and the expressions of these markers.

Materials and Methods

Materials

Materials were collected from Kırıkkale slaughterhouse. Regular checks were conducted between January 2016 and December 2016. During this time, 45 lung tissues with cysts hydatid were collected. The infected lung tissues of these 45 animals were classified as firstly macroscopic and then histopathological according to their severity. Macroscopically, a total of 30 bovine lung tissues with at least one cyst in all lobes of the lung were included in the study (Figure 1 A-B). However, in order to examine the entire cyst structure in a histology slide, cystic tissues smaller than 1 cm in diameter were processed histopathologically.

Methods

Histopathological Method

After the fixation procedure, the lung tissues were subjected to alcohol, xylol and paraffin wax respectively. Subsequently the tissues were cut at 5 μ m thickness of sections by microtome, glued to slides and examined under light microscope, after stained by haematoxylin and eosin staining [18].

The following criteria were evaluated semi-quantitatively for histopathological scoring of the cases. Cyst diameter (mm), inflammatory cell and fibrous tissue infiltrations (No lesion: 0, Mild: +1, Moderate: +2 and Severe: +3). Data were statistically described in terms of mean and standard deviation (mean \pm SD) for histopathological scoring.

Immunohistochemical Method

Indirect immunoperoxidase method was used for immunohistochemical results. For this purpose, 5 μ m thick sections of paraffin wax were adhered to positive charged slides. The sections were dried in a 60 °C oven for 15 min. Then these sections were subjected to 3 times for 5 minutes xylene and then 96%, 90%, 80%, 70% and 50% alcohols for the deparaffinization procedure. At the end of this process, sections were boiled in citrate buffer solution for 20 min for antigen retrieval procedure. Then 3% H₂O₂ was added to the sections to remove peroxidase activity and incubated for 7 min. After this process, the block solution was added for 5 min and the primary antibodies [Anti-NMNAT-3 antibody

(Santa Cruz Biotechnology, inc. sc-390433), Anti-Neuregulin-1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, inc. Sc-57384), Anti-Neuregulin-2 antibody (Santa Cruz Biotechnology, inc. Sc-398594) and Anti CD68 antibody (Santa Cruz Biotechnology, inc. sc-514937)] were incubated for 2 hours. At the end of the incubation, biotinylated secondary antibody and streptavidin solution were added at 15 minute inter-

vals. The sections were finally stained with aminoethyl carbazole (AEC). After counter-staining with hematoxylin, slides were closed by coverslips and evaluated under a light microscope. The negative control slides were also stained according to the same procedure. However, PBS was used instead of the primary antibody.

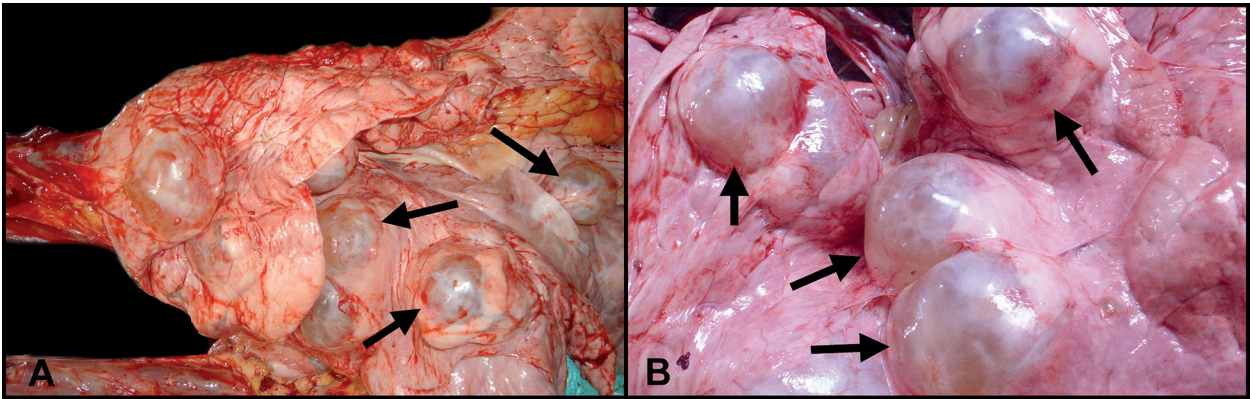


Figure 1. A. Gross appearances of cysts in the lung (arrows). B. Close up view of cysts (arrows).

Results

Histopathological lesion scores were given into the table 1. Histopathological examination revealed fibrous connective tissue proliferation and infiltration of mononuclear cells in lung tissues of cattle (Figure 2A). Most of the cysts had a thick capsule. In most cases, the cyst wall showed an eosinophilic laminar

structure. In the inflammation sites, lymphocytes, macrophages, eosinophil granulocyte and foreign body giant cell infiltrations were seen (Figure 2B). Alveolar canals were enlarged and an inflammatory infiltrate was found in some peribronchial and peribronchiolar areas (Figure 2C). In some cases, bronchiolar epithelial cell atrophy and emphysema areas were remarkable.

Table 1. The statistics of cyst diameter and lesion scores of histopathological examinations

N=30	Cyst diameter (mm)	Inflammatory cell infiltrations score	Fibrous tissue score
Mean + Std error od Mean	5.85 ± 0.539	1.95 ± 0.169	1.5 ± 0.211
Std Deviation	2.412	0.759	0.945

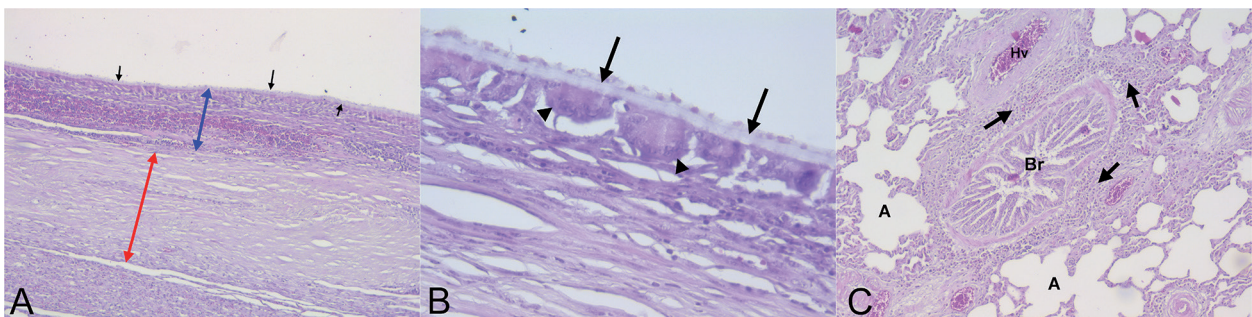


Figure 2. A. Mononuclear cell infiltrations (blue arrow) around the cyst wall (black arrows) and fibrous connective tissue (red arrow). X40. HE. B. Cyst wall (black arrows) and foreign body giant cell infiltrations (arrowheads). X400. HE. C. Enlargement of the alveoli (A), hyperemia in the blood vessels (Hv) and inflammatory cell infiltrations (arrows) around the bronchiolar (Br) area. X40. HE.

As a result of immunohistochemical investigations, NMNAT 3, NRG1 and NRG2 expressions were not observed (Figure 3A-C). CD68 expressions were found to be positive for intracytoplasmic

reactions in macrophages in the inflammatory cell surrounding the cyst and in some cases macrophages in the peribronchial and peribronchiolar areas (Figure 3D-E).

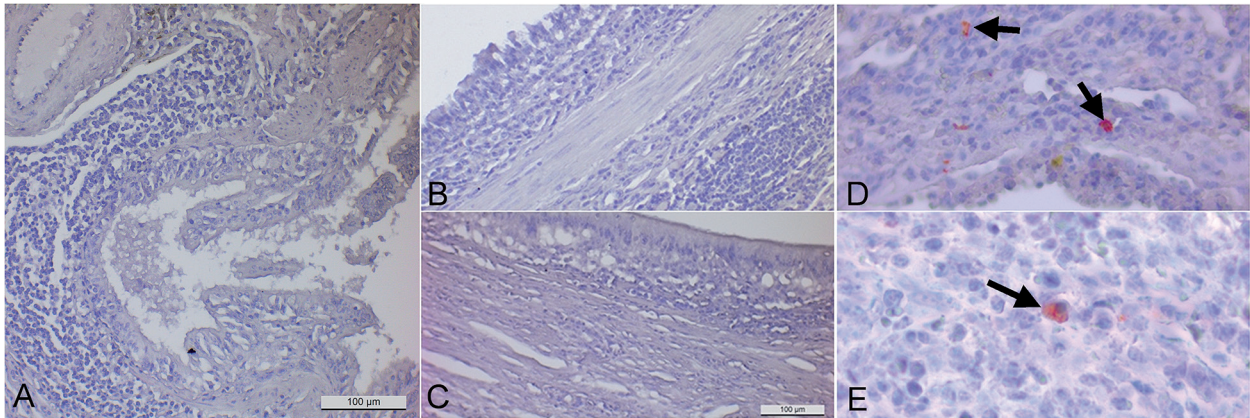


Figure 3. A-C. Immunonegative reactions in the lung tissue of NMNAT-3, NRG1 and NRG2. X100. AEC. D-E. intracytoplasmic positive immunostaining in the macrophages in the inflammatory cell infiltrations (arrows). X400. AEC.

Discussion and Conclusion

Cystic echinococcosis is a serious zoonotic disease in countries where environmental health and preventive medicine measures are not cared enough. It has a wide spread due to its presence all over the world. It is widely seen all over the world. Dogs and wild canines have a major role in the transmission of disease [14]. In this context, it is very important to reveal the pathological changes and molecular reactions occur in intermediate hosts such as cattle, sheep and pigs. In this study we investigated the expression of NMNAT 3, NRG1, NRG2 and CD68 cytokines in bovine lung with CE. The main aim is to determine the pathways of the pathogenesis of the disease by the molecular level.

Some researchers have focused on specific cases on CE and they investigated the where the disease is localized [1,11,26]. In one hand, some previous investigators emphasize the molecular characterization of the agent [9,24]. On the other hand, some other researchers emphasized the importance of nad1 / cox1 gene expression by genetically locating / expressing [12,13]. In addition, a large proportion of scientist focused on the diagnosis of the disease [6,27]. Eckert et al. [7] stated that the necropsy findings are the best method for the diagnosis of CE.

However, Larrieu et al. [17] explained that they could not find a statistical difference between necropsy findings and histopathological examination in their study. In the present study, all cases in the study had both grossly and histopathological findings to confirm CE. Findings of the present study are consistent with the results of previous studies [2,15,22,25].

The studies on the pathogenesis of the disease are very limited and there are still unexplored points. Yin et al. [33] studied on the expression of TGF- β related to determine the pathogenesis of the CE. In a pathogenesis study investigating the expression of interleukin (IL) in the lungs in experimentally CE infections, the expression of IL-10 increased while IL-5 and IL-17A expression decreased [32]. Vismarra et al. [31] observed immunohistochemically positive reactions of FOXP3 around the cyst, most of which were CD3 positive. Sakamoto and Cabrera [23], obtained CD8 positive reactions in the inflammatory area around the cyst in the cattle lungs and stated that these cells could originate from lymph nodes draining the lungs. Vatankhah [30] reported CD68 positive immune reactions in inflammatory cells around the cyst in human liver tissues with CE. In this study, CD68 positive immunostaining were found in the macrophages in

the peribronchial and bronchiolar areas with associated with the inflammatory cells around the cyst in the cattle lungs. Although there is no previous study with cytokines such as NMNAT-3, NRG1 and NRG2, the expressions of these molecules were not determined in CE lung tissues.

In conclusion, the findings obtained from this study showed that NRG1 and NRG2 expressions that show a similarity between Neuregulin derivatives in the pathogenesis of CE do not make sense. Additionally, another important finding was that transferase activation (NMNAT 3) was not used as an important pathway by using nicotinamide mononucleotide mediated energy (ATP). Therefore, it is thought that antihelminthics will not play a role in the mechanism of action and the development of new therapies. However, CD68 expressions were firstly demonstrated in the cattle lung with natural CE infections.

Acknowledgement

This study was funded by Aksaray University Scientific Research Committee (ASÜBAP) with project number: 2018-002.

References

- Baradan Bagheri, A, Zibaei M, Tayebi Arasteh, M, (2017). *Cystic echinococcosis: a rare case of brain localization*. Iran J Parasitol. 12, 152-155.
- Beigh AB, Darzi MM, Bashir S, Kashani B, Shah A, Shah SA, (2017). *Gross and histopathological alterations associated with cystic echinococcosis in small ruminants*. J Parasit Dis. 41, 1028-1033.
- Berger F, Lau C, Dahlmann M, Ziegler M, (2005). *Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenyltransferase isoforms*. J Biol Chem. 280, 36334-36341.
- Carraway KL, Weber JL, Unger MJ, Ledesma J, Yu N, Gassmann M, Lai C, (1997). *Neuregulin-2, a new ligand of erbB3/erbB4-receptor tyrosine kinases*. Nature. 387, 512-516.
- Chang H, Riese DJ, Gilbert W, Stern DF, McMahan UJ, (1997). *Ligands for erbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene*. Nature. 387, 509-512.
- Dehghan MSA, Reza Hosseini O, Saberi S, Salahshour F, Mahdavi Izadi S, (2017). *Collapsed membranes within pelvic cyst: what is the diagnosis?* Clin Case Rep. 5, 199-200.
- Eckert J, Deplazes P, Craig PS, Gemmel M, Gottstein B, Heath DD, Jenkins J, Kamiya M, Lightowers MH, (2001). *Echinococcosis in animals: clinical aspects, diagnosis and treatment*. Eckert J, Gemmel M, Meslin F, Pawlowski Z. eds. Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern. WHO/OIE, France, p.72-86.
- Eckert J, Thompson RCA, (1997). *Intraspecific variation of echinococcus granulosus and related species with emphises on their infectivity to humans*. Acta Trop. 64, 19-34.
- Erdoğan E, Özkan B, Mutlu F, Karaca S, Şahin İ, (2017). *Molecular characterization of echinococcus granulosus isolates obtained from different hosts*. Mikrobiyoloji Bülteni. 51, 79-86.
- Falls DL, (2003). *Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies*. Exp Cell Res. 284, 14-30.
- Gezercan Y, Ökten AI, Çavuş G, Açık V, Bilgin E, (2017). *Spinal hydatid cyst disease*. World Neurosurg. 108, 407-417.
- Jafari R, Sanei B, Baradaran A, Spotin A, Bagherpour B, Darani HY, (2017). *Genetic characterization of echinococcus granulosus strains isolated from humans based on nad1 and cox1 gene analysis in Isfahan central Iran*. J Helminthol. 92, 696-702.
- Karamian M, Haghghi F, Hemmati M, Taylor WR, Salehabadi A, Ghatee MA, (2017). *Heterogeneity of echinococcus canadensis genotype 6 - the main causative agent of cystic echinococcosis in Birjand, Eastern Iran*. Vet Parasitol. 245, 78-85.
- Kaypmaz A, (2002). *Hidatik kist: epidemiyoloji, bulaşma ve korunma yolları*. Göksoy E, Şentürk H. eds. Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları. Sempozyum Dizisi No: 28 İstanbul, p.285-299.
- Kul O, Yıldız K, (2010). *Multivesicular cysts in cattle: characterisation of unusual hydatid cyst morphology caused by echinococcus granulosus*. Vet Parasitol. 170, 162-166.
- Kunisch E, Fuhrmann R, Roth A, Winter R, Lungershausen W, Kinne RW, (2004). *Macrophage specificity of three anti-cd68 monoclonal antibodies (kp1, ebm11, and pgm1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry*. Ann Rheum Dis. 63, 774-784.
- Larrieu E, Cantoni G, Alvarez R, Cavagion L, Labanchi JL, Bigatti R, Araya D, Herrero E, Alvarez E, Mancini S, Cabrera P, (2001). *Ovine echinococcus granulosus transmission dynamics in the province of rio negro, argentina, 1980-1999*. Vet Parasitol. 98, 263-272.
- Luna LG, (1968). *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. McGraw-Hill Book Co., New York, USA, p.70.
- Merdivenci A, Aydınlioğlu K, (1982). *Hidatidoz (Hidatik Kist Hastalığı)*. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, İstanbul, Turkey, p.10.
- Patel NV, Acarregui MJ, Snyder JM, Klein JM, Sliwkowski MX, Kern JA, (2000). *Neuregulin-1 and human epidermal growth factor receptors 2 and 3 play a role in human lung development in vitro*. Am J Respir Cell Mol Biol. 22, 432-440.
- Roberts LS, Janovy J, (2008). *Foundations of Parasitology*, 8th edition. The McGraw-Hill Companies, New York, USA, p.658.

22. Sağlam YS, Terim KA, Balkaya İ, (2011). Bir ceylanda (gazelle gazelle) hidatid kist olgusu. Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg. 6, 239-243.
23. Sakamoto T, Cabrera PA, (2003). *Immunohistochemical observations on cellular response in unilocular hydatid lesions and lymph nodes of cattle*. Acta Trop. 85, 271-279.
24. Siles-Lucas M, Sánchez-Ovejero C, González-Sánchez M, González E, Falcón-Pérez JM, Boufana B, Fratini F, Casulli A, Manzano-Román R, (2017). *Isolation and characterization of exosomes derived from fertile sheep hydatid cysts*. Vet Parasitol. 236, 22-33.
25. Singh BB, Sharma R, Sharma JK, Mahajan V, Gill JP, (2014). *Histopathological changes associated with e. granulosus echinococcosis in food producing animals in Punjab (India)*. J Parasit Dis. 40, 997-1000.
26. Soosaraei M, Alizadeh S, Fakhar M, Banimostafavi ES, (2016). *The mandibular angle hydatid cyst mimicking branchial cleft cyst: a case report*. Iran J Parasitol. 11, 591-594.
27. Stojkovic M, Müller J, Junghanss T, Weber TF, (2018). *Radiological diagnoses in the context of emigration: infectious diseases*. Rofo. 190, 121-133.
28. Tan W, Wang Y, Gold B, Chen J, Dean M, Harrison PJ, Weinberger DR, Law AJ, (2007). *Molecular cloning of a brain-specific, developmentally regulated neuregulin 1 (nrg1) isoform and identification of a functional promoter variant associated with schizophrenia*. J Biol Chem. 282, 24343-24351.
29. Thompson RC, Mcmanus DP, (2002). *Towards a taxonomic revision of the genus echinococcus*. Trends Parasitol. 18, 452-457.
30. Vatankhah A, (2016). *Immunopathology of hydatid infection in human liver*. PhD Thesis, Semmelweis University, Budapest.
31. Vismarra A, Mangia C, Passeri B, Brundu D, Masala G, Ledda S, Mariconti M, Brindani F, Kramer L, Bacci C, (2015). *Immuno-histochemical study of ovine cystic echinococcosis (echinococcus granulosus) shows predominant t cell infiltration in established cysts*. Vet Parasitol. 209, 285-288.
32. Wang H, Li J, Pu H, Hasan B, Ma J, Jones MK, Zheng K, Zhang X, Ma H, McManus DP, Lin R, Wen H, Zhang W, (2014). *Echinococcus granulosus infection reduces airway inflammation of mice likely through enhancing il-10 and down- regulation of il-5 and il-17A*. Parasit Vectors. 20, 522.
33. Yin S, Chen X, Zhang J, Xu F, Fang H, Hou J, Zhang X, Wu X, Chen X, (2017). *The effect of echinococcus granulosus on spleen cells and tgf-β expression in the peripheral blood of balb/c mice*. Parasite Immunol. 39, 1-11.

Aydın İlinde Tüketime Sunulan Çöp Şişlerin Mikrobiyolojik Kalitesinin İncelenmesi

Hilal Demirpençe, Devrim Beyaz, Sadık Savaşan

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Bes. Hij. ve Tek. AD, Aydın.

Geliş Tarihi / Received: 23.01.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 30.04.2019

Özet: Bu çalışmada, yaz ve kış dönemlerinde Aydın ilinde çeşitli restoranlardan toplanan 100 adet çöp şiş örneği mikrobiyolojik özellikleri bakımından incelenmiştir. Mikrobiyolojik analizler sonucunda TMACB sayıları değerlendirildiğinde kış mevsiminde 4.14-7.12 log kob/g arasında ve ortalama 5.53 log kob/g olarak bulunmuştur. Yaz mevsiminde ise, 4.50-7.81 log kob/g arasında ve ortalama 6.33 log kob/g olarak saptanmıştır. Çöp şişlerden elde edilen *Staphylococcus aureus* sayıları değerlendirildiğinde; kış ayında <2 ile 5.81 log kob/g arasında ve ortalama olarak 5.04 log kob/g, yaz ayında ise <2 ile 6.07 log kob/g arasında ve ortalama 4.80 log kob/g olarak bulunmuştur. Kış ayında 50 adet çöp şiş örneğinin 16 tanesinde (% 32), yaz ayında 50 adet çöp şiş örneğinin 30 tanesinde (% 60) *S. aureus* tespit edilmiştir. Çalışmadaki koliform bakteri sayıları incelendiğinde ise, belirlenen dilüsyon oranlarında yaz mevsiminde 2-6.23 log kob/g sayıları arasında ve ortalama olarak 4.83 log kob/g olarak, kış mevsiminde <2-5.21 log kob/g arasında ve ortalama 3.93 log kob/g olarak bulunmuştur. *E. coli* sayıları değerlendirildiğinde ise, yaz döneminde minimum <2, maksimum 4.51 log kob/g ortalama 3.65 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Maya küf sayıları değerlendirildiğinde yaz ayında 2.84-6.19 log kob/g aralığında ve ortalama 4.88 log kob/g, kış ayında ise <2-5.54 log kob/g aralığında ortalama olarak 4.47 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte yaz ayında 50 numunenin 6 tanesinde (% 12), kış ayında ise 50 numunenin 1 tanesinde (% 2) *Salmonella* spp. varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda çöp şiş örneklerinin üretimi esnasında, kırmızı etin kesiminden tüketime gelinceye kadar hijyenik koşullara yeterince uyulmaması sebebiyle mikrobiyolojik kriterlerin genel olarak yetersiz olduğu belirlenmiştir. Çöp şiş örneklerinde gıda enfeksiyonlarına sebep olan *S. aureus*, *Salmonella* spp. ve koliform grubu bakterilerin bulunması halk sağlığı açısından risk teşkil etmektedir.

Anahtar kelimeler: Çöp şiş, halk sağlığı, mikrobiyal kalite.

Examination of the Microbiological Quality of Çöp Şiş Available for Consumption in the Province of Aydın

Abstract: In this study, 100 samples of çöp şiş collected from a variety of restaurants in the summer and winter seasons were examined in terms of microbiological properties in the province of Aydın. When microbiological analysis results are evaluated considering the numbers TVC in the winter season between 4.14 to 7.12 log cfu/g and an average 5.53 log cfu/g, in the summer season, between 4.50-7.81 log cfu/g and an average 6.33 log cfu/g. When the numbers of *S. aureus* obtained from çöp şiş evaluated; in the winter season <2 to 5.81 log cfu/g and averaged 5.04 log cfu/g, while in the summer season <2 to 6.07 log cfu/g, and 4.80 per log cfu/g, respectively. In the winter 16 of 50 çöp şiş samples, (32 %), in the summer 30 of 50 çöp şiş samples (60 %) *S. aureus* have been identified. When the number of coliform bacteria examined in the study, in the summer season between 2-6.23 log cfu/g, number in the specified dilution rates and average 4.83 log cfu/g, in the winter season <2 between 5.21 log cfu/g, and an average of 3.93 log cfu/g, respectively. When the number of *E. coli* assessed, in the summer minimum of <2, max of 4.51 log cfu/g and 3.65 log cfu/g was determined. When the yeast and mold counts evaluated in the summer 2.84-6.19 log cfu/g and an average range of 4.88 log cfu/g, while in the winter <2-5.54 log cfu/g in the range of 4.47 average log cfu/g was determined. Our study *Salmonella* spp. in terms of presence in the summer season in 6 of 50 samples (12 %), while in the winter season of 1 out of 50 samples (2 %) *Salmonella* spp. presence was detected. The results of this study, during the production of çöp şiş samples, until the cut consumption of red meat because it was determined that enough non-observance of hygienic conditions microbiological criteria is generally inadequate. In the examples of çöp şiş that cause food infections of *S. aureus*, *Salmonella* spp. and coliform bacteria poses a risk to public health.

Key words: Çöp şiş, public health, microbial quality.

Giriş

Çöp şiş, dana etinin yumuşak kısımlarının şişlere dizilip pişirilmesiyle tüketilen, besin değeri oldukça

yüksek olan ve Ege Bölgesi'nde ve özellikle Aydın ilinde sıklıkla tüketilen yöresel bir yemek çeşididir ve tarihi 140 yıl öncesine dayanmaktadır.

İzmir-Aydın demiryolu yapımında görev alan mühendisler farklı yemek kültürleri nedeniyle geçmiş zamanlarda zorluklar yaşamışlardır. Beslenme konusunu günlerce düşünmüşler ve en riski en az olan yemeğin çubuklara taktıkları etleri ateşte pişirerek tüketmek olduğunu bulmuşlardır. İngiliz mühendislerin sürekli bu etleri yediğini gören Egeliler bu yemeği zamanla kendileri yaparak satmaya başlamışlardır. Yıllar önce Cumhuriyet Gazetesi'nin Pazar ekinde bir yazıda Ortaklar ilçesindeki gelir düzeyi düşük ailelerin çocuklarının boyunlarına astıkları mangallarla mühendislere çöp şiş sattıkları yayınlanmıştır. Bu tat 140 yıldır özellikle Aydın ili Ortaklar ilçesinin değişmeyen lezzeti olmuştur [23].

Kırmızı et yüksek protein içeriği, su aktivitesi ve pH seviyesi nedeniyle bakterilerin gelişmesi ve hayatta kalması için elverişli koşullar sağlamakta, gıda kaynaklı zehirlenmeler açısından potansiyel bir tehlike oluşturmaktadır [11]. Kesim prosesinin başında karkasların yüzeyi steril kabul edilmekle birlikte, prosesin devamında yüzeysel kontaminasyon kaçınılmaz bir hal almaktadır. Kesim sırasında, kesim sonrası taşıma, depolama, parçalama işlemleri ile hem karkas yüzeyi değişik türde bozulmaya neden olan hem de bağırsak orjinli patojen bakterilerle kontamine olmaktadır [10,16,19].

Gıda maddelerinin mikrobiyolojik kriterlerinin belirlenmesinde toplam mezofilik aerobik canlı bakteri (TMACB), koliform grubu bakteriler, *E. coli*, *S. aureus*, fekal *Streptococcus*, *Clostridium perfringens* ve maya küf sayıları ile *Salmonella* spp. varlığı dikkate alınmaktadır [13].

Bu çalışma, Aydın ili ve ilçelerinde çeşitli işletmelerde satışa sunulan çöp şişlerin yaz ve kış mevsimlerine göre mikrobiyolojik kalitesinin araştırılması ve halk sağlığı açısından değerlendirilmesi amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmada Aydın ilinde Ağustos ve Kasım aylarında restoranlardan temin edilen 100 adet çiğ çöp şiş numunesi, her bir numunedan 100 gram olacak şekilde steril poşetler içinde soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı laboratuvarına getirilerek Toplam Mezofilik Aerobik Canlı Bakteri (TMACB), *S. aureus*, koliform bak-

teri, *E. coli*, maya-küf sayıları ile *Salmonella* spp. varlığı yönüyle incelendi.

Toplanan çöp şiş örneklerinden aseptik şartlarda alınan 10'ar gram numune, içerisinde 90 ml steril fizyolojik peptonlu su (Labkim T73029, Fluka 70179) bulunan stomacher torbalarına konularak Stomacher (Bag mixer, Interscience, France) içerisinde 2 dakika boyunca homojenize edildi. Homojenize edilen çöp şiş örneklerinden TMACB, *E.coli*, koliform ve *S. aureus* sayıları için seri dilüsyonlar hazırlandı.

TMACB Sayısının Belirlenmesi

Elde edilen dilüsyonlardan Plate Count Agar'a (OXOID CM463) yüzeyde yayma plak yöntemi kullanılarak inokulasyonlar yapıldı ve petri kutuları 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda sonuçlar koloni oluşturan birim/gram (kob/g) olarak değerlendirildi [4,14].

S. aureus Sayısının Belirlenmesi

Çöp şiş örneklerinde *S. aureus* sayısını belirlemek için TSE 6582-1 ISO 6888-1 standardı kullanıldı. Hazırlanan dilüsyonlardan Egg yolk – Tellurite Emulsion (OXOID SR0054C) içeren Baird Parker Agar'a (OXOID CM275) yüzeyde yayma plak yöntemiyle ekim yapıldı. Ekim yapılan BPA içeren petri kutuları 37°C' de 24 – 48 saat inkübe edildikten sonra etrafı şeffaf zonla çevirili, gri ve siyah renkli koloniler *S. aureus* şüpheli koloniler olarak belirlendi. Şüpheli *S. aureus* kolonileri DNaz agara (OXOID CM0321) öze ile inkübe edildi ve 37°C' de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası petri yüzeyini kaplayacak biçimde 1N HCl eklendi ve DNA'nın HCl ile muamelesi sonrası presipitasyon varlığı incelendi. DNA'nın mikroorganizmalar tarafından kullanılmayan bölgeleri mat, DNA'ın parçaladığı bölgelerde şeffaf zonlar gözlemlendi. Yine şüpheli *S. aureus* kolonileri Mannitol Salt Agar'a (OXOID CM0085) öze yardımıyla geçildi. Besiyerinin fenol kırmızısı renginin sarıya dönmesi pozitif olarak değerlendirildi. Pozitif örneklerin doğrulaması Dryspot (OXOID DR0100M) ile yapıldı [17].

Koliform ve *E. coli* Sayısının Belirlenmesi

Koliform ve *E. coli* sayısının belirlenmesi için hazırlanan dilüsyonlardan Violet Red Bile Agar'a (OXOID CM0107) çift katlı dökme plak ekim yön-

temi kullanılarak ekim yapılmış ve 37°C’ de 48 saat inkübe edildikten sonra kırmızı renkli koloniler koliform bakteri değerlendirildi ve *E. coli* için tipik (kırmızı renkli etrafı pembe zonlu) olan koloniler seçilerek 44°C’ de 24 saat içerisinde asit (laktik asit) ve gaz (CO₂) oluşturma testi ve IMVIC testleri uygulandı [9,14].

Salmonella spp. İzolasyon ve İdentifikasyonu

Aseptik olarak alınan, soğuk zincir altında laboratuvara getirilen çöp şiş örneklerinde *Salmonella* spp. varlığının tespiti TSE ISO 6579 standardı kullanılarak yapıldı. Her bir örnekten steril stomacher torbalarına 25’ er gram çöp şiş konularak 225 ml tamponlanmış peptonlu su (OXOID CM509) içerisinde 2 dakika stomacherde homojenize edildikten sonra 37°C’ de 24 saat inkübe edildi. Ön zenginleştirme işleminden sonra her bir çöp şiş numunesinden 0.1 ml alınarak 10 ml Rappaport–Vassiliadis Enrichment Broth (OXOID CM0669) içeren tüplere inokule edilerek 42°C’ de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda her tüpten yuvarlak uçlu öze ile bir öze dolusu alınarak Deoxycholate Agar’ a inakulasyonlar yapıldı ve inakule edilen petri kutuları 37°C’ de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda oluşan pembe renkli ve siyah merkezli şüpheli koloniler biyokimyasal testler ve *Salmonella* Latex Test (OXOID FT 0203A) kiti kullanılarak değerlendirildi [17].

Maya ve Küf Sayısının Belirlenmesi

Maya ve küf sayılarının tespiti için steril % 10’ luk tartarik asit çözeltisi ile pH’sı 3,5’ e ayarlanmış Potato Dextrose Agar (OXOID 0139) kullanılarak yayma plak ekim yapıldı ve 21± °C’ de 5 gün petri-ler inkübe edildikten sonra sonuçlar değerlendirildi [18].

Bulgular

Bu araştırmada çöp şiş örnekleri TMACB, *S. aureus*, Koliform Bakteri, *E. coli*, ve maya küf sayıları ile *Salmonella* spp. varlığı yönünden mevsimsel olarak incelenmiş olup analiz sonuçları Tablo 1 ve Tablo 2 ‘de gösterilmiştir.

İncelenen örneklerde Tablo 1’de görüldüğü gibi TMACB sayısı, total koliform bakteriler *E. coli*, *S. aureus*, ve maya küf sayılarının yaz ayındaki orta-

lamaları sırasıyla 6.33, 4.83, 3.65, 4.80, 4.88 log₁₀ kob/g düzeyinde saptanmıştır. Kış ayında ise Tablo 2’de görüldüğü gibi TMACB sayısı, total koliform bakteriler, *E. coli*, *S. aureus*, ve maya küf sayılarının ortalamalarının sırasıyla 5.53, 3.93, <2, 5.04, 4.47 log₁₀ kob/g düzeyinde olduğu bulunmuştur. Yaz ayında incelenen 50 adet çöp şiş örneğinin 12 tanesi (% 24) *E.coli*, 30 tanesi (% 60) ise *S. aureus* açısından pozitif olarak bulunmuştur. Kış ayında incelenen 50 adet örneğinin 16 tanesinde (% 32) *S. aureus* pozitif bulunurken, örneklerin hiçbirisinde *E. coli* varlığına rastlanılmamıştır.

İncelenen toplam 100 adet çöp şiş örneğinin yaz ayında 6 tanesinde (% 12) *Salmonella* spp. varlığına rastlanırken, kış ayında örneklerin 1 tanesinde (% 2) *Salmonella* spp. saptanmıştır.

Tartışma ve Sonuç

Çöp şişlerden elde edilen TMACB sayıları kış mevsiminde 4.14-7.12 log kob/g arasında ve ortalama 5.53 log kob/g, yaz mevsiminde ise, 4.50-7.81 log kob/g arasında ve ortalama 6.33 log kob/g olarak bulunmuştur. David ve ark. [7] Avustralya’da yaptıkları bir çalışmada 360 adet kırmızı et numunesinde TMACB sayısını 5.79 log kob/g olarak tespit etmişlerdir. Cohen ve ark. [5] tarafından Kazablanka’da mezbahalarda, kasaplarda ve süpermarketlerde mevsimsel olarak 26’şar adet parça kırmızı et örneklerinden elde ettikleri çalışmada TMACB sayısı mezbahalarda kış mevsiminde ortalama 5.1 log kob/g, yaz mevsiminde 5.2 log kob/g, kasaplardan aldıkları parça kırmızı et örneklerinde kış mevsiminde ortalama 6.5 log kob/g, yaz mevsiminde 7.3 log kob/g, süpermarketlerden aldıkları et örneklerinde ise kış mevsiminde ortalama 7.1 log kob/g, yaz mevsiminde 7.3 log kob/g olarak belirlenmiştir. Nursoy ve Akgün [16] tarafından Ankarada’ ki askeri birliklerin ihtiyacı için alınan karkaslardaki TMACB sayısı 4.57-6.92 log kob/g arasında ve ortalama 5.71 log kob/g olarak, parçalamadan sonra ise TMACB sayısı 4.93-7.89 log kob/g arasında ve ortalama 6.20 log kob/g olarak bulunmuştur. Akan [1] et ve et ürünleri ile ilgili yaptığı bir çalışmada 16 adet parça et numunesinin TMACB sayısını 3.71-7.74 log kob/g arasında ve ortalama 5.76 log kob/g olarak belirlemiştir. Tuncer [22] tarafından yapılan Bitlis ili ve çevresinde askeri mutfaklarda kullanı-

lan sığır etleri ile ilgili çalışmada 100 adet örneğin TMACB sayısı ortalama olarak 4.15 olarak bulunmuştur. Thomas ve ark. [21] tarafından Etiyopya'da yapılan bir çalışmada belediye kesimhanesinde 55 adet kırmızı et örneğinin TMACB sayısı 1.27×10^5 - 1.05×10^7 kob/g arasında ve ortalama olarak 6.35 log kob/g, restoranlardan alınan 55 adet et örneğinin TMACB sayısı 1.08×10^5 - 2.00×10^7 kob/g arasında ve ortalama 6.45 log kob/g, 3 adet bölgesel marketten alınan 50'şer adet et örneğinin ortalama TMACB sayıları ise 6.8, 6.78, 6.77 log kob/g olarak belirlenmiştir.

Genel hijyen ve mikrobiyal yükün belirlenmesinde indikatör olarak kullanılan TMACB sayısının yüksek olması halinde diğer mikroorganizma gruplarının sayısı da yüksek olmaktadır. Gıdalarda bulunan insan ve hayvan kaynaklı birçok patojen mikroorganizma mezofilik yapıda olmakta ve aerobik ya da fakültatif anaerobik koşullarda üremektedirler. Ürünlerde aerobik mezofilik mikroorganizma sayısının yüksek olması, patojenlerin bulunma olasılığının yüksek olduğunu göstermektedir [14].

Çöp şişlerden elde edilen *S. aureus* sayıları değerlendirildiğinde; kış ayında <2 ile 5.81 log kob/g arasında ve ortalama olarak 5.04 log kob/g, yaz ayında ise <2 ile 6.07 log kob/g arasında ve ortalama 4.80 log kob/g olarak bulunmuştur. Bununla birlikte yaz ayında 30 adet numunede (% 60) *S. aureus* pozitif olarak, kış ayında ise 16 numunede (% 32) *S. aureus* pozitif olarak tespit edilmiştir.

David ve ark. [7] Avustralya'da yaptıkları çalışmada 360 adet kırmızı et numunesinde *S. aureus* sayısını 2.18 log kob/g olarak belirlemişlerdir. Çıtak ve ark. [6] yaptıkları bir çalışmada 20 adet kuşbaşı örneğinde *S. aureus* sayısını 5.63 log kob/g olarak bulmuşlardır. Özdemir [19] sığır karkaslarının mikrobiyel yükünün belirlenmesi çalışmasında *S. aureus* sayısını maksimum 4.38, minimum 3.14, ortalama 3.85 log kob/cm² olarak bulmuştur. Al-Jassas [2] tarafından yapılan bir çalışmada kasap ve marketlerden alınan kırmızı et örnekleri 4°C'de 5 gün depolanmış ve depolama sonunda mikrobiyel yük değerlendirilmiştir. Yaz mevsiminde süpermarketlerden temin edilen kırmızı et örneklerinde *S. aureus* sayısı 5. günün sonunda 4.2 log kob/g, kasaplardan temin edilen örneklerde ise 5.8 log kob/g olarak bulunmuştur. Kış mevsiminde ise, süpermarketlerden alınan kırmızı et örneklerinde *S. aureus* sayısı 3.3

log kob/g, kasaplardan alınan örneklerde 4.0 log kob/g olarak bulunmuştur. Çalışmada *S. aureus*'un düşük düzeyde saptanmasının, yüksek toplam mezofilik aerobik bakteri sayısından kaynaklanabileceği öngörülmektedir. Bunun sebebi *S. aureus*'un rekabetçi özelliği zayıf bir bakteri olması ve gıda da başlangıçtaki sayısı yüksek olmadığı durumlarda iyi gelişmemesidir [3].

Bu çalışmada kış mevsiminde *S. aureus* sayısının yaz mevsimine oranla daha az olmasının sebebi; mevsimsel sıcaklıklar arasındaki farklılıktandır. Ayrıca mikroorganizmaların üremesini etkileyen diğer faktörlerden olan pH, a_w, atmosfer şartları, diğer organizmaların varlığı da sonuçları etkilemiş olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmadaki koliform bakteri sayıları incelendiğinde ise, belirlenen dilüsyon oranlarında yaz mevsiminde 2-6.23 log kob/g sayıları arasında ve ortalama olarak 4.83 log kob/g olarak, kış mevsiminde <2- 5.21 log kob/g arasında ve ortalama 3.93 log kob/g olarak bulunmuştur. Cohen ve ark. [5] tarafından Kazablanka'da yapılan bir araştırmada kesimhanelerden, kasaplardan ve süpermarketlerden 26'şar adet et numuneleri yaz ve kış mevsimlerinde temin edilmiştir. Kesimhanelerden alınan örneklerde toplam koliform sayısı yaz ve kış mevsimlerinde 1.6 log kob/g olarak, kasaplardan alınan örneklerde yaz mevsiminde 3.7 log kob/g, kış mevsiminde 2.8 log kob/g olarak, süpermarketlerden alınan örneklerde ise, yaz mevsiminde 3.2, kış mevsiminde 1.4 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Nursoy ve Akgün [16] tarafından sığır etlerinin mikrobiyolojik kriterleri üzerine yapılan bir çalışmada ise 30 adet karkas örneğinde toplam koliform bakteri sayısı 3.07- 5.20 log kob/g değerleri arasında ve ortalama olarak 4.07 log kob/g bulunmuş ve parçalama sonrası incelenen 30 adet parça et örneğinde toplam koliform sayısı ise, 3.20-6.07 log kob/g aralığında ve ortalama 4.81 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Thomas ve ark. [21] tarafında Etiyopya'da yapılan bir araştırmada 260 adet et örneği incelenmiştir. Kesimhanelerden temin edilen 55 adet et örneğinde toplam koliform sayısı 1.26×10^3 - 2.10×10^5 kob/g ve ortalama 4.52 log kob/g olarak bulunmuştur. Restoran ve otellerden temin edilen 55 adet et örneğinde ise toplam koliform sayısı 1.01×10^3 - 1.18×10^5 kob/g, ortalama 4.57 log kob/g olarak bulunmuştur. 3 adet yerel marketten temin edilen 50'şer adet et örneğinde ise

toplam koliform sayıları, ortalama 4.76 log kob/g, 4.48 log kob/g, 4.72 log kob/g olarak bulunmuştur. Toplamda 260 adet et örneğinin toplam koliform bakteri sayısı sonucu ortalama 4.68 log kob/g olarak bulunmuştur. Al-Jasass [2] tarafından yapılan bir araştırmada kırmızı etin yaz ve kış mevsiminde 4°C'de 5 gün boyunca depolanması sonucunda mikrobiyal değerleri incelenmiştir. İncelenen örneklerde yaz mevsiminde 5. günün sonunda toplam koliform sayısı kasaplardan temin edilenlerde 4.8 log kob/g, süpermarketlerden temin edilenlerde ise 3.8 log kob/g olarak bulunurken, kış mevsiminde ise, kasaplardan temin edilen örneklerde toplam koliform sayısı 4.5 log kob/g, süpermarketten temin edilenlerde ise 3.7 log kob/g olarak bulunmuştur.

Gıdalarda indikatör mikroorganizmalardan olan toplam koliform varlığı ve bu indikatörün belli bir sınırın üstünde bulunması, ürünlerin yeterli olmayan hijyen ve sanitasyon koşullarında işlendiğini, insan, hayvan, toprak, su ve dışkı kaynaklı bir bulaşma ile kontamine olabilecek koşullarda üretilip tüketime sunulduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir [6]. Özellikle fekal kontaminasyonun bir göstergesi olarak kabul edilen koliform bakterilerin karkas ve parça etlerde bu derece yüksek oranlarda bulunuyor olmasının, kesim, taşıma ve parçalama işlemleri esnasında hijyen kurallarına yeterince uyulmamasından ve personelin eğitilmemiş olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir [16]. Yapılan bu çalışmada *E. coli* sayıları değerlendirildiğinde ise, yaz ayında 50 adet çöp şiş örneğinin 12 tanesinde (% 24) *E. coli* 'ye rastlanılmış, kış mevsiminde ise belirlenen dilüsyon oranlarında *E. coli* 'ye rastlanılmamıştır. Yaz ayında rastlanılan *E. coli* sayıları minimum <2, maksimum 4.51 log kob/g, ortalama 3.65 log kob/g olarak tespit edilmiştir. David ve ark. [7]'nin Avustralya'da yaptıkları çalışmada 360 adet et örneği incelenmiş ve *E. coli* sayısı 1.49 log kob/g olarak bulunmuştur. Cohen ve ark. [5]'nin Kazablanka'da yapılan bir çalışmada kesimhaneden alınan 26 adet örnekte yaz mevsiminde *E. coli* sayısı 1.0 log kob/g, kış mevsiminde ise 1.2 log kob/g olarak belirlemişlerdir. Kasaplardan aldıkları 26 adet et örneğinde ise, yaz mevsiminde *E. coli* sayısı 3.2 log kob/g, kış mevsiminde 2.4 log kob/g olarak, süpermarketten alınan 26 adet örnekte ise, yaz mevsiminde 2.5 log kob/g, kış mevsiminde 1.0 log kob/g olarak belirlenmiştir. Nursoy ve

Akgün [16] Ankara'da sığır etleri üzerine yapılan bir çalışmada, 30 adet karkasın 18 tanesinde (% 60) *E. coli*'ye rastlanmış olup, *E. coli* sayıları 7.2×10^2 - 9.6×10^4 kob/g arasında bulunmuştur. Parçalamadan sonraki 30 adet kırmızı et örneğinin 10 tanesinde (%33.3) *E. coli* 'ye rastlanmakla birlikte *E. coli* sayıları 3.2×10^2 - 7.2×10^5 kob/g olarak belirlenmiştir.

Kasaplık hayvanların kesimi esnasında karkas ve organların ikincil kontaminasyonuna neden olan kaynaklar bulunmaktadır. Bunların en önemlisi fekal kontaminasyon olup, özellikle hayvanların bağırsakları kesim esnasında fekal kontaminasyona önemli bir kaynak oluşturmaktadır [20]. İnsan ve hayvanların bağırsaklarında yaşayan *E. coli*, indikatör mikroorganizma olarak kabul edilmekte ve gıdalarda bulunması halinde fekal bir kontaminasyon olduğunun göstergesi olmaktadır. Bu bakterilerin doğal ortamı sıcakkanlı hayvanların bağırsakları olduğundan dolayı her türlü et ve et ürünleri bakterinin bulaşmasında önemli bir etken olmaktadır. Kesimhanede hijyeninin etkin olmaması ile kesim esnasında ete bulaşan bakteriler yeterli ısı işlem ile muamele görmezlerse gıdalarda etkinliklerini sürdürerek tüketiciye bulaşmaktadırlar. Bu nedenle gıdanın üretiminden satışına kadar bütün aşamalarında hijyen kurallarına uyulması halk sağlığı açısından oldukça önem taşımaktadır [8].

Çöp şiş örneklerindeki maya küf sayıları değerlendirildiğinde yaz ayında 2.84-6.19 log kob/g aralığında ve ortalama 4.88 log kob/g, kış ayında ise <2-5.54 log kob/g aralığında ortalama olarak 4.47 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Nursoy ve Akgün [16] Ankarada'ki askeri birliklerin ihtiyacı için alınan sığır etlerinin mikrobiyolojik kalitesi üzerine yaptıkları bir çalışmada 30 adet karkas örneğinde maya ve küf sayısı 2.0×10^2 - 3.6×10^4 kob/g aralığında ve yine parçalamadan sonraki 30 adet et örneğinde maya ve küf sayısını 2.0×10^2 - 9.6×10^4 kob/g olarak tespit etmişlerdir. Mohamed [15] Sudan'da yaptığı taze et ve et ürünleri ile ilgili çalışmasında 10 adet parça et numunelerinde toplam maya küf sayısını 2.66×10^3 kob/g (3.42 log kob/g) olarak bulmuştur.

Çöp şiş numuneleri *Salmonella* spp. varlığı açısından değerlendirildiğinde yaz ayında 50 numunenin 6 tanesinde (%12), kış ayında ise 50 numunenin 1 tanesinde (%2) *Salmonella* spp. varlığı tespit edilmiştir. Tuncer [22] Bitlis ili ve çevresindeki askeri mutfaklarda kullanılan sığır gövde et-

lerinde patojen varlığı çalışmasında incelediği 100 adet karkas numunesinde *Salmonella* spp. varlığına rastlamamıştır. Yine sığır karkaslarının mikrobiyal kontaminasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada incelenen 60 adet karkas numunesinin hiçbirisinde *Salmonella* spp. izole edilememiştir [19]. Iyer ve ark. [12] tarafından Suudi Arabistan'da yapılan bir çalışmada hipermarketten temin ettikleri 20 adet et örneğinde 1 tane (% 5), kasaplardan temin ettikleri 20 adet et örneğinde ise 9 tanesinde (% 45) *Salmonella* spp. varlığına rastladıklarını bildirmişlerdir. David ve ark. [7]'nin Avustralya'da yaptıkları çalışmada 360 adet kırmızı et örneğinin 4 tanesinde (% 1.1) *Salmonella* spp. varlığına rastlanmıştır.

Çöp şişin yapımında kullanılan kırmızı etin, hayvanın kesimi, derisinin yüzülmesi, iç organların çıkartılması, parçalanması, soğutulması, muhafaza edilmesi ile şekillenen kontaminasyon riski çöp şişin mikrobiyal yükünü etkilemektedir. Sağlıklı kasaplık hayvanların kesim öncesi durumları da dikkate alındığında etin mikroflorası ve kontaminasyon durumu özellikle kesimden sonraki aşamalarda önem taşımaktadır. Özellikle mezbahalardaki ve gıda işletmelerindeki personel, kullanılan alet ve ekipmanlar, karkasın taşınması, depolanması, soğuk zincirin korunmaması mikrobiyel bulaşmada önemli potansiyel kaynak oluşturmaktadır. Karkasın parçalandıktan sonra çöp şiş için etlerin küçültülerek yüzey alanlarının genişletilmesi de mikrobiyel açıdan etin yükünü arttıran bir unsur olmaktadır.

Aydın ilinde satışa sunulan çöp şişlerin mikrobiyolojik kalitesinin istenilen düzeyde olmaması, halk sağlığı açısından potansiyel bir risk teşkil etmektedir. Buna ek olarak çöp şişlerin yeterli ısı işlem görmeden tüketilmesi, çapraz kontaminasyon olması halinde sağlık açısından risk oluşturabilmektedir. Sağlıklı çöp şiş üretimi sağlayabilmek amacıyla öncelikle kesimhanede sağlıklı ve veteriner hekim kontrolünden geçmiş hayvan kullanılması, kesimin ve üretimin her aşamasında personelin gerekli hijyen kurallarına uyması açısından bilinçlendirilmesi, kesim ve parçalama işlemlerinin sonunda muhafaza koşullarına dikkat edilmesi, özellikle yaz aylarının oldukça sıcak geçtiği Aydın ilinde kırmızı etin çöp şiş restoranlarına taşınması aşamasında gereken soğuk zincirin korunması ve pişirme işlemine

kadar gereken soğuk muhafazanın sağlanması, çöp şişlerin hazırlanması aşamasında özellikle personelin elinden kaynaklanan bulaşmaları önlemek amacıyla personele gerekli eğitimin verilmesi, yine çöp şişlerin hazırlanması aşamasında çapraz kontaminasyonun önlenmesi amacıyla pişmiş ve çiğ etlerin temasının önlenmesi ve bunlarla ilgili tedbirlerin alınması gerektiğinin sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

1. Akan İM, (2009). *Et ve Bazı Et Ürünleri ile Soğuk Hava Depolarında Pseudomonas Türlerinin İzolasyonu ve İdentifikasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Konya 2009, 56.
2. Al-Jasass FM, (2013). *Assessment of the Microbial Growth and Chemical Changes in Beef and Lamb Meat Collected From Supermarket and Shop During Summer and Winter Season*. Res J Recent Sci. 2(4), 20-27.
3. Aydemir Atasever M, Atasever M, (2015). *Kıymalarda bazı patojenlerin izolasyon ve identifikasyonu*. İÜ Vet Fak Derg. 41(1), 60-68.
4. Bostan K, Yılmaz F, Muratoğlu K, Aydın A, (2011). *Pişmiş döner kebaplarda mikrobiyolojik kalite ve mikrobiyel gelişim üzerine bir araştırma*. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 17 (5), 781-786.
5. Cohen N, Ennaji H, Hassa M, Karib H, (2006). *The bacterial quality of red meat and offal in Casablanca (Morocco)*. Mol Nutr Food Res J. 50, 557-562.
6. Çıtak S, Gündoğan N, Kala E, (2009). *Ankara ilindeki dondurulmuş et ve sebzelere koliform ve enterokokların fekal indikatör bakterisi olarak değerlendirilmesi*. Türk Hij Den Biyol Derg. 66(4), 145-151.
7. David P, David J, Stephen M, Ian J, John S, (2008). *A national survey of the microbiological quality of retail raw meats in Australia*. J Food Protect. 6, 1232-1236.
8. Ertaş N, Yıldırım Y, Karadal F, Al S, (2013). *Hayvansal gıdalarda Escherichia coli O157 H7'nin önemi*. Erciyes Üniv Vet Fak Derg. 10(1), 45-52.
9. Halkman K, (2005). *Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*. Başak Matbaacılık, Ankara. 358.
10. Hauge SJ, Wahlgren M, Rotterud OJ, Nesbakken T, (2011). *Hot water surface pasteurisation of lamb carcasses: microbial effects and cost-benefit considerations*. Int J Food Microbiol. 146 (2011), 69-75.
11. Hughes FA, Adu-Gyamfi A, Appiah V, (2015). *Microbiological and parasitological quality of local beef retailed in accra and radiation sensitivity of Salmonella spp.* Int J Curr Microbiol Appl Sci. 4(4), 86-96.
12. Iyer A, Kumosani T, Yaghmoor S, Barbour E, Azhar E, Harakeh S, (2013). *Escherichia coli and Salmonella spp. in meat in Jeddah, Saudi Arabia*. J Infect Devel Count. 7 (11), 812-818.

13. Kıvanç B, Kunduoğlu B, (1996). *Eskişehir 'de tüketilen köftelerin mikrobiyolojik incelenmesi ve halk sağlığı açısından önemi*. AÜ Fen Fak Derg. 1, 5-15.
14. Koçak P, (2013). *Aydın İlindeki Mandıralarda Üretilip Satışa Sunulan Beyaz, Tulum, Kaşar ve Lor Peynirlerinin Mikrobiyolojik Kalitesinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Aydın, 77.
15. Mohamed EAA, (2007). *The Microbiological Load of Fresh and Processed Meat*. Univ Vet Med. 163.
16. Nursoy G, Akgün S, (1997). *Ankara 'daki askeri birliklerin ihtiyacı için alınan sığır etlerinin mikrobiyolojik kaliteleri üzerinde araştırmalar*. Gıda Derg. 22(3), 241-245.
17. Oxoid, (2006). *The Oxoid Manual 9th*, Oxoid Limited, England. 624.
18. Öksüztepe G, Güran HŞ, İncili GK, Gül SB, (2011). *Elazığ 'da tüketime sunulan fermente sucukların mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi*. Fırat Üniv Sağl Bil Vet Derg. 25(3), 107-114.
19. Özdemir H, (2007). *Sığır Karkaslarında Mikrobiyel Yüzey Kontaminasyonunun Belirlenmesi*. Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu. 20070810008HPd, Ankara, s11.
20. Özmen S, (2002). *Çanakkale İlindeki Mezbahaların Kritik Kontrol Noktalarından Alınan Numunelerde Koliiform, Escherichia coli ve Escherichia coli O157:H7 Varlığı Üzerine Araştırmalar*. Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale. 2002, 76.
21. Thomas N, Pal M, Aylate A, (2015). *Bacteriological quality of raw meat collected from municipality slaughter house and local marketa in and around Wolaita Soddo Town, Southern Ethiopia*. Vet Health Sci Res. 3(8), 75-81.
22. Tuncer BH, (2008). *Bitlis ili ve çevresindeki askeri mutfaklarda kullanılan sığır gövde etlerinde bazı patojenlerin varlığı*. Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Van 2008, 72.
23. Web_1,(2016). <http://ziyafetgrup.com/index.php?icerik=213&goster=214>, 12.09.2016.

Erken Olgunlaşma Dönemindeki Geleneksel Peynir Mikrobiyomunun Metagenomik Analizi

Sadık Savaşan, Devrim Beyaz

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hij. ve Tek. AD, Aydın

Geliş Tarihi / Received: 23.01.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 30.04.2019

Özet: Bu çalışmada, dağ köylerinde çiğ koyun sütünden üretilen geleneksel peynirlerin erken olgunlaşma döneminde alınan örneklerinin yeni nesil sekanslama ve metagenomik analiz ile mikrobiyotaları saptanmıştır. *Firmicutes* ortalama %91,5 ile en yoğun filum olarak bulunurken, *Actinobacteria* en seyrek filum olarak (%0,01) bulundu. Peynir örneklerinin metagenomik analizi sonucunda 25 cins belirlenirken bunlardan 23'ü tüm örneklerde ortak olarak bulundu. Cins düzeyinde en yüksek çeşitlilik 13 cins ile *Enterobacteriaceae* familyası içinde görüldü. Tüm örneklerde en baskın tür *Lactococcus lactis* (ort.%84) olarak belirlendi. Tüm türler referans genlere %99'un üzerinde homoloji gösterdi.

Anahtar kelimeler: Peynir, mikrobiyom, mikrobiyota, metagenomik analiz, *Lactococcus lactis*

Metagenomic Analysis of the Early Ripened Continental Cheese Microbiome

Abstract: In this study, microbiota of early ripened continental cheeses from raw sheep milk collected from mountain villages was determined by next-generation sequencing and metagenomic analysis. *Firmicutes* was found as the dominant phylum by the average of 91,5%, when *Actinobacteria* was found as the minor phylum (0,01%). By the metagenomic analysis of cheese samples 25 genera were determined, 23 of these genera were found in all of the cheese samples. In the genus averages, the highest diversity was viewed in *Enterobacteriaceae* family as 13 genus. *Lactococcus lactis* was determined as dominant (avr.84%) species in all samples. The all species showed more than 99% homology to the reference genes.

Key words: Cheese, microbiome, microbiota, metagenomic analysis, *Lactococcus lactis*.

Giriş

Peynir, hammaddenin uygun bir pıhtılaştırıcı kullanılarak pıhtılaştırılması ve pıhtıdan peyniraltı suyunun ayrılmasıyla ya da sütün permenantının ayrılmasından sonra pıhtılaştırılmasıyla elde edilen, farklı sertliklerde ve yağ içeriklerinde, salamura ile ya da kuru tuzlama ile tuzlanarak ya da tuzlanmadan, starter kültür kullanarak ya da kullanmadan, telemesi haşlanarak ya da haşlanmadan, çeşnili ya da çeşnisiz olarak, tekniğine uygun olarak üretilen, olgunlaştırılmadan ya da olgunlaştırıldıktan sonra tüketilen, çeşidine özgü karakteristik özellikler gösteren süt ürünüdür [7]. İlk peynirin Orta Doğu insanları ve Orta Asya göçebe Türkleri tarafından yapıldığı düşünülmektedir [2]. Peynirin günlük beslenmemizdeki önemi; kolay sindirilebilme özelliğinin yanı sıra, yapısında üretiminde kullanılan sütteki yağı, çözünmeyen tuzları, koloidal maddelerin tümüne yakın miktarını bulundurması ve süt serumundaki çözünen tuzlar, vitaminler, serum proteinleri ve diğer besin unsurlarının da bir ölçüde yapısına girmesinden kaynaklanır [17].

Geleneksel peynirlerin yapımındaki alışagelmış, geleneksel yöntemlerin peynirlerin duysal özellikleri üzerindeki etkisinde mikrobiyotalarının çeşitliliği ve mikrobiyal aktiviteleri önemli yere sahiptir. Geleneksel peynirlerdeki çeşitlilik, herbir peynir tipine göre süt kaynağından olgunlaşmaya her aşamadaki farklılıklar, geniş bir mikrobiyotaya ve çevresel etkilere bağlı olarak şekillenen mikroorganizma etkileri sonucu oluşmaktadır [9].

Peynir mikrobiyotasının peynirin organoleptik, fiziko-kimyasal özelliklerinin oluşumunda önemli kilit rolü vardır. Peynirlerin sınıflandırılmasında peynirin sahip olduğu mikrobiyal çeşitlilik veya aktivite dikkate alınmamakta, tekstürü, olgunlaşma süresi ve benzeri özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Peynir, metabolik olarak aktif bakterileri, maya ve küfleri gibi çeşitlilikleri yapısında barındıran mikrobiyolojik olarak aktif bir gıdadır. Moleküler teknikler gıda örneklerindeki mikroorganizmaların genetik yapısının analizinde kullanılmaktayken, günümüzde through culture-independent metotlar peynir ve diğer gıdaların kompleks

ekosistemlerinin analiz edilerek anlaşılabilmesini kolaylaştırmıştır [10].

Kültürden bağımsız teknikler, gıda mikrobiyolojisinde önemli yere sahip gıda sistemlerinin mikrobiyotalarının ve mikrobiyal çeşitliliklerinin detaylı araştırılmasını etkin hale getiren yöntemlerdir. Bunlara DNA bazlı tekniklerden, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE), single stranded conformation poly-morphisms (SSCP), polymerase chain reaction (PCR) örnek olarak sayılabilirler. Tüm bu teknikler süt ve süt ürünlerinin mikrobiyolojisinin anlaşılmasında önemlidir, ancak mikrobiyal ekoloji alanı da sürekli gelişmektedir. Son yıllarda kültürden bağımsız yöntemlerin yerini next-generation sekans sistemlerinin aldığı görülmektedir. Bu sistemler, pekçok çevresel mikrobiyotanın başarılı şekilde profillerinin saptanmasını sağlamaktadır [11]. High throughput DNA sekans (HTS) tekniği ile oldukça düşük düzeylerdeki bakteriler saptanabilir. HTS yöntemi ile patojenik ve bozulmaya sebep olan bakterilerde saptanabilir. Bu yöntem kullanılarak peynir yapım aşamalarının her safhasında oluşan ve değişiklikler gösteren mikrobiyota iyi bir şekilde saptanabilir [6]. Son yıllarda geliştirilen yeni nesil DNA dizileme yöntemleri yüksek doğrulukta oldukça hızlı dizileme yapabilen, yoğun ve özgün bilgi sağlayan yöntemlerdir [4]. Yeni nesil DNA dizileme teknolojilerinin ortak özelliği aynı anda milyonlarca kısa dizilemenin yapılabilmesi ve oldukça hızlı şekilde okunabilmesidir. Ayrıca elektroforeze gerek kalmadan gerçek zamanlı okuma yapılabilmesi, daha doğru sonuçlar alınabilmesi, daha az hata eğilimli ve daha ekonomik olması bu teknolojilerin eski sisteme göre avantajları arasında yer almaktadır [3,4,14]. Bu çalışmada, dağ köylerinde çığ koyun sütünden üretilen geleneksel peynirlerin erken olgunlaşma döneminde alınan örneklerinin yeni nesil sekanslama ve metagenomik analiz ile mikrobiyotaları saptanmıştır.

Materyal ve Metod

Peynir örneklerinin hazırlanması

Aydın ilinin yüksek rakımlı dağ köylerinde koyun sütünden çığ olarak üretilen geleneksel peynir örnekleri toplandı. Toplanan 5 adet peynir erken olgunlaşma döneminde incelendi. Peynir kalıbının iç bölgesinden alınan 1 cm² örnek 25 ml steril DNA-free distile suya eklendi ve stomacher ile homojenize

edildi. Bu işlemden sonra bulanık süspansiyon formundaki örnekler TissueLyser (Qiagen) ile muamele edilerek solusyon haline getirildi. 100 mikrolitre örnek moleküler işlemler için ayrıldı. Peynir örneklerinin sekans hazırlığı için, DNA ekstraksiyonu QIAmp DNA Stool Kit (Qiagen) ile üretici firmanın talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi. Mikrobiyal DNA konsantrasyonu Qubit (Thermo) ile ölçüldü ve minimum 1 -3 ng arasında olacak şekilde ayarlandı.

Yeni Nesil Sekanslama

16S Metagenomics Kit (Thermo Scientific, USA) ile 2 ayrı PCR mix (1.havuz: 2., 4., 8. varyant bölge; 2.havuz: 3., 6., 7., 9. varyant bölge) hazırlandı. Pozitif kontrol olarak 1:20 dilüe edilmiş (1.5 ng/μl) E. coli DNA kontrol stoğu kullanıldı. PCR analizi sonucu elde edilen ürünler, %2'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. Jel elektroforezine tabi tutulan PCR ürünleri Agencourt AMPure XP beads (Thermo Scientific, USA) ile DynaMag-2 magneti yardımıyla kitin önerdiği koşullar doğrultusunda pürifiye edildi. Elde edilen DNA'nın kantitasyonu, Ion Universal Library Quantitation Kit (Thermo Scientific, USA) ile üretici firmanın önerdiği koşullara uygun olarak Real-Time PCR analiziyle gerçekleştirildi. DNA konsantrasyonu, dilüsyon/konsantrasyon ayarları yapılarak gerçekleştirildi.

Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit ve Ion PGM Hi-Q View OT2 Solutions (Thermo Scientific, USA) ile firmanın önerdiği koşullar altında emülsiyon PCR'ı gerçekleştirildi. Bu amaçla Ion One Touch 1 (Thermo Scientific, USA) cihazı kullanıldı.

Kütüphane oluşturulması (uçlara tamir enzimi uygulama) için Ion Plus Fragment Library Kit (Thermo Scientific, USA) ile üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde kütüphane oluşturuldu. Barkod ligasyonu, adaptör ligasyonu (bir ucu A adaptörü, diğer ucu P1 adaptörü) için Barcode Adapters 1-16 Kit (Thermo Scientific, USA) ile kitin önerdiği koşullar doğrultusunda DNA barkod kütüphanesi oluşturuldu.

Mikroçipe yükleme için, PGM analizi için hazırlanan örnekler Ion 318 veya Ion 316 Chip (Thermo Scientific, USA)'e aktarıldı. PGM'de koşturma için, örneklerin yüklendiği mikroçipe Ion torrent (Thermo Scientific, USA) cihazına yerleştirilerek sekans analizi gerçekleştirildi.

Metagenomik Analiz

İonReporter programı (Thermo Scientific, USA) tarafından yapılan bu analizde, okumaların kalite kontrolleri, eşik değerlerde elde edilen data istatistikleri, her bir kompleksin gen içeriğinde değişiklik olup olmadığı, gen bölgesinin konumu ve uzunluğu, gen bölgesi ve her bir gen bazındaki homoloji oranları incelendi. Yeni nesil sekans sisteminin çalışması ile ilişkili diğer biyoinformatik analiz sisteme yüklü programlar tarafından otomatik olarak yapıldı. Bu aşamadaki işlemler özetle, kütüphane oluşturulması ve cihaz çıktılarının dijital ortamda birleştirilerek dizinin oluşturulmasını kapsadı. Son aşama ise, sekanslama sonucunda elde edilen bilgilerin ilk aşamada yapıldığı gibi analizini, ayrıca BLAST programı ile kendi içinde ve GenBankası verileri ile karşılaştırmasını kapsadı. Bu işlemler sonucunda örnekte mevcut tüm prokaryotik organizmaların filumdan türe kadar olan taksonomik düzeylerde orantısal yoğunluğu elde edildi. Ayrıca bu tüm geçerli okumalar OTU (operasyonel taksonomik ünite) olarak alındı. Örneklerdeki familya, cins ve tür düzeyinde alfa-çeşitlilik gösterilmesi için Chao, Shannon ve Simpson rarefaction algoritması kullanıldı. Aşağıda belirtilen okuma kalitesi eşikleri kullanıldı; minimal 10 okuma üstü, minimal 150 baz okuma.

Bulgular

İncelenen 5 peynir örneğinin yeni nesil DNA sekansı sonucunda örnek başına ortalama 480653 okuma yapılırken, bunlardan 419842 adeti kalite filtrelerini geçti. Kalite dışı okumalar çıkarıldıktan sonra 330851 adeti haritalandırılarak mevcut bakteri taksonlarından biri ile eşleştirildi. Okuma sayıları kullanılan değişken bölgeye göre farklılık gösterdi. Haritalanan okumalar içinden en yüksek sayıda okuma 188938 ile V3 bölgesinde yapıldı. En düşük

sayıda okuma ise 10844 ile V2 bölgesinde yapıldı. İncelenen peynir örneklerinin tümünde 3'er filum belirlendi. *Firmicutes* ortalama %91,5 ile en yoğun filum olarak bulunurken, *Actinobacteria* en seyrek filum olarak (%0,01) bulundu (Tablo1). Sınıf düzeyinde *Gammaproteobacteria* (%8,4) saptanan tek *Proteobacteria* sınıfı oldu. Tüm peynir örneklerinde *Actinobacteria* filumu içinde 1, *Firmicutes* filumu içinde 5, *Proteobacteria* filumu içinde 3 familya belirlendi. En yüksek oranda bulunan familya %86,2 ile *Streptococcaceae* oldu. Bunu *Firmicutes* filumu içindeki familyalardan *Enterococcaceae* (%2,7) ve *Lactobacillaceae* (2,1) izledi. *Enterobacteriaceae* familyası ise %7,6 oranında bulundu. Genus düzeyinde sonuçlar Tablo2'de gösterilmiştir. Peynir örneklerinin metagenomik analizi sonucunda 25 adet cins belirlendi, bunlardan 23 adeti tüm örneklerde ortak olarak bulundu. Cins düzeyinde en yüksek çeşitlilik 13 cins ile *Enterobacteriaceae* familyası içinde görüldü. Diğer tüm familyalar en fazla 2 cins ile temsil edildi. Cins düzeyinde en yüksek ortalama relatif yoğunluk gösteren cins *Lactococcus* (%85,4) oldu. Peynir örneklerinin metagenomik analizi ile belirlenen türlerin ortalama relatif %oranları, pozitif bulunan örnek sayısı ve referans genumlara % homolojisi Tablo3'de gösterilmiştir. İncelenen örneklerde toplam 59 tür belirlenirken, bunlardan 20 adeti tüm örneklerde ortak olarak bulundu. Toplam 9 *Enterococcus* türü bulunurken, bunu 6 tür ile *Lactobacillus*, 5 tür ile *Buttiauxiella* ve 4 tür ile *Lactococcus* ve *Citrobacter* takip etti. *Lactobacillus lactis* tek başına %84 relatif yoğunluk ile en baskın tür olarak belirlendi. Bundan sonraki en yüksek diğer türler *Enterococcus italicus* (%1,8), *Citrobacter freundii* (%1,7), *Lactococcus raffinolactis* (%1,35), *Lactobacillus brevis* (%1,1) olarak saptandı. Tüm türler referans genlere %99'un üzerinde homoloji gösterdi.

Tablo1. Peynir örneklerinin metagenomik analizi ile belirlenen üst taksonlar ortalama relatif % oranları

Filum	% oranı	Sınıf	% oranı	Takım	% oranı	Familya	% oranı
Actinobacteria	0,01	Actinobacteria	0,01	Actinomycetales	0,01	Micrococcaceae	0,01
Firmicutes	91,58	Bacilli	91,58	Bacillales	0,24	Staphylococcaceae	0,24
				Lactobacillales	91,34	Enterococcaceae	2,77
						Lactobacillaceae	2,13
						Leuconostocaceae	0,24
						Streptococcaceae	86,2
Proteobacteria	8,42	Gammaproteobacteria	8,42	Enterobacteriales	7,69	Enterobacteriaceae	7,69
				Pasteurellales	0,66	Pasteurellaceae	0,66
				Pseudomonadales	0,07	Moraxellaceae	0,07

Tablo2. Peynir örneklerinin metagenomik analizi ile belirlenen tüm taksonomik üniteler.

Filum	Sınıf	Takım	Aile	Cins	% harita okuma	Türler
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococaceae	<i>Kocuria</i>	0,01	<i>salcida/varians</i>
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococaceae	<i>Macrococcus</i>	0,19	<i>caseolyticus/carouselicus</i>
				<i>Staphylococcus</i>	0,05	<i>aureus/simiae</i>
		Lactobacillales	Enterococaceae	<i>Enterococcus</i>	2,772	<i>italicus</i>
						<i>durans</i>
						<i>faecium</i>
						<i>hirae</i>
						<i>lactis</i>
						<i>mundtii</i>
						<i>raffinosis</i>
						<i>thailandicus</i>
						<i>villorum</i>
						<i>brevis</i>
			Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	2,12	<i>paraplantarum</i>
						<i>pentosus</i>
						<i>plantarum</i>
						<i>xiangfangensis</i>
						<i>pediococcus</i>
						<i>pentosaceus/argentiniticus</i>
			Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i>	0,24	<i>mesenteroides</i>
						<i>lactis</i>
						<i>pseudomesenteroides</i>
						<i>lactis</i>
			Streptococaceae	<i>Lactococcus</i>	85,42	<i>raffinolactis</i>
						<i>garvieae</i>
						<i>taiwanensis</i>
						<i>parauberis/uberis</i>
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Buttiauxella</i>	0,75	<i>agrestis</i>
						<i>ferragutiae</i>
						<i>izardii</i>
						<i>noackitiae</i>
						<i>warmboldiae</i>
						<i>murlinae</i>
						<i>gillenii</i>
						<i>freundii</i>
						<i>braakii</i>
						<i>asburiae</i>
						<i>cloacae</i>
						<i>hormaechei</i>
						<i>Escherichia</i>
						<i>vulneris</i>
						<i>albertii</i>
						<i>fergusonii</i>
						<i>Gibbsiella</i>
						<i>quercinecans</i>
						<i>Hafnia</i>
						<i>paralvei/alvei</i>
						<i>Klebsiella</i>
						<i>oxytoca</i>
						<i>Kluyvera</i>
						<i>intermedia/ascorbata</i>
						<i>Pantoea</i>
						<i>agglomerans</i>
						<i>Serratia</i>
						<i>marcescens</i>
						<i>Trabulsiella</i>
						<i>guamensis</i>
						<i>Yersinia</i>
						<i>regensburgei</i>
		Pasteurellales	Pasteurellaceae	<i>Pasteurella</i>	0,01	
				Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>
<i>Enhydrobacter</i>	0,01					<i>aerosaccus</i>

Tablo3. Peynir mikrobiyomunun metagenomik analizi ile belirlenen türlerin ortalama relatif % oranları. Tabloda türün bulunduğu toplam örnek sayısı, okunan sekansın referans genoma % homolojisi ve forward:reverse oranı ayrı sütunlarda gösterilmiştir.

Cins	Tür	Pozitif örnek sayısı	ort. Relatif %	% ID	F:R
<i>Kocuria</i>	<i>salcida</i>	3	0,005	>99	
	<i>varians</i>	2	0,005	>99	
<i>Macrococcus</i>	<i>caseolyticus</i>	5	0,1	99.17 - 100	37.6 : 62.4
	<i>carouselicus</i>	2	0,09	>99	
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	3	0,04	>99	
	<i>simiae</i>	2	0,01	>99	
<i>Enterococcus</i>	<i>italicus</i>	5	1,8	99.11 - 100	73.33 : 26.67
	<i>durans</i>	3	0,67	>99	
	<i>faecium</i>	2	0,05	>99	
	<i>lactis</i>	2	0,075	>99	
	<i>hirae</i>	2	0,04	>99	
	<i>villorum</i>	1	0,047	>99	
	<i>mundtii</i>	1	0,039	>99	
	<i>thailandicus</i>	1	0,03	>99	
	<i>raffinosis</i>	1	0,021	>99	
	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	5	1,1	100 - 100
<i>fabifermentans</i>		3	0,77	>99	
<i>pentosus</i>		2	0,1	>99	
<i>paraplantarum</i>		1	0,07	>99	
<i>xiangfangensis</i>		1	0,05	>99	
<i>plantarum</i>		1	0,03	>99	
<i>Pediococcus</i>	<i>pentosaceus</i>	3	0,005	>99	
	<i>argentiniensis</i>	2	0,005	>99	
<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	3	0,1	>99	
	<i>lactis</i>	2	0,08	>99	
	<i>pseudomesenteroides</i>	1	0,06	>99	
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	5	84	99.02 - 100	79.94 : 20.06
	<i>raffinolactis</i>	5	1,35	99.11 - 100	90.7 : 9.3
	<i>garvieae</i>	5	0,065	99.14 - 99.14	0 : 100
	<i>taiwanensis</i>	1	0,005	>99	
<i>Streptococcus</i>	<i>parauberis</i>	5	0,69	99.1 - 100	37.27 : 62.73
	<i>uberis</i>	2	0,09	>99	
<i>Buttiauxella</i>	<i>ferragutiae</i>	3	0,25	>99	
	<i>agrestis</i>	2	0,17	>99	
	<i>izardii</i>	2	0,15	>99	
	<i>warmboldiae</i>	1	0,1	>99	
	<i>noackitiae</i>	1	0,08	>99	
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	5	1,7	99.17 - 100	43.24 : 56.76
	<i>gillenii</i>	5	0,8	99.08 - 100	27.06 : 72.94
	<i>murlinae</i>	5	0,34	100 - 100	42.34 : 57.66
	<i>braakii</i>	1	0,19	>99	
<i>Enhydrobacter</i>	<i>aerosaccus</i>	5	0,01	100 - 100	100 : 100

Cins	Tür	Pozitif örnek sayısı	ort. Relatif %	% ID	F:R
<i>Enterobacter</i>	<i>asburiae</i>	3	0,2	>99	
	<i>cloacae</i>	2	0,1	>99	
	<i>hormaechei</i>	1	0,1	>99	
<i>Escherichia</i>	<i>vulneris</i>	5	0,9	99.44 - 100	48.18 : 51.82
	<i>albertii</i>	3	0,18	>99	
	<i>fergusonii</i>	2	0,15	>99	
<i>Gibbsiella</i>	<i>quercinecans</i>	2	0,31	>99	
<i>Hafnia</i>	<i>paralvei</i>	5	0,08	99.58 - 99.58	0 : 100
	<i>alvei</i>	2	0,02	>99	
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	5	0,15	100 - 100	100 : 0
<i>Kluyvera</i>	<i>intermedia</i>	5	0,25	99.58 - 99.58	0 : 100
	<i>ascorbata</i>	2	0,09	>99	
<i>Pantoea</i>	<i>agglomerans</i>	5	0,13	100 - 100	100 : 0
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	5	0,76	99.13 - 99.15	0 : 100
<i>Trabulsiella</i>	<i>guamensis</i>	5	0,09	100 - 100	0 : 100
<i>Yersinia</i>	sp.	3	0,35	>97	
<i>Yokenella</i>	<i>regensburgei</i>	5	0,65	99.17 - 99.17	0 : 100
<i>Pasteurella</i>	sp.	2	0,01	>97	
<i>Acinetobacter</i>	<i>johnsonii</i>	5	0,06	99.44 - 99.44	100 : 0
<i>Enhydrobacter</i>	<i>aerosaccus</i>	5	0,01	100 - 100	100 : 100

Tartışma ve Sonuç

Peynir mikrobiyolojik olarak aktif bir gıdadır ve mikrobiyotası organoleptik, fiziko-kimyasal ve benzeri kendine has özelliklerinin oluşumunda önemli role sahiptir. Kültürden bağımsız yeni nesil sekans gibi yöntemlerin, peynirin sahip olduğu mikrobiyotanın detaylı incelenmesinde ve oluşumundaki mikrobiyal aktivitelerin araştırılmasında etkili hale geldiği düşünülmektedir.

Oscypek, Polonya’da Tatra dağları bölgesine özgü, çiğ koyun sütünden, starter kültür kullanılmadan üretilen, haşlanmış-tütsülenmiş bir peynir çeşitidir. Oscypek peynirinin yapımı ve olgunlaşması aşamalarında oluşan mikrobiyotanın incelenmesi amaçlı yapılan çalışmada, hem kültürel hem de PCR-DGGE ve 16S rRNA gen amplikonlarının pyrosekans gibi kültürden bağımsız metodlar kullanılmıştır. Kültüre bağlı ve PCR-DGGE teknikleri ile peynirdeki predominant mikroorganizmalar saptanmış, sekans tekniği (454 pyrosekans) ile çok daha fazla düzeyde bakteri çeşitliliği saptanmıştır. *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus* gibi bakteri cinsleri her

üç yöntemle de saptanmışken, *Bifidobacteriaceae*, *Moraxellaceae* (çoğunlukla *Enhydrobacter*) gibi ailelere bağlı subdominant bakteriler ve düşük düzeylerdeki bakteriler pyrosekans ile saptanabilmiştir. Bir peynir bakteri sisteminde *bifidobacteria* sekansının varlığı ilk kez bildirilmiştir. Bakterilerin yanısıra, yüksek oranda maya çeşitliliği saptanmıştır. Oscypek peynirinin bakteriyel çeşitliliğinde önemli olan *Bifidobacteriaceae*, *Moraxellaceae* (çoğunlukla *Enhydrobacter*) %0,71 ve %0,45 gibi düşük oranlarda saptanmıştır. Bölgesel şartlar, peynirin yapım aşamaları gibi sebeplere bağlı olarak, barsak mikrobiyotasına, üretim alanına (su, personel v.b.) ait olduğu bilinen *Actinobacteria* ve *Proteobacteria* bakterilerinin bulunması şaşırtıcı değildir. Sonuç okumalarının %20’si gibi yüksek bir oranı sınıflandırılmamış taksonomi olarak belirtilmiştir [1]. Polonya’da çiğ koyun sütü ile yapılan peynirdeki (Oscypek) saptanan mikrobiyotada bulunan bakteriler bu çalışmada bulunan bakterilerle aynı olup bu çalışmada *bifidobacteria* bulunmamıştır.

Azores bölgesinin (Portekiz) çiğ inek sütünden üretilen yöresel peyniri Pico ‘nun bakteriyel çeşitliliğinin saptanması amacı ile yapılan

bu ilk çalışmada, Pico peynirinin mikrobiyotasının belirlenmesi amacıyla, 16S rDNA'nın V3-V4 bölgelerinin etiketlenmiş ampliconlarının pyrosekansı ve Operational Taxonomic Unit-based (OTU-based) analizleri yapılmıştır. Pyrosekans sonucunda, 4 filum (*Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*) ve 54 cins belirlenmiştir. Predominant cins olarak *Lactococcus* (%77) saptanmıştır. *Staphylococcus* %0,5 olarak belirlenmiştir. OTU analizleri ile *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Rothia*, *Pantoea* ve sınıflandırılmamış *Enterobacteriaceae* ailesine bağlı bakteriler saptanmıştır [13]. Bu çalışmada ise *Bacteroidetes* filumu saptanmamış, diğer 3 filum *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* belirlenmiştir, *Lactococcus* %85.42 oranında saptanmıştır.

Sicilya'da (İtalya) üretilen el yapımı Ragusano peynirinin mikrobiyal çeşitliliğini araştırmak amacıyla yapılan çalışmada, PCR, reverse transcriptase-PCR ve 16S rRNA genlerinin (rDNA) denature gradient gel elektroforezis (DGGE) yöntemleri kullanılmıştır. Klonlama ve sekans uygulamaları sonrası rDNA ampliconları, *Leuconostoc*, *Lactococcus lactis*, *Macroccoccus caseolyticus* türlerini kapsayan mezofilik laktik asit bakterilerinin (LAB) çığ sütte baskın olduğu, laktik fermentasyon sırasında ise *Streptococcus thermophilus*'un baskın olduğu saptanmıştır. Diğer termofilik laktik asit bakterileri (*Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*) peynirin olgunlaşması aşamasında oluşmaya başladıkları belirlenmiştir. Farklı çiftliklerde üretilen Ragusano peynirlerinin mikrobiyotasının, üretim şeklinin ve çevresel faktörlerin benzerliğine paralel olarak saptandığı bildirilmiştir [12]. Bu çalışmada ise farklı olarak *Streptococcus thermophilus* saptanmamış, *Streptococcus parauberis* ve *Streptococcus uberis* saptanmıştır. *Lactobacillus* genusu %2.12 oranında belirlenmiş, tür düzeyinde ise *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fabifermentans*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus xiangfangensis*, *Lactobacillus plantarum* saptanmıştır.

Kontinental tipte salamura peynir yapım aşamaları sırasında mikrobiyal değişimlerin saptanması amacıyla yapılan bu çalışmada 16S rRNA amplicon sekansı kullanılmıştır. Peynirin olgunlaşma

aşaması boyunca, uzun olgunlaşma gününe sahip peynirlerde, kısa süreli olgunlaşma gününe sahip peynirlere göre daha fazla mikrobiyal çeşitliliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Pastörize süttten üretilmiş kontinental tip peynirlerle ilişkilendirilmeyen *Thermus*, *Pseudoalteromonas*, *Bifidobacterium* genuslarının tespit edilmesi dikkat çekici bir sonuç olarak bildirilmiştir. Klasik kültür analiz yöntemleri ve PCR tekniği tüm mikrobiyal popülasyonun saptanmasında yetersiz kalmaktadır. High throughput next generation sequencing (NGS) yüksek düzeyde kompleks ekosistemlerde dominant ve sub-dominant mikrobiyal popülasyonların anlamlı analizlerine olanak sağlamaktadır. Analizler sonucunda α -çeşitliliğin peynirin olgunlaşma aşamasında azaldığı saptanmıştır. Filogenetik olarak 5 filuma (*Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Deniococcus-Thermus*, *Actinobacteria*) ait bakterilerin saptandığı bildirilmiştir. *Lactobacillus* ve *Streptococcus* popülasyonları hem kısa olgunlaştırma süresine sahip hem de uzun olgunlaştırma süresine ait peynir örneklerinde dominant düzeyde saptanmıştır. *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* sadece erken olgunlaştırma süresine sahip peynirlerde, *Corynebacterium* ve *Brevibacterium* yalnızca uzun olgunlaştırma süresine sahip peynir örneklerinde sub-dominant olarak saptanmışlardır [16]. Bu çalışmada 3 filum (*Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*) belirlenmiştir.

Gıda üretim alanlarındaki mikrobiyal kontaminasyon gıda kalitesi ve güvenliği açısından oldukça önemlidir. Bu çalışmada bir süt işletmesi üretim alanındaki mikrobiyota hem 16S rRNA hem de 26S rRNA bazlı high-throughput amplicon sekans (HTS) ile çalışılmıştır. Çevresel svapların mikrobiyotasının oldukça kompleks olduğu, 200'den fazla taksonomik birim içerdiği bildirilmiştir. Örneklerin %70'inin mikrobiyotasında laktik asit bakterileri özellikle *Streptococcus thermophilus* baskın olarak saptanmıştır. Örneklerin %50'sinin mikrobiyotasında da peynirlerde bozulmaya sebep olan *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* bakterileri belirlenmiştir. En yoğun olarak saptanan mayalar ise *Kluyveromyces marxianus*, *Yamadazyma triangularis*, *Trichosporon faecale*, *Debaryomyces hansenii* olarak bildirilmiştir. Beta-çeşitlilik analizlerinin, maya ve bakteri popülasyonlarına bağlı olarak çevresel ve peynir örnekleri arasındaki ay-

rımı net olarak gösterdiği bildirilmiştir [15]. Bu çalışmada *Acinetobacter* saptanmış, *Pseudomonas* ve *Psychrobacter* saptanmamıştır. *Moraxellaceae* ailesinden *Acinetobacter johnsonii* ve *Enhydrobacter aerosaccus* tüm peynir örneklerinde bulunmuştur.

Yerel süt mikrobiyotasının, teknolojik ve çevresel parametrelerin olgunlaştırılmış peynirin mikrobiyotası üzerine etkilerini, farklı ortamlarda üretilen Gouda peynirinin yapısında bulunan predominant mikrobiyal yapının çeşitliliğini araştırmak amaçlı bu çalışmada, analizlerde PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) tekniği kullanılmıştır. Pastörize süttten üretilen Gouda peynirlerindeki bakteriyel çeşitliliğin düşük düzeylerde olduğu bildirilmiştir. Çiğ süttten üretilen peynirlerdeki enterokok ve pediokok çeşitliliği, pastörize süttten üretilen peynirlerdekine göre bir miktar yüksek düzeyde saptanmıştır. Peynirdeki lezzet oluşumunda önemli yeri olan *Lactobacillus plantarum* yalnızca çiğ süttten üretilen peynirlerde saptanmıştır. Bir günlük olan ve çiğ süttten üretilen peynirlerde mastitis etkeni olan *Streptococcus dysgalactiae* saptanmıştır ve yine çiğ süttten üretilmiş peynirlerde Enterobacteriaceae genumunda yer alan *Gammaproteobacteria* yüksek düzeylerde bulunmuştur [5]. Bu çalışmada *Lactobacillus plantarum* 1 peynir örneğinde saptanmışken, *Lactobacillus brevis* tüm peynir örneklerinde saptanmış, *Gammaproteobacteria* %8,42 oranında saptanmıştır.

Camembert peyniri gibi kompleks bir ekosisteme sahip peynirin real-time PCR (qPCR) tekniği ile maya ve küf yönünden mikrobiyotasının araştırıldığı çalışma sonucunda peynir ekosisteminde, *Kluyveromyces lactis* az yoğunlukta iken, *Penicillium camemberti* ve *Geotrichum candidum*'un hızlıca dominant hale geldikleri saptanmıştır. Peynir ekosistemine katılan *Debaryomyces hanseii*'in ise *Kluyveromyces lactis*'in gelişimini tamamen inhibe ettiği bildirilmiştir [8].

Yeni nesil sekans sisteminin ve bununla ilişkili bioinformatik araçların kalite skorları, kullanılan filtreler ve yüksek homoloji düzeyleri, okumaların ve sonuçların %99 üzerinde güvenilir olduğunu gösterdi. İncelenen peynir örneklerinde ortak olarak bulunan mikrobiyomun kompozisyonu sütte doğal olarak bulunan bakterilerin yansması olarak değerlendirildi. Elde edilen bulgular geleneksel peynirin olgunlaşmasında *Lactococcus*

lactis'in baskın olduğunu göstermektedir, ayrıca bunun yanında *Lactobacillus*, *Enterococcus* ve diğer *Lactococcus* türlerinin peynirin tat, koku, aroma gibi özelliklerinin oluşumunda rol aldığı düşünülmüştür. Muhtemelen peynirin konvansiyonel kültüründe ayırt edilemeyen *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fabifermentans*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus xiangfangensis*, *Lactobacillus plantarum* gibi diğer türlerinde geleneksel peynir üzerindeki etkilerinin incelenmesi gerektiğini göstermiştir. Süttün doğal yapısında bulunan ve peynir oluşumunda rol oynayan bakteriler yanında, genellikle patojen ve komensal bakterileri kapsayan proteobakterilerinde bulunması, peynirdeki olası kontaminasyonları ve halk sağlığı yönünü akla getirmektedir. Ancak gerek bu gruptaki bakterilerin relatif yoğunluğunun düşük olması ve gerekse bu bakterilerin taksonomik dağılımı, bunların kaynağının fekal kontaminasyon olduğunu düşündürmüştür. Tespit edilen proteolitik bakterilerin dağılımı ruminant fekal mikrobiyomu ile uyum göstermektedir. Kırsal kesimdeki süt sağım koşulları, koyun sağımındaki bilinen kontaminasyon olasılığı gözönüne alındığında saptanan proteobakterilerin özellikle enterobakterilerin varlığının normal olduğunu düşündürmüştür.

Teşekkür

Bu çalışmada teknik destek sağlayan Prof.Dr. K. Serdar DİKER'e teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Alegria A, Szczesny P, Mayo B, Bardowski J, Kowalczyk M, (2012). *Biodiversity in Traditional Polish Cheese Oscypek Determined by Culture-dependent and -independent Approaches*. Appl Environ Microbiol. 78(6), 1890-1898.
2. Anonim, Dünyada ve Türkiye'de Peynir Üretimi. Eylül 2013. http://ankaratb.org.tr/lib_upload/25202013. Erişim tarihi:08.07.2017.
3. Buermans HPJ, Dunnen JT, (2014). *Next generation sequencing technology: Advances and applications*. Molecular Basis of Diseases, vol.1842, 10, 1932-1941.
4. Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C, (2014). *Ten years of next-generation sequencing technology*. Trends In Genetics, vol.30, 9, 418-426.
5. Hoorde KV, Heyndrickx M, Vandamme P, Huys G, (2010). *Influence of Pasteurization, Brining Conditions and Production Environment on the Microbiota of Artisan Gouda-type Cheese*. Food Microbiol. 27, 425-433.

6. Jonnala BRY, McSweeney PLH, Sheehan JJ, Cotter PD, (2018). *Sequencing of the Cheese Microbiome and Its Relevance to Industry*, Review. *Front Microbiol.* 9, 1-12.
7. Lessard M-H, Belanger G, Gelais St, Labrie S, (2012). *The Composition of Camembert Cheese Ripening Cultures Modulates Both Mycelial Growth and Appearance*. *Appl Environ Microbiol.* 78(6), 1813-1819.
8. Montel MC, Buchin S, Mallet A, Paus CD, Vuitton DA, Desmasures N, Berthier F, (2014). *Traditional Cheeses: Rich and Diverse Microbiota With Associated Benefits*. *Int J Food Microbiol.* 177, 136-154.
9. Ndoye B, Rasolofoa EA, Lapointe G, Roy D, (2011). *A Review of the Molecular Approaches to Investigate the Diversity and Activity of Cheese Microbiota*. *Dairy Sci& Technol.* 91, 495-524.
10. Quigley L, Sullivan OO, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, Cotter PD, (2011). *Molecular Approaches to Analysing the Microbial Composition of Raw Milk and Raw Milk Cheese*. *Int J Food Microbiol.* 150, 81-94.
11. Randazzo CL, Torriani S, . Akkermans ADL, Vos WMd, Vaughan EE, (2002). *Diversity, Dynamics and Activity of Bacterial Communities during Production of an Artisanal Scilian Cheese as Evaluated by 16S rRNA Analysis*. *Appl Environ Microbiol.* 68(4), 1882-1892.
12. Riquelme C, Camara S, de Lurnes N.E Dapkevicius M, Vinuesa P, Costa G da Silva C, Malcata FXA, Rego O, (2015). *Characterization of bacterial biodiversity in Pico cheese (an artisanal Azorean food)*. *Int J Food Microbiol.* 192(1), 86-94.
13. Sanchez SD, Hanning I, Pendleton S, Souza DD, (2013). *Next-generation sequencing: The future of molecular genetics in poultry production and food safety*. *Poult Sci.* 92, 562-572.
14. Stellato G, Filippis FDE, Stora ALA, Ercolini D, (2015). *Coexistence of Lactic Acid Bacteria and Potential Spoilage Microbiota in a Dairy Processing Environment*. *Appl Environ Microbiol.* 81(22), 7893-7904.
15. Sullivan DJO, Cotter PD, Sullivan OO, Giblin L, McSweeney PLH, Sheehan JJ, (2015). *Temporal and spatial differences in microbial composition during the manufacture of a Continental-type cheese*. *Appl Environ Microbiol.* 81(7), 2525-2533.
16. Tan S, Ertürk YE, (2002). *Peynir*. *TEAE Bakış Derg.* 1(11), 1-4.
17. Türk Gıda Kodeksi. 01.01.2016 yürürlük tarihli, Resmi Gazete, 08.02.2015.

Şanlıurfa'da Yerleşik Damızlık Atlarda Batı Nil Virüsü (BNV) Enfeksiyonu'nun Serolojik ve Virolojik Olarak Araştırılması*

Rahime Adalet Duyum¹, Taner Karaoğlu²

¹Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Ankara

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

Geliş Tarihi / Received: 17.03.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 19.04.2019

Özet: Batı Nil Virüsü (BNV) *Flaviviridae* ailesine mensup olup arthropodlarla bulaşan, insanlar, atlar, kuşlar ve çeşitli vahşi hayvanlarda ensefalit vakası ile seyredilen ve salgınlara sebep olabilen bir zoonoz hastalık etkenidir. BNV'nin doğal vektörü *Culex* ve *Aedes* cinsi sivrisinekler olup, bu arthropodlar ile yabani kuşlar arasında önemli bir bulaşma zinciri mevcuttur. BNV'nin enfeksiyon spektrumunda at, insan, köpek, koyun gibi memeli hayvanlar ile tavuk gibi evcil kanatlı hayvanlar da bulunabilmektedir. Bu çalışmada Şanlıurfa'da yerleşik damızlık atlarda Batı Nil virüsü enfeksiyonunun serolojik (ELISA ve PRNT) ve virolojik (Real Time RT-PCR) olarak araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla Şanlıurfa ilinde 10 farklı merkezde bulunan toplam 277 damızlık attan alınan kan serumu örnekleri kullanıldı. Örnekler öncelikle BNV Ab ELISA testine tabi tutularak antikor varlığı açısından değerlendirildi. Örneklerden 42 adedi (%15.16) seropozitif, 16 adedi (%5.77) şüpheli, 219 adedi (%79.06) seronegatif olarak değerlendirildi. Mevcut seropozitif ve şüpheli örnekler PRNT'ye tabi tutuldu. Söz konusu 42 seropozitif örnekten 11 adedi (%26.19)'nin spesifik Batı Nil virüs antikorunu taşıdığı tespit edildi. Şüpheli örneklerin hiçbirinde PRNT seropozitifliğine rastlanmadı. Örneklenen 277 damızlık atın 11 adedinde (%3.97) spesifik Batı Nil virüs antikoruna saptandı. BNV Ab ELISA testi ile seropozitif olarak tespit edilen 42 örnek ile 16 adet şüpheli örneğin hiçbirisinde Real Time Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (rtRT-PCR) ile viral RNA saptanamadı.

Anahtar kelimeler: Batı Nil Virüs, ELISA, PCR, PRNT

Serological and Virological Investigation of West Nile Virus Infection in Resident Breeder Horses at Şanlıurfa Province

Abstract: The West Nile Virus (BNV) is a zoonotic disease agent that is a member of the *Flaviviridae* family and which is transmitted by arthropods and can cause encephalitis in humans, horses, birds and various wild animals. The natural vector of the BNV is the *Culex* and *Aedes* genus mosquitoes, and there is an important contamination chain between these arthropods and wild birds. In the infection spectrum of BNV, mammalian animals such as horses, humans, dogs, sheep, and domestic poultry such as chickens can be found. In this study, it was aimed to investigate West Nile virus infection in serological (ELISA and PRNT) and virological (Real Time RT-PCR) in breeding horses in located in Şanlıurfa. For this purpose, blood serum samples taken from 277 breeding horses in 10 different centers in Şanlıurfa province were used. Samples were first subjected to BNV Ab ELISA and evaluated for antibody presence. 42 (15.16%) of the samples were seropositive, 16 (5.77%) were suspected and 219 (79.06%) were seronegative. Existing seropositive and suspicious samples were subjected to PRNT. Eleven (26.19%) of the 42 seropositive samples were identified to carry specific West Nile virus antibodies. None of the suspicious specimens had PRNT seropositivity. Eleven (3.97%) of 277 breeding horses were identified with specific West Nile virus antibodies. No viral RNA could be detected by Real Time Revers Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (rtRT-PCR) in 42 samples seropositive by BNV Ab ELISA test.

Key words: ELISA, PCR, PRNT, West Nile Virus

Giriş

Batı Nil Virüsü (BNV) insanlar, atlar, kuşlar ve çeşitli vahşi hayvanlarda ensefalit vakası ile seyreden salgınlara sebep olabilen, arthropodlarla bulaşan, *Flaviviridae* ailesine mensup zoonoz bir hastalık etkenidir [2,4,8]. Virüsün doğal taşıyıcısı *Culex* ve *Aedes* cinsi sivrisineklerdir. Yabani kuşlarla bu arthropodlar arasında önemli bir geçiş zincirine sa-

hip olan virüs insan, at, köpek, koyun gibi memeli hayvanlar ile tavuk gibi evcil kanatlı hayvanları da enfekte edebilmektedir [18,19,20].

Ülkemizin, kuşların önemli göç yolları arasında yer alması enfeksiyonun yayılması açısından önem arz etmektedir. Aynı zamanda ülkemizin at yetiştiriciliği açısından oldukça ileri bir noktada olması, enfeksiyonunun at yetiştiriciliğinde sebep olabile-

* A.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde tamamlanan bir Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.

Yazışma adresi / Correspondence: Prof. Dr. Taner Karaoğlu, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara E-posta: taner.karaoglu@ankara.edu.tr

ceği performans düşüklüğü ve kayıplardan dolayı Batı Nil Virüs enfeksiyonunu ekonomik yönden önemli bir hale getirmektedir. Bu çalışmanın yapıldığı coğrafi konumun göçmen kuşların göç yolları üzerinde yer alması, bölgenin ılıman iklim kuşağında bulunması ve sulak arazi oranının yüksek olması ve araştırmada örneklenen yerleşik at popülasyonu yanında yılın belirli zamanlarında yarış programı kapsamında olan Şanlıurfa'ya ülkenin değişik şehirlerinden gelen yarış atları için de Batı Nil Virüs enfeksiyonu riskinin algılanması ve bu yolla yurdun değişik bölgelerine virüs iletimi olasılıklarının değerlendirilmesi adına Şanlıurfa'da yerleşik atlarda Batı Nil Virüsü enfeksiyonunun serolojik ve virolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Örneklenen İşletmeler

Çalışmada Şanlıurfa merkez ve çevre ilçelerinde damızlık at yetiştiriciliği yapan 10 ayrı işletmede bulunan toplam 277 attan alınan kan serumu örnekleri kullanıldı (Tablo 1). Mevcut işletmelerde bulunan atların yaşamları boyunca buldukları il/ilçe'den farklı bir yere götürülmedikleri ve Batı Nil virüsü enfeksiyonuna karşı aşılanmadıkları öğrenildi.

Tablo 1. Örnekleme yapılan işletmeler.

İşletme No	İşletmenin Bulunduğu İlçe	Örneklenen Hayvan Sayısı
I	Merkez/Eyyübiye	21
II	Merkez/Karaköprü	51
III	Siverek	47
IV	Siverek/Haliliye	44
V	Suruç	53
VI	Hilvan	47
VII	Akçakale	5
VIII	Halfeti	2
IX	Viranşehir	1
X	Bozova	6
Toplam		277

Hücre Kültürü

BNV'nin üretilmesi, virüsün titresinin hesaplanması ve Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testinde (PRNT) Vero E6 (ATCC CCL81-Afrika Yeşil Maymun Böbrek) devamlı hücre kültürü kullanıldı.

Virüs

Araştırmada, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı laboratuvarı koleksiyonunda mevcut BNV suşu (West Nile virus NY-99 strain) kullanıldı. Virüs Vero E6 hücre kültüründe üretildi ve PRNT'de 3×10^6 /mL plak oluşturan ünite titresinde kullanıldı.

Kan Serum Örneklerinin Hazırlanması

Silikonlu tüplere alınan kan, pıhtılaştıktan sonra 2000 devirde 10 dakika santrifüj edilip serumları ayrıldı. Serumlar test edilinceye kadar -20°C 'de muhafaza edildi. PRNT öncesi serum örnekleri 56°C 'de 30 dakika tutulmak suretiyle inaktive edildi.

BNV Ab ELISA Testi

BNV proteinlerine karşı oluşan antikorların tespiti amacıyla bütün serum örnekleri INGEZIM West Nile COMPAC antikor ELISA testine tabi tutuldu. Testin uygulama basamakları ve değerlendirme ölçütleri üretici firmanın belirlediği kriterlere göre yapıldı.

BNV IgM ELISA Testi

BNV Ab ELISA test kiti ile seropozitif olarak tespit edilen örnekler ile şüpheli olarak değerlendirilen bütün serum örnekleri BNV'ye spesifik akut dönem antikorlarının tespiti amacıyla IDEXX West Nile Virus IgM Antikor ELISA testine tabi tutuldu. Testin yapım aşamaları ve değerlendirme kriterleri üretici firmanın belirttiği prosedüre göre uygulandı.

Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT)

BNV Ab ELISA test kiti ile seropozitif olarak tespit edilen 42 serum örneği ile şüpheli olarak değerlendirilen 16 serum örneği plak redüksiyon nötralizasyon testine tabi tutuldu. Virüs kontrol gözlerindeki plak sayısının % 80 ve daha yüksek oranda azalmasına yol açan serum sulandırması o örneğin BNV'ye karşı spesifik nötralizan antikor taşıdığı yönünde değerlendirildi.

Real Time Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (rtRT-PCR)

BNV Ab ELISA test kiti ile seropozitif (42) ve şüpheli olarak değerlendirilen (16) serum örnekleri rtRT-PCR'a tabi tutuldu. Öncelikle viral ge-

nomik RNA izolasyonu amacıyla ticari QIAamp Viral RNA Mini Kiti üretici firmanın önerdiği şekilde kullanılarak RNA ekstraksiyonu yapıldı. Söz konusu örnekler viral genomik RNA varlığı açısından gerçek zamanlı ters transkripsiyonlu poli-

meraz zincir reaksiyonuna tabi tutuldu. Bu amaçla Thermo Fisher tarafından geliştirilmiş Lineage-1 ve Lineage-2'yi tespit etme özelliğine sahip primer ve prob kullanıldı.

Testte kullanılan Primer ve prob dizaynları aşağıda sunuldu.

NS2A-Fwd	5'-GGG CCT TCT GGT CGT GTT C-3'
NS2A-Prob	5'-FAM-CCA CCC AGG AGG TCC TTC GCA A-TAMRA-3'
NS2A-Rev	5'-GAT CTT GGC YGT CCA CCT C-3'

Kullanılan internal pozitif kontrol için primer ve prob dizaynları aşağıda sunuldu.

NS5-2-Fwd	5'-GAA GAG ACC TCG GGC TCA TG-3'
NS5-2-Prob	5'-VIC-CCA ACG CCA TTT GCT CCG CTG-TAMRA-3'
NS5-2-Rev	5'-CGG TAG GGA CCC AAT TCA CA-3'

Realtime RT-PCR (rtRT-PCR) reaksiyon karışımını hazırlamak için gerekli bileşenler ve miktarları tablo 2'de gösterildi.

Tablo 2. rtRT-PCR karışım bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Miktar(µL)
2 x Reaksiyon Karışımı	12,5 µL
Primer Forward (50 pmol/µL)	1 µL
Primer Reverse (50 pmol/µL)	1 µL
DNase, RNase ari H ₂ O	5,0 µL
Superscript mix	0,5 µL
Toplam	20 µL

Elde edilen rtRT-PCR reaksiyon karışımı 5 µL RNA ekstraktı ile +4°C'deki soğutucu bloklarda karıştırıldı. Elde edilen 25 µL üründeki saptama CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System cihazı ile tablo 3'de verilen süre ve döngülerden oluşan programla gerçekleştirildi.

Tablo 3. Real Time RT-PCR ısı döngüsü ve döngü sayısı.

Safhalar	Sıcaklık	Süre	Siklus sayısı
cDNA Sentezi	50°C	15 dk	1
Ön Denatürasyon	95°C	120 sn	1
Denatürasyon	95°C	10 sn	35
Bağlanma/Uzama	60°C	30 sn	

Test örneklerine ait sonuçlar pozitif ve negatif kontrollerle karşılaştırılarak değerlendirildi. Pozitif

kontrol ve pozitif örneklerde Ct değeri 35'den küçük ve yükselen bir sigmoid logaritmik eğri olarak, Negatif kontrol ve negatif örneklerde ise Ct değeri 35'ten büyük ve düz bir floresan çizgisi şeklinde izlendi. Ct değeri 30-35 arasında olan örnekler ise zayıf pozitif olarak değerlendirildi ve tekrar test edildi.

Bulgular

BNV Ab ELISA ve BNV IgM ELISA Testi Sonuçları

Örnekleme yapılan toplam 10 adet işletmenin 6 tanesinde Batı Nil virüsüne ait antikor varlığı tespit edildi. Toplam 277 ata ait kan serum örneğinin BNV Ab ELISA ile kontrolü sonucunda örneklerin 42 adeti seropozitif olarak belirlendi. On altı adet serum örneği ise testin değerlendirme kriterine göre şüpheli olarak kabul edildi. Söz konusu şüpheli örnekler ikinci kez aynı teste tabi tutuldu ve yine şüpheli aralıkta değerlendirildiler. Seropozitif olarak tespit edilen örnekler (42 adet) ile şüpheli aralıkta kalan örnekler (16 adet) IgM ELISA testi ile ikinci bir teste tabi tutularak söz konusu seropozitif hayvanların kaçının akut enfekte olduğunun tespiti yapıldı. Söz konusu 42 seropozitif örnekten 1 adeti IgM pozitif olarak bulunurken geri kalan 41 örnek IgG olarak değerlendirildi. Şüpheli aralıkta yer alan 16 adet örnekten hiçbirinde IgM varlığı tespit edilmedi. Örneklere uygulanan ELISA testlerinin sonuçları tablo 4'de sunuldu.

Tablo 4. İşletmelere göre ELISA sonuçlarının dağılımı.

İşletme No	İşletmenin Bulunduğu İlçe	Örneklenen Hayvan Sayısı	Pozitif (%)	
			BNVAb (+)	IgM (+)
I	Merkez/Eyyübiye	21	3 (14.28)	-
II	Merkez/Karaköprü	51	5 (9.8)	-
III	Siverek	47	7 (14.89)	-
IV	Siverek/Haliliye	44	3 (6.81)	1* (2.27)
V	Suruç	53	11 (20.75)	-
VI	Hilvan	47	13 (27.65)	-
VII	Akçakale	5	0	-
VIII	Halfeti	2	0	-
IX	Viranşehir	1	0	-
X	Bozova	6	0	-
	Toplam	277	42 (15.16)	1 (0.36)

* Örnek aynı zamanda BNV Ab (+) örneklerden biri

Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT)

Sonuçları

ELISA testi ile tespit edilen seropozitifliklerin Batı Nil virüs'ü'ne karşı spesifik olup olmadığının saptanmasına yönelik olarak BNV Ab ELISA testi ile seropozitif olarak tespit edilen 42 örnek ile şüpheli aralıkta değerlendirilen 16 örnek Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testine alındı. Seropozitif 42 örnekten 11 adedi (%26.19) PRNT'de pozitif olarak

tespit edildi ve bu bireyler BN virüse karşı spesifik antikor oluşturan bireyler olarak kabul edildi. IgM ELISA testi ile seropozitif olarak tespit edilen bir örnek PRNT'de negatif sonuç verdi. BNV Ab ELISA testi ile şüpheli aralıkta değerlendirilen örneklerin hiçbirinde PRNT seropozitifliği saptanmadı. BNV Ab ELISA ve PRNT sonuçları karşılaştırmalı olarak tablo 5'de sunuldu.

Tablo 5. BNV Ab ELISA ve PRNT sonuçlarının ilçelere göre dağılımı.

İşletmenin Bulunduğu İlçe	Örneklenen hayvan sayısı	ELISA Pozitif hayvan sayısı (%)	PRNT Pozitif hayvan sayısı (%)
Merkez/Eyyübiye	21	3 (14.28)	1 (4.76)
Merkez/Karaköprü	51	5 (9.8)	4 (7.84)
Siverek	47	7 (14.89)	3 (6.38)
Siverek/Haliliye	44	3 (6.81)	0
Suruç	53	11 (20.75)	1 (1.88)
Hilvan	47	13 (27.65)	2 (4.25)
Akçakale	5	0	0
Halfeti	2	0	0
Viranşehir	1	0	0
Bozova	6	0	0
Toplam	277	42 (15.16)	11 (3.97)

Real Time Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları

BNV Ab ELISA pozitif 42 ve şüpheli 16 adet örneğin ekstraksiyonu yapıldı ve elde edilen ürünler

Real Time RT-PCR ile test edildi. Örneklerin hiçbirinde Lineage 1 ve Lineage 2'ye ait BNV genomik RNA'sı tespit edilemedi.

Tartışma ve Sonuç

Virüs ilk kez Uganda'da Batı Nil adı verilen bölgede yüksek ateşli bir kadın hastadan izole edilmiştir [17]. BNV'nin sebep olduğu at ensefaliti olguları ise ilk kez 1960'lı yılların başlarında Mısır ve Fransa'da bildirilmiştir [3]. Batı Nil virüs enfeksiyonu çeşitli zamanlarda Asya, Afrika, Orta doğu, Balkanlar, Avrupa'nın doğusu ve güneyinde atlar ve diğer memelilerde salgınlara neden olmuştur.

Güney Afrika'da 1974 yılında BNV'nin sebep olduğu yaklaşık 10.000 ateşli insan olgusu, en büyük BNV salgını olarak bilinmektedir [3]. Romanya'da 1996 yılında BNV, arboviral ensefalitin büyük bir sebebi olarak ortaya çıkmış olup, altısı ölüm ile sonuçlanan 393 ensefalitli insan olgusu bildirilmiştir. Bindokuzyüz doksanaltı yılından sonra insanlarda ve atlarda BNV ensefalit olgularının Akdeniz havzasında, Rusya ve Avusturya'da hızlı bir şekilde arttığı bildirilmiştir [3].

Ülkemizde Batı Nil virüs enfeksiyonu ile ilgili insanlarda da yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu konuda yapılmış ilk serolojik çalışmada İzmir, Erzurum, Adana ve Diyarbakır illerinde beş yaş altında, 6-15 yaş arasında ve 16 yaş üzerinde olmak üzere üç farklı yaş grubundan alınan toplam 559 serum örneğinde hemaglutinasyon inhibisyon testiyle Batı Nil veya buna benzer bir ajanla meydana gelen bir enfeksiyonun ülkemizde varlığı gösterilmiştir [9].

Serter [14] tarafından yapılan bir çalışmada 1966 yılında İzmir ve civarından sinirsel belirtilerle hastaneye gelen bireylerin üçte birinin bu ajanlarla enfekte olduğu ve bunların çoğunun Arbovirüsler tarafından meydana gelen enfeksiyonlar olduğu ileri sürülmüştür. Serter tarafından 1964-1966 yılları arasında İzmir ve civarında 20 hastanın kan serumlarında arbovirüslerin araştırıldığı araştırma bulguları, Batı Nil başta olmak üzere bazı Arbovirüsler için pozitif reaksiyonları ve muhtemelen geçirilmiş enfeksiyonları işaret etmektedir.

Araştırmacı benzer şekilde 1968'de İzmir ve çevresinde tick-borne virüs meningoensefalitlerini araştırmış ve Tick-borne, West Nile, Dengue Fever, Tahyna ve Sindois virüslerine karşı antikor varlığını tespit etmiştir [15].

Meço [10] Güneydoğu Anadolu Bölgesinde 1970'lerde yaptığı bir çalışmada 937 bireye ait kan

serumu örneğinde hemaglutinasyon inhibisyon testi ile BNV seropozitifliğini araştırmış ve bu bölgedeki farklı illerde %38 - 47.8 arasında değişen oranlarda seropozitiflik bulmuş ve seropozitifliğin yaşla birlikte arttığını vurgulamıştır.

Serter'in 1980'de yürüttüğü bir başka çalışmada ise Ege illerinde yaptığı örneklemelerde hemaglutinasyon inhibisyon testi ile 1074 bireyin %29,1'inde virüse spesifik antikorlar saptanmış, bunun %74'ü de nötralizasyon testi ile doğrulanmıştır [16]. Fakat elde edilen verilerin yüksek oranda Flavivirüsler arasında meydana gelen antijenik çapraz reaksiyonlardan kaynaklandığı belirtilmiştir.

Batı Nil virüs enfeksiyonu ülkemizde son 15 yıl içerisinde özellikle at yetiştiriciliği yapılan işletmelerde önemli bir enfeksiyon olarak karşımıza çıkmaktadır. Ülkemizde yapılan bildirimler incelendiğinde enfeksiyonun özellikle ilkbahar yaz mevsimlerinde havanın ısınması ile artış gösterdiği, göçmen kuş popülasyonlarının durak yerlerinde ve sulak arazi oranının fazla olduğu bölgelerde yayılımı sahip olduğu görülmektedir [5].

Özkul ve ark. (13) farklı türlerin kan serumlarına uyguladıkları PRN testinde 40 katır örneğinin 1'inde (%2.5), 100 sığır örneğinin 4'ünde (%4), 114 köpek örneğinin 43'ünde (%13.5), 259 at örneğinin 35'inde (%13.5), 88 insan örneğinin 18'inde (%20.4) ve 100 koyun örneğinin 1'inde (%1) batı Nil virüs nötralizan antikorlarını tespit etmiş, elde edilen sonuçları geniş bir memeli yelpazesinin virüse maruz kaldığı şeklinde değerlendirmiştir.

Bu çalışmada Şanlıurfa merkez ve çevre ilçelerinde yerleşik bulunan ve sağlıklı görünen Batı Nil virüs enfeksiyonunun son konakçısı olan damızlık atlarda hastalığın serolojik ve virolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla Şanlıurfa merkez ve çevresindeki ilçeleri kapsayan toplam 10 farklı merkezde yer alan ve mevcut yerlerinden örnekleme anına kadar farklı bir yere götürülmeyen ve yer değişikliği yapılmayan toplam 277 sağlıklı görünümü damızlık ata ait kan serumu örnekleri kullanılmıştır. Söz konusu örnekler öncelikle Batı Nil virüsüne karşı antikor ELISA testine tabi tutulmuş, test edilen toplam 277 ata ait kan serumu örneğinin 42 adedinde (%15.16) antikor varlığı saptanmıştır. On altı adet serum örneği testin değerlendirme kriterine göre şüpheli aralıkta bulunmuş bu sebeple 2.

kez aynı teste tabi tutulmuş ve yine şüpheli aralıkta saptanmıştır.

Çalışmada örneklenen hayvanların kan serumlarına yapılan BNV Ab ELISA testi ile öncelikli olarak hayvanların enfeksiyona maruz kalıp kalmadığı tespit edildi. Antikor pozitif olarak tespit edilen hayvanlar bu defa Batı Nil virüsü IgM ELISA testine tabi tutularak hangilerinin akut enfekte, hangilerinin ise konvelesan dönemde olduğunun tespitine yönelik bir çıkarıma tabi tutuldular. Bu amaçla seropozitif olarak tespit edilen 42 adet örnek ile 16 adet şüpheli örnek BNV IgM ELISA testine tabi tutuldu. BNV Ab ELISA testi ile seropozitif olarak saptanan 42 örneğin 1 adeti IgM pozitif olarak saptanırken geri kalan 41 örnek IgG pozitif olarak değerlendirildi. Şüpheli 16 örnekten herhangi birisinde ise IgM seropozitifliği saptanmadı. Söz konusu IgM seropozitif hayvanın IV no'lu merkezden örneklendiği ve mevcut 3 adet seropozitifliğin iki adedinin IgG ve bir adedinin IgM şeklinde olduğu sonucuna varıldı (Tablo 4).

Örneklemlerin yapıldığı on adet merkezden 6 adedinde (I, II, III, IV, V, VI) antikor varlığı tespit edilirken, 4 adet merkezden örneklenen hayvanların kan serum örneğinde (VII, VIII, IX, X) antikor varlığına rastlanmadı.

Antikor varlığı tespit edilen merkezler tek tek değerlendirildiğinde (tablo 4); en yüksek seropozitiflik oranı VI no'lu merkezde %27.65 (13/47) olarak tespit edildi. Bunu sırasıyla; V nolu merkezde %20.75 (11/53), III no'lu merkezde %14.89 (7/47), I no'lu merkezde %14.28 (3/21), II no'lu merkezde %9.8 (5/51) ve IV no'lu merkezde %6.81 (3/44)'lik seropozitiflik değerleri takip etti.

Araştırmaya katılan VII, VIII, IX ve X no'lu merkezlerde ise herhangi bir antikor türü yönünden seropozitifliğe rastlanamamıştır. Söz konusu merkezlerde örneklenen hayvan sayısına bakıldığında VII no'lu merkezden 5, VIII no'lu merkezden 2, IX no'lu merkezden 1 ve X no'lu merkezden 6 hayvanın örneklendiği görülmektedir. Bu merkezlerden yapılan örneklemlerden elde edilen sonuçlar enfeksiyonun o işletmelerdeki varlığı veya yokluğu hakkında söz söyleyebilmek için son derece yetersizdir. Ancak örneklem büyüklüğünün biraz daha fazla olduğu komşu ilçelerin sonuçlarına bakıldığında, söz konusu hastalığa yönelik seroprevalansın

%6.81 (IV no'lu merkez) ile %27.65 (VI no'lu merkez) arasında değiştiği görülmektedir.

Batı Nil Virüse ilişkin serokonversiyonların tespiti için üretilen ELISA temelli test sistemleri, Flavivirüs cinsi içindeki diğer virüslere karşı oluşan antikorlar ile çapraz reaksiyon verebilmektedir. Yapılan çeşitli araştırmalarda BNV ELISA Antikor test sistemlerinin St Louis ensefalitis virüs, Japon ensefalitis virüs, Usutu virüs veya tick-borne ensefalitis (TBE) gibi diğer bazı flavivirüslere karşı oluşan antikorlar ile çapraz reaksiyon verebildiği belirtilmektedir. Nitekim Dünya Hayvan Sağlığı Organizasyonu'nun [1] ilgili web sayfalarında da konu ile ilgili dikkat çekilerek, Batı Nil virüs'e karşı serolojik testler içinde en spesifik olan testin PRNT olduğu ifade edilmekte ve önerilmektedir.

Sırbistan'da yapılan bir çalışmada da 2007-2011 yılları arasında 252 attan toplanan serum örnekleri ELISA (Ingezim West Nile Compac ELISA, İspanya) testine tabi tutulmuş ve 72 adet örnek (%28.57) seropozitif olarak tespit edilmiştir. Mevcut 72 seropozitif örneğe yapılan PRNT sonucunda örneklerden 48 adedinin (%19.04) spesifik Batı Nil virüse karşı oluşmuş antikor taşıdığı sonucuna varılmıştır [11].

Bizim çalışmamızda da seropozitif olarak tespit edilen toplam 42 adet ELISA seropozitif ve 16 adet şüpheli örneğe PRNT uygulanmıştır. Test sonucunda toplam 42 adet pozitif serum örneğinin 11 adedinde (%26.19) Batı Nil virüsü antikorunu tespit edilmiştir. PRNT sonuçları göz önüne alındığında örneklemlerin yapıldığı toplam 10 adet merkezin 5'inde Batı Nil virüsüne karşı spesifik antikor taşıyan bireyler tespit edilmiştir. Örneklemlerin yapıldığı merkezler tek tek değerlendirildiğinde ise Batı Nil virüse karşı oluşmuş spesifik antikor varlığının en yüksek II no'lu merkezde %7.84 (4/51) olduğu tespit edilmiştir. Diğer seropozitif merkezlerde bu oran sırasıyla; III no'lu merkezde %6.38 (3/47), I no'lu merkezde %4.76 (1/21), VI no'lu merkezde %4.25 (2/47) ve V no'lu merkezde %1.88 (1/53) olarak bulunmuştur (Tablo 5). Araştırmada IV, VII, VIII, IX ve X no'lu merkezlerden yapılan örneklemlerde ise Batı Nil virüse spesifik antikor varlığı taşıyan bireylere rastlanmamıştır. ELISA testi ile seropozitif olarak tespit edilen ancak PRNT'de negatif olarak değerlendirilen örneklerdeki ELISA antikor pozitif-

liğinin, aynı grup virüslerle olası çapraz reaksiyonlara bağlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Bölgesel virüs sirkülasyonunun doğrulanmasına yönelik olarak bölgedeki insanlarda yapılan farklı serolojik taramalar da çalışmamızın sonuçlarını destekler mahiyettedir. Şanlıurfa'da ve Siverek ilçesinde 2007 yılında yürütülen bir araştırmada, 181 adet sağlıklı bireyden alınan kan serum örneklerinde indirekt immüfloresan yöntemi kullanılarak virüse spesifik IgG antikorlarının tespiti amaçlanmıştır. Araştırma kapsamında çalışılan örneklerde %16 oranında seropozitiflik elde edilmiş ve bu seropozitifliklerin %9.5'i PRNT ile teyit edilmiştir. Araştırma sonunda bölgedeki sivrisinek hareketliliği ile doğru orantılı olarak bireylerde olası Batı Nil virüs enfeksiyonu varlığı da kanıtlanmıştır [6, 12].

Orta Anadolu bölgesinde 2516 bireyde yapılan başka bir araştırmada ise virüse karşı oluşan IgG antikorlarının ELISA testiyle taraması yapılmıştır. Araştırma sonucunda %0.99 (25/2516) oranında IgG pozitifliği belirlenmiş ve örneklerin %0.56 (14/2516)'sı PRNT ile doğrulanmıştır. Bu araştırma Orta Anadolu'da virüsün bölgedeki aktivitesini ispatlamıştır [7].

Bu araştırma ile Şanlıurfa merkez ve çevre ilçelerinde yerleşik damızlık atlarda enfeksiyonun varlığı ve yaygınlığı araştırılmış, BNV Ab ELISA testi ile % 15.16 (42/277) seropozitif olarak değerlendirilen örneklere yapılan PRNT ile spesifik Batı Nil virüs antikor oranının %3.97 (11/277) olduğu sonucuna varılmıştır. Gerek bu araştırmada elde edilen sonuçlar ve gerekse yukarıda açıklanan diğer araştırma sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, özellikle BNV'a spesifik antikor varlığının tespitinde serolojik testler içinde PRNT'nin yüksek spesifiteye sahip olduğu unutulmamalıdır.

Çalışma kapsamında birinci aşamada BNV Ab ELISA ile seropozitif olarak değerlendirilen 42 örnek ile şüpheli olarak değerlendirilen 16 örneğe (toplam 58 örnek) uygulanan Real Time RT-PCR testinde pozitiflik saptanamadığından moleküler epidemiyolojik değerlendirmeye tabi tutulacak bir veriye ulaşılamamıştır. Enfeksiyona maruz kalan tek turnaklılarda viremi döneminin oldukça kısa sürdüğü bilinen bir gerçektir. Dolayısıyla çalışma kapsamında örneklenen hayvanlarda örnekleme anında herhangi bir akut hastalık tablosunun da bil-

dirilmemiş olması ve virüsün doğasında tanımlanmış bir uzun süreli viremi bulunmaması sebebiyle bu sonuç normal karşılanmıştır. Bu anlamda virüsün ülkemizdeki sirkülasyonun belirlenmesi için daha geniş saha çalışmalarına gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca zoonoz olan Batı Nil Virüsünün muhtemel insan vakalarına da sebep olabileceği göz önüne alındığında özellikle hastalığın bulaştırılmasında rol oynayan sokucu sinek popülasyonlarının yaşamını daha uzun süre sürdürebildiği, mevsimsel olarak daha ılıman bölgelerde enfeksiyonun her zaman akılda tutulmasında fayda bulunmaktadır.

Araştırma bulguları, çalışmanın yapıldığı coğrafi konumun göçmen kuşların göç yolları üzerinde yer alması, bölgenin ılıman iklim kuşağında bulunması ve sulak arazi oranının yüksek olması enfeksiyonun yayılması açısından önemli ipuçları verirken, araştırmada örneklenen yerleşik at popülasyonu yanında yılın belirli zamanlarında yarış programı kapsamında olan Şanlıurfa'ya ülkenin değişik şehirlerinden gelen yarış atları için de Batı Nil Virüs enfeksiyonu riskinin algılanması ve bu yolla yurdun değişik bölgelerine virüs iletimi olasılıklarının değerlendirilmesi adına önem arz etmektedir.

Kaynaklar

1. Anonim, (2008). *OIE World Organisation for Animal Health*. Erişim Adresi: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_wnf.pdf , Erişim Tarihi: 1.11.2017.
2. Bernkopf H, Levine S, Nerson R (1953). *Isolation of West Nile virus in Israel*. The Journal of Infectious Diseases, 7: 128-132.
3. Chambers T, Monath T (2003). *The Flaviviruses: Detection, Diagnosis, and Vaccine Development*. Advances in Virus Research (61): 577.
4. Diamond MS (2009). *West Nile Encephalitis Virus Infection: Viral Pathogenesis and the Host*. Immune Response 1-3.
5. Ergünay K, Aydoğan S, Menemenlioğlu D, Şener B, Lederer S, Steinhagen K, Haşçelik G, Pınar A, Özkul A, Us D (2010). *Investigation of West Nile Virus in central nervous system infections of unknown etiology in Ankara, Turkey*. Mikrobiyol Bul, 44(2): 255-262.
6. Ergünay K, Özer N, Us D, Özkul A, Şimşek F, Kaynaş S, Ustaçelebi S (2007). *Seroprevalence of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in southeastern Turkey: First evidence for tick-borne encephalitis virus infections*. Vector-Borne Zoonot, 7: 157-161.
7. Ergünay K, Saygan MB, Aydoğan S, Menemenlioğlu D, Turan HM, Özkul A, Us D (2010). *West Nile Virus*

- Seroprevalence in Blood Donors from Central Anatolia, Turkey*. Vector Borne Zoonotic Dis, 10(8): 771-5.
8. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL (2005). *Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease*. Emerg Infect Dis, 11(8): 1174-9.
 9. Heperkan Y, Arı A (1964). *Türkiye'de ARBO virüsleri üzerinde bir çalışma*. Türk Hij Tec Biyol Derg, 24: 113-117.
 10. Meço O (1977). *West Nile arbovirus antibodies with hemagglutinationinhibition (HI) in residents of Southeast Anatolia*. Mikrobiyol Bul, 11: 3-17.
 11. Medic S, Hoven RVD, Petrovic T, Lupulovic D, Nowotny N (2014). *Serological evidence of West Nile virus infection in the horsw population of northern Serbia*. Journal of Infection in Developing Countries, 8(7), 914-918.
 12. Özer N, Ergünay K, Şimşek F, Kaynas S, Alten B, Çağlar SS, Ustaçelebi Ş (2007). *West Nile virus studies in the Sanliurfa Province of Turkey*. J Vector Ecol, 32(2): 202-6.
 13. Özkul A, Yıldırım Y, Pınar D, Akçalı A, Yılmaz V, Çolak D (2006). *Serological evidence of West Nile Virus (WNV) in mammalian species in Turkey*. Epidemiol. Infect, 134: 826–829.
 14. Serter F (1966). *Arthropodlarla bulaşan virus hastalıklarının (Arbovirus enfeksiyonları) memleketimizdeki durumu*. XII. Türk Mikrobiyoloji Kongre raporu, 104.
 15. Serter F (1968). *Tick-borne meningo-encephalitis cases in Izmir area*. EU Tıp Fak Mec, 7(1): 1-13.
 16. Serter F (1980). *Ege Bölgesinde Arbovirus seroepidemiolojisinin mevcut durumu*. Zbl Bakt, (9): 155-61.
 17. Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH (1940). *A neurotropic virus isolated from blood of a native of Uganda*. Am J Trop Med Hyg, 20(4): 471-492.
 18. Taylor RM, Hurlbut HS, Dressler HR, Spangler EW, Thrasher D (1953). *Isolation of West Nile virus from Culex mosquitoes*. J Egypt Med Assoc, 6 (3): 199–208.
 19. Tosun S (2011). *Sorun enfeksiyonlarda yaklaşım ve tedavi*. Batı Nil Virüsü. 3. Türkiye EKMUD Bilimsel Platformu. 1-5 Mart 2011, İstanbul, 203-212.
 20. Zaayman D, Human S, Venter M (2009). *A highly sensitive method for the detection and genotyping of West Nile virus by real time PCR*. J Virol Methods, 157(2): 155-60.

Zencefil'in Antibakteriyal Etkisi

Çiğdem Güceyü¹, Gülşen Goncagül², Elçin Günaydın³, Pınar Akpınar¹

¹Bursa Uludağ Üniv. Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu, Bursa

²Bursa Uludag Üniv. Mennan Pasinli Meslek Yüksek Okulu, Bursa

³Hitit Üniv. Alaca Avni Çelik Meslek Yüksek Okulu, Çorum

Geliş Tarihi / Received: 26.04.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 28.05.2019

Özet: Antibiyotiklerin artan kullanımı mikroorganizmaların direnç kazanmasına neden olmuştur. Bu durumda özellikle kolay elde edilebilen, daha az yan etkiye sahip bitki kaynaklı terapötik maddelere ihtiyaç duyulmaktadır.

Zingiber officinale (Zencefil) eski çağlardan beri tüm dünyada doğrudan antimikrobiyal etkinliğe sahip olması nedeniyle bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmıştır.

Çalışmada *Zingiber officinale* bitkisinin Soxhlette hazırlanan etanol ekstraktlarının, standart *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *Escherichia coli* (ATCC-25922) ve insanlardan izole edilmiş daha önce farklı antibiyotiklere dirençli olduğu bilinen *Acinetobacter baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae* etkenlerine karşı antibakteriyel aktivitesi ile, ampisilin (AM), sefazolin (CZ), sefuroksim (CXM), meropenem (MEM), kolistin (CL), ofloksasin (OFX), sulfametoksazol/trimetoprim (SXT), tetrasiklin (TE), gentamisin (GM) etkilerinin agar difüzyon yöntemi ile karşılaştırılması amaçlandı.

Bu çalışmada zencefil (*Zingiber officinale*) ekstraktının tüm test edilmiş bakterilerden *Staphylococcus aureus*'a karşı 5 µL, 10 µL, 15 µL ve 20 µL ekstrakt emdirilen diskler çevresinde sırasıyla 7 mm, 10 mm, 11 mm, 15 mm inhibisyon zon çapları ile ekstraktın artan miktarlarıyla etkisinin fazlaştığı gözlemlendi. *Escherichia coli*'de ise sadece 20 µL ekstrakt uygulanan disk çevresinde 7 mm inhibisyon zon çapı saptandı. Diğer bakterilerde ise ekstraktın etkinliğinin görüldüğü bir inhibisyon zon çapı oluşmadı.

Sonuç olarak, *Zingiber officinale*'nin yapısındaki bileşiklerin *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'ye karşı doza bağlı olarak antibakteriyel etkinliğe sahip olması dolayısıyla ekstraktın MİK ve MBK üzerine çalışmaların yapılmasının faydalı olacağı düşünüldü.

Anahtar kelimeler: Zencefil, Antibiyotik duyarlılığı, Antibakteriyal etki, Bakteri

Antibacterial Effect of *Zingiber Officinale* (Ginger)

Abstract: The increased use of antibiotics has caused microorganisms to gain resistance. This situation requires plant-derived therapeutic agents with less side effects, which are particularly easy to obtain.

Zingiber officinale has been used in the treatment of bacterial infections since ancient times because it has direct antimicrobial activity all over the world.

In our study, ethanol extracts prepared from Soxhlette of *Zingiber officinale* plant, with antibacterial activity against the agents of *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients known to be resistant, *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *Escherichia coli* (ATCC-25922), the antimicrobial activity of ampicillin (AM), cefazolin (CZ), cefuroxime (CXM), meropenem (MEM), colistin (CL), ofloxacin (OFX), sulphamethoxazole / trimethoprim (SXT), tetracycline (TE) and gentamicin (GM)), which are currently used, were compared with agar diffusion method.

In this study, it was observed that the effect of ginger extract was increased by increasing amounts of extract with 7mm, 10mm, 11mm, 15mm inhibition zone diameters around *Staphylococcus aureus* against 5 µL, 10 µL, 15 µL and 20 µL extracts respectively from all tested bacteria. In the case of *Escherichia coli*, only 7 µM inhibition zone diameter was detected around the disk where only 20 µL extract was applied. In the other bacteria, an inhibition zone diameter, in which activity of extract observed did not occur.

As a conclusion, we think that it is useful to study the MIC and MBK of the extract because the compounds of *Zingiber officinale* have antimicrobial activity depending on dose against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Key words: *Zingiber officinale*, Antibiotic susceptibility, Antibacterial effect, Bacteri

Giriş

Bakteriyel enfeksiyonlar önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Son yıllarda patojen etkenlerin geliştirdiği antibiyotik direnci, hatta çoklu ilaç direnci nedeniyle bilim insanları çeşitli kaynaklardan antimikrobiyal aktiviteye sahip, yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar yapmakta dırlar [8].

Latince adı *Zingiber officinale* olan zencefil, *Zingiberaceae* familyasına ait, boyu bir metreye kadar uzayabilen, ince uzun yapraklı, sarı-kırmızı renkli çiçek açan bir bitkidir. Çin başta olmak üzere, Hindistan, Endonezya, Vietnam, Japonya gibi tropikal ya da subtropikal iklimlerde yetiştirilmektedir [33].

Zencefilin kök veya rizomları, baharat olarak ve tıbbi amaçlı kullanılmak üzere yetiştirilmektedir. Asya yemeklerinin vazgeçilmez bir baharatıdır. Ayrıca yüzyıllardır Asya, Hindistan ve çeşitli Arap ülkelerinde tıbbi amaçlı kullanılmıştır. Zencefil, çiğ veya pişmiş olarak kullanılabilir. Taze, kurutulmuş ve toz haline getirilmiş formları da bulunur [32].

Zencefil, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından çok az yan etkisi olan sağlıklı bir madde olarak da bildirilmiştir [20].

Sivasothy ve ark. [29]'nın yaptığı çalışmada, zencefilin yaprak ve rizomlarından hidrodestilasyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağları, mikro seyreltme tekniği kullanarak antibakteriyel aktivitelerinin değerlendirilmiştir. Buna göre kök ve rizomlardan elde edilen yağların Gram-pozitif bakterilerden *Bacillus licheniformis*, *Bacillus spizizenii*, *Staphylococcus aureus*'a ve Gram-negatif bakterilerden *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas stutzeri*'ye karşı orta derecede etkin olduğunu ortaya koymuşlardır. Benzer bakteriler üzerine zencefilin etkinliğini belirlemek üzerine yapılmış diğer bir çalışmada da, zencefil ekstraktlarının patojen bakterilere karşı etkisinin, artan konsantrasyonla paralel olarak artarak inhibisyon çapının büyüdüğü belirlenmiştir [4].

Sağmal ineklerde mastitis olgusundan izole edilen *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Streptococcus agalactiae* etkenlerine karşı kırmızı zencefilin farklı konsantrasyonlarda ekstraktlarının etkisi araştırılmış, sırasıyla *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus au-*

reus, *Streptococcus agalactiae*'ya etkin bulunduğu bildirilmiştir [24].

Ekwenye ve Elegalam [12]'in zencefil ve sarımsaktan elde ettiği sulu ve etanollü ekstraktların antibakteriyel etkisini *Escherichia coli* ve *Salmonella Typhi* etkenleri üzerinde test ettiklerinde zencefilin sarımsaktan daha etkin bulduklarını ve etanollü ekstraktın ise sulu ekstraktan özellikle *Escherichia coli* üzerinde etkin bulunduğunu göstermişlerdir.

Akintobi ve ark.[6]'nın zencefilden elde ettikleri sulu ve etanollü ekstraktların altı patojen Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri üzerinde antibakteriyel etkisini araştırmışlar ve çalışmada zencefil ekstraktının *Proteus mirabilis*'de en yüksek düzeyde inhibe edici etki gösterirken, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella Typhi* karşı daha az etkin bulunmuş ve *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* karşı antibakteriyel etki belirlenmemiştir.

Anbu Jeba Sunilson ve ark.[9]'nın yaptığı çalışmada zencefil (*Zingiber officinale*), zerdeçal (*Curcuma longa*) ve havlıcan (*Alpinia galanga*) ekstraktlarının *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Clostridium perfringers*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula anomala*, *Mucor mucedo*, *Candida albicans* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal açıdan doğal gıda koruyucu olarak kullanılma potansiyelinin olduğunu ortaya koymuşlardır.

Zencefil (*Zingiber officinale*) ve karabiber (*Piper nigrum*)'in etanol ekstraktlarının *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ve *Proteus* üzerinde in vitro antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirildiği çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* üzerine inhibe edici etki gözlenmediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada zencefil ekstraktının, *Proteus spp.*'de 50-800 µg / ml disk konsantrasyon aralığında ve *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*'da ise 100-800 µg/ml disk konsantrasyonunda duyarlı olduğu rapor edilmiştir [31].

Rawat [25]'in yaptığı çalışmada, *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.* ve *Klebsiella spp.*'ye karşı artan zencefil etanollü ekstraktının miktarına bağlı olarak inhibisyon zon çaplarının arttığını saptamıştır.

Çoklu ilaç direnci gösteren bakterilerden *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* karşı zencefil ve soğandan elde edilen sulu ve etanolü ekstraktların antibakteriyel etkilerinin değerlendirildiği çalışmada ise her iki ekstraktın antibakteriyel etkisi belirlenmiştir [26].

Njobdi ve ark.[22]'nin yaptığı çalışmada kuru ve taze zencefilden hazırlanan ekstraktların antibakteriyel etkisi *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* etkenleri üzerine test edilmiştir. Her iki etkene karşı, taze ve kuru zencefil ekstraktının antibakteriyel etkisi değerlendirildiğinde, *Staphylococcus aureus* karşı diğer bakteriye göre daha etkin olduğu ve aynı bakterilere karşı ise zencefilin taze formunun daha etkin rapor edilmiştir.

Bu çalışmada, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yatan hastalardan izole edilen ve çoğu antibiyotiğe dirençli olduğu bilinen *Acinetobacter baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae* ile Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *Escherichia coli* (ATCC-25922) standart bakteri suşlarına karşı, kuru zencefil ekstraktının antibakteriyel etkisi araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Zencefil Ekstraktının Hazırlanması

Gıda analiz laboratuvarında, kurutulmuş kök halindeki zencefil Sinbo marka parçalayıcıda toz haline getirildi. Daha sonra zencefil ekstraktının eldesi için, toz haline getirilen zencefilden yaklaşık 25 gr örnek alınarak, gıda endüstrisinde kullanımına izin verilen bir yardımcı çözücü olan etanol ile Soxhlet düzeneğinde dört saat boyunca ekstrakte edilmiştir. Bunu takiben Heidolph G3 marka Rotary evaporatör yardımıyla etanolü uçurularak bitkinin ham ekstraktı elde edilmiştir. Balon içerisinde kalan ekstrakt steril endorph tüplerine laminar flow ortamında aktarılmıştır. Tüpler uygulama yapılacağı zamana kadar derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Test Edilen Bakteriler

Bu çalışmada bakteri türleri olarak Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından kullanımı önerilen duyarlılık özelliği bilinen kalite kontrol suşlarından *Staphylococcus aureus* (ATCC-

25923) ve *Escherichia coli* (ATCC-25922) ile hastalardan izole edilmiş, antimikrobiyal direnci olduğu bilinen *Acinetobacter baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae* etkenleri test edilmiştir [11].

Zencefil Ekstraktının Antibakteriyel Aktivitesi ve Duyarlılık Karşılaştırılması

Bakteriyoloji laboratuvarında zencefil ekstraktının antibakteriyel aktivitesini belirlemek için, CLSI'nin standart disk difüzyon metodu kullanıldı. Antibakteriyel duyarlılığı test edilecek olan *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Escherichia coli* (ATCC-25922) ve dirençli olduğu bilinen hastalardan izole edilmiş *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* etkenleri dondurucudan (-20°C) çıkarıldı. Ulusal Mikrobiyoloji Standartlarına göre, Columbia Agar'da (Koyun kanı 5%) (BD Kat. No. 254005) yeniden canlandırılması işlemi için ekimleri yapılarak, 37°C'de 24 saat etüve konuldu. Üreyen bakterilerin kolonilerinden öze ile alınarak 0.5 McFarland (1x10⁸ hücre/mL, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) standart yoğunluğunda olacak şekilde steril %0.9 NaCl solüsyonu içerisinde süspansiyonları hazırlandı. Her bir bakteri için 0.5 McFarland standart yoğunluğundaki süspansiyonları eküvyon yardımı ile üç petri kabında Mueller Hinton agara (Becton Dickinson GmbH Kat. No. 254030) yayıldı. Bakteri süspansiyonu yayıldıktan 15 dk sonra, ilk petri kabına 6 mm çapındaki steril standart boş antibiyotik disklerinden beş adet yerleştirildi. İlk dört diske, 5-10-15 ve 20 µL zencefil ekstraktı, diğerine kontrol için, 10 µL steril %0.9 NaCl emdirilmiş disk yerleştirildi. Diğer bakteri yayılmış petri kaplarına ise, *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *Escherichia coli* (ATCC-25922) için günümüzde kullanılan diğer antibiyotik diskleri olan, ampisilin (10 µg) (AM) sefazolin (30 µg) (CZ), sefuroksim (30 µg) (CXM), meropenem (10 µg) (MEM), ofloksasin (5 µg) (OFX), sulfametoksazol/ trimetoprim (23.75/1.25 µg) (SXT), tetrasiklin (30 µg) (TE), gentamisin (10 µg) (GM) yerleştirildi. *Acinetobacter baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae* etkenleri için meropenem (10 µg) (MEM) yerine kolistin (10 µg) (CL) diski yerleştirildi. Daha sonra tüm petri kapları 24 saat 37°C'de etüvde inkübe edildi. Süre sonunda, disklerin çevresinde inhibisyon zonu alanları mm olarak ölçülerek inhibisyon çapları elde edilerek, etki düzeyleri belirlendi.

Bulgular

Yapılan çalışmada, kuru zencefilin etanollü ekstraktının *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *Escherichia coli* (ATCC-25922) ve hastalardan izole edilmiş olan, dirençli olduğu bilinen *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* üzerinde etkisi test edilmiştir.

Elde edilen bulgularda ekstraktın, test edilen bakterilerden en fazla *Staphylococcus aureus* karşı etkin olduğu saptandı. *Escherichia coli*'nin düşük μL konsantrasyonlarında etkinliği görülmezken, disklere emdirilen en yüksek ekstrakt konsantrasyonu olan 20 μL 'de çok az inhibisyon zonu tespit edildi. *Acinetobacter baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae*'de test edilen ekstraktın herhangi bir etkinliği belirlenememiştir (Tablo 1).

Test edilen bakterilerden *Staphylococcus aureus*'a karşı ekstraktın ihhibe edici etkisi ekstraktın konsantrasyon miktarı ile doğru orantılı olarak artmaktadır.

Yatan hastalardan izole edilen *Acinetobacter baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae* etkenlerine karşı ekstraktın inhibe edici etkisi belirlenememiştir.

Araştırma sırasında farklı sınıflara ait 8 bakteriyel ajan kullanılmıştır. Kaydedilen sonuçlarda; *Staphylococcus aureus*'un (ATCC-25923), *Escherichia coli*'nin (ATCC-25922) test edilen tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu, *Acinetobacter baumannii* test edilen 7 antibiyotiğe direnç gösterirken, gentamisin karşı orta duyarlı olduğu belirlendi. *Klebsiella pneumoniae*'nin kolistin ve ofloksasin duyarlı olduğu saptandı (Tablo 2).

Tablo 1. Kuru zencefilin etanol ekstraktının bakterilerde oluşturduğu inhibisyon çapları

Bakteri	Disklere emdirilen miktar (μL)			
	5 μL	10 μL	15 μL	20 μL
<i>Staphylococcus aureus</i>	7 mm	10 mm	11 mm	15 mm
<i>Escherichia coli</i>	6 mm	6 mm	6 mm	7 mm
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6 mm	6 mm	6 mm	6 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6 mm	6 mm	6 mm	6 mm

Tablo 2. Sentetik antibakteriyellerin bakterilerde oluşturduğu inhibisyon çapları (mm)

Sentetik Antibakteriyeller	İnhibisyon çapları (mm)			
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC-25923)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC-25922)	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Ampisilin	30	17	Ampisilin	6
Sefazolin	38	21.5	Sefazolin	6
Sefuroksim	32	22	Sefuroksim	6
Meropenem	34	32	Kolistin	14
Ofloksasin	28	36	Ofloksasin	16
Sulfamethoxazole /Trimethoprim	30	23	Sulfamethoxazole /Trimethoprim	6
Tetrasiklin	28	23.5	Tetrasiklin	6
Gentamisin	23	21	Gentamisin	14

Tartışma ve Sonuç

Her geçen gün büyüyen sağlık sorunlarıyla ilgili olarak, son zamanlarda mikrobiyal hastalıkları kontrol altına almak için, doğal antimikrobiyallerin etkinliğinin belirlenmesi üzerine çalışmalar artmıştır. Özellikle düşük maliyetli tıbbi bitkilerin içeriğinde bulunan farklı fitoterapötik maddeler nedeniyle, birçok çalışmada antibakteriyel etkilerinin görüldüğü bildirilmiştir [4, 13]. Hatta antibiyotiğe

dirençli bakterilerde dahi tedavi edici etkileri değerlendirilmiştir [19,30]. Aghazadeh ve ark.[3] bazı *Candida* türlerine ve bakteriyel patojenlere karşı zencefil ekstraktının antifungal, antimikrobiyal ve anti-biyofilm özelliklerini inceledikleri çalışmalarında bitkisel özlerin, antibiyotik direnci gelişen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal tedavi için yeni bir dönemi temsil ettiği görüşünü bildirmektedirler. Bitkilerin antimikrobiyal potansiyelinin, tanenlerden, saponinlerden, fenolik bileşiklerden,

uçucu yağlardan ve flavonoidlerden kaynaklandığı düşünülmektedir [2]. Günümüzde antibiyotik tedavisinin sınırlı etkiye sahip olduğu çoklu ilaç direncine sahip suşlara karşı bitki ekstraktlarının, daha etkin olduğu bildirilmektedir [24]. Buna ilave olarak yapılan bir çalışmada bitki ekstraktlarının antibiyotiklerle sinerjik etki gösterdiği bildirilmiştir. Bu sinerjik etki, özellikle bakteriyel direnç problemini çözmede yardımcı olabilecek yeni bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir [28]. Son zamanlarda, bitki antimikrobiallerinin, yalnızca antimikrobiyal özelliklere sahip olmadıkları aynı zamanda ilaçlar ile eşzamanlı olarak alındıklarında, o ilacın etkisini arttırdıkları için sinerjik arttırıcılar olduğu bulunmuştur [15, 16]. Bazı çalışmalarda ise, bitkilerin tedavi edici etkilerinin bileşimlerinde bulunan farklı fitokimyasal maddelerin sinerjik etkisinden kaynaklandığı, bu nedenle bitkisel bileşimlerin antibiyotiklere göre dirençli mikroorganizmalarda daha etkin olduğu rapor edilmektedir [21,27]. Yapılan farklı bir çalışmada, sentetik ilaçlarla fitoterapi karşılaştırıldığında, serbest ajanların stabilitesinde ve biyoyararlanımında fitoterapinin küçük dozlarında bile terapötik etki elde etme olanağı sağladığı vurgulanmaktadır [5]. Zencefil ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesi ve inhibisyon aktivitesi, zencefilin kimyasal özelliklerine bağlanabilir. Zencefilin antibakteriyel etkisini belirleyen ana bileşen uçucu yağlarında bulunan bir terpenoid olan zingiberendir [23]. Auta ve ark.[10]'nın yaptığı çalışmada bizim çalışmamıza benzer olarak zencefil 20 mg/ml etanolik zencefil ekstresinin *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivitesi olduğu bildirilmiştir. Diğer yapılan bir çalışmada, sarımsak ve zencefilin sulu, etanol ve metanollü ekstraktlarının, ilaca dirençli *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Salmonella Typhi*'ye karşı antibakteriyel etkileri üzerine çalışılmıştır. Zencefilin metanol ve etanol ekstraktlarının antibakteriyel aktivitelerinin sulu ekstraktlara göre organik çözücüler içinde çözülen flavonoidler ve uçucu yağ gibi bileşikler nedeniyle daha fazla olduğu, bu nedenle zencefilin sulu ekstraktına göre etanol ekstraktının *Escherichia coli* ve *Shigella* spp. üzerinde maksimum etki göster-

diği rapor edilmiştir [13]. Buna karşın bizim çalışmamızda ise zencefilin etanol ekstraktının en etkin olduğu patojen *Staphylococcus aureus* olarak belirlenmiştir. Kamerun'da bitter kola ve zencefilin antibakteriyel etkinliği ile ilgili yapılmış çalışmada *Staphylococcus aureus* üzerine zencefilin çalışmamızda olduğu gibi antibakteriyel aktivitesi olduğu belirlenmiştir [7]. Karuppiyah ve Rajaram [17]'in sarımsak, karanfil ve zencefil ekstraktlarının antibakteriyel potansiyellerini Gram- pozitif ve negatif çoklu ilaç dirençli bakterilerde belirlemek üzere yaptıkları çalışmada *Enterobacter* sp. ve *Klebsiella* sp. hariç diğer tüm izolatlarda zencefilin 25 µg/mL etanol ekstraktının etkin olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmaya benzer olarak bizim çalışmamızda da, yatan hastalardan izole edilen ve çoğu antibiyotige dirençli olduğu bilinen *Klebsiella pneumoniae* etkenine karşı farklı konsantrasyonlarda uyguladığımız etanol ekstraktının çevresinde kantitatif olarak değerlendirebileceğimiz inhibisyon zon çapı belirleyemedik. *Acinetobacter baumannii* suşlarının üzerine zencefilin farklı üç tür ekstraktının antimikrobiyal aktivitesini belirlemek üzere yapılan diğer bir çalışmada etkenin seftriakson, siprofloksasin, seftazidim, sefotaksim, sefepim ve piperasillin gibi antibiyotiklere dirençli olduğu ve kolistine (%4) karşı düşük dirençli bulunduğu, buna karşın zencefilin kloform ekstraktının aynı ajan üzerine etkin olduğu bildirilmiştir [14]. Yaptığımız çalışmada ise, *Acinetobacter baumannii* test edilen tüm antibiyotiklerin tamamına karşı dirençli iken, *Klebsiella pneumoniae*'nin kolistin ve ofloksasin duyarlı olduğu ve ancak zencefil ekstraktının kullanılan konsantrasyonlarının her iki etkende de etkin olmadığı görüldü.

Sonuç olarak, zencefil ekstraktlarının birçok mikrobiyal hastalıkların tedavisinde büyük potansiyele sahip olduğunu gösteren geniş bilimsel kanıtlar mevcuttur. Çalışmamızda da zencefil ekstraktının etkinliği, disklerin etrafındaki inhibisyon bölgelerinin çapı ölçülerek kantitatif olarak yapılmıştır. Ekstraktın antibakteriyel etkiye sahip olduğu ve ekstrakt miktarına bağlı olarak antibakteriyel etkinin arttığı belirlendi. Bu elde edilen sonuçlara dayanılarak zencefilin bileşiklerini izole etmek ve antimikrobiyal etkisini daha iyi aydınlatmak için yeni çalışmaların yapılması gerektiği düşünüldü.

Kaynaklar

- Abiramasundari.P, Priya V, Jeyanthi GP, and Gayathri DS, (2011). *Evaluation of the antibacterial activity of Cocculus hirsutus*. Hygeia Journal for Drugs and Medicines, 3(2): 26-31
- Aboaba O, Efuwape BM, (2001). *Antibacterial properties of some Nigerian species*. Bio Res Comm. 13:183–188.
- Aghazadeh M, Bialvaei AZ, Aghazadeh M, Kabiri F, Saliani N, Yousefi M, Eslami H, Kafil HS, (2016). *Survey of the antibiofilm and antimicrobial effects of Zingiber officinale (in vitro study)*. Jundishapur J Microbiol. February; 9(2): e30167
- Ahmed SA, Jabbar II, Abdul wahed HE, (2012). *Study the antibacterial activity of zingiber officinale roots against some of pathogenic bacteria*. Al- Mustansiriya J. Sci Vol. 23, No 3.
- Aiyegoro OA, Okoh AI, (2009). *Use of bioactive plant products in combination with standard antibiotics: Implications in antimicrobial chemotherapy*. J Med Plant Res. 3:1147–1152.
- Akintobi OA, Onoh CC, Ogele JO, Idowu AA, Ojo OV, Okonko IO, (2013). *Antimicrobial activity of Zingiber officinale extract against some selected pathogenic bacteria*. Nature and Science 2013;11(1):7-15. (ISSN: 1545-0740) <http://www.sciencepub.net/nature>.
- Akoachere JF, Ndip RN, Chenwi EB, Ndip LM, Njock TE, Anong DN, (2002). *Antibacterial effect of Zingiber officinale and Garcinia kola on respiratory tract pathogens*. East African Medical Journal. Nov; 79(11):588-92.
- Al-Saimary IE, Bakr S, Khudaier B, Abass Y, (2006). *Efficiency of antibacterial agents extracted from Thymus vulgaris l. (lamiaceae)*. The Internet Journal of Nutrition and Wellness. 4(1).
- Anbu Jeba Sunilson J, Suraj R, Rejitha G, Anandarajagopal K, Anita Gnana Kumari AV, Promwicht P, (2009). *In vitro antimicrobial evaluation of Zingiber officinale, Curcuma longa and Alpinia galanga extract as natural food preservatives*. American Journal of Food Technology 4 (5):192:200. ISSN 1557-4571
- Auta KI, Galadima AA, Bassey JU, Olowoniyi OD, Moses OO, Yako AB, (2011). *Antimicrobial properties of the ethanolic extracts of Zingiber officinale (Ginger) on Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa*. Research Journal of Biological Sciences, 6: 37-39.
- Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twentieth Informational Supplement, M100-S20, CLSI, Wayne, PA (2010).
- Ekwenye UN, Elegalam,NN, (2005). *Antibacterial activity of ginger (Zingiber officinale Roscoe) and garlic (Allium sativum L.) extracts on Esherichia coli and Salmonella typhi*. International Journal of Medicine and Advance Science 1 (4): 411-416.
- Gull I, Saeed M, Shaukat H, Aslam SM, Samra ZQ, Athar AM, (2012). *Inhibitory effect of Allium sativum and Zingiber officinale extracts on clinically important drug resistant pathogenic bacteria*. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 11: 8. Published online 2012 Apr 27. DOI: 10.1186/1476-0711-11-8.
- HassasYeganeh S, Doost SRH, Goudarzi M, (2018). *Antimicrobial effects of Zingiber officinale extracts against multi-drug resistant Acinetobacter baumannii clinical isolates recovered from hospitalized patients in ICU*. Journal of Paramedical Sciences (JPS) Summer Vol 9, 42-48. No3. ISSN 2008-4978.
- Jouda MM, Elbashiti T, Masad A, (2016). *The antibacterial effect of some medicinal plant extracts and their synergistic effect with antibiotics*. Advances in Life Science and Technology. www.iiste.org ISSN 2224-7181 (Paper) ISSN 2225-062X (Online) Vol.46.
- Jouda MM, Elbashiti T, Masad A, Albayoumi M, (2016). *The antibacterial effect of some medicinal plant extracts and their synergistic effect with antibiotics*. World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences, Volume 5, Issue 2, 23-33.
- Karuppiyah P, Rajaram S, (2012). *Antibacterial effect of Allium sativum cloves and Zingiber officinale rhizomes against multiple-drug resistant clinical pathogens*. Asian Pac J Trop Biomed; 2(8): 597-601.
- Khameneh B, Diab R, Ghazvini K, Fazly Bazzaz BS, (2016). *Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them*. Microb Pathog. 95:1–11.
- Koutsaviti A, Milenković M, Tzakou O, (2011). *Antimicrobial activity of the essential oil of Greek endemic Stachys spruneri and its main component, isoabienol*. Nat Prod Commun. 6:277–80.
- Marcello S, (2001). *The psychopharmacology of herbal medications: plant drugs that alter mind, brain, and behavior*. The MIT Press, Cambridge, UK. <http://dx.doi.org/10.1021/np0007731>
- Mohd Nazri NAA, Ahmat N, Adnan A, Syed Mohamad SA, Syaripah Ruzaina SA, (2011). *In vitro antibacterial and radical scavenging activities of Malaysian table salad*. African Journal of Biotechnology, 10:5728-5735.
- Njobdi S, Gambo M, Ishaku GA, (2018). *Antibacterial activity of Zingiber officinale on Escherichia coli and Staphylococcus aureus*. Journal of Advances in Biology & Biotechnology. 19(1): 1-8, Article no.JABB.43534. ISSN: 2394-1081
- O'Hara M, Keifer D, Farrel K, Kemper K, (1998). *A review of 12 commonly used medicinal herbs*. Archives. Fam. Med. (7)523'536.
- Poeloengan M, (2011). *The effect of red ginger (Zingiber officinale Roscoe) extract on the growth of mastitis causing bacterial isolates*. African Journal of Microbiology Research Vol. 5(4), pp. 382-389, 18 February. Available online <http://www.academicjournals.org/ajmr> DOI: 10.5897/AJMR10.776 ISSN 1996-0808 ©2011 Academic Journals
- Rawat S, (2015). *Evaluation of synergistic effect of ginger, garlic, tumeric extracts on the antimicrobial activity of drugs against bacterial patogens*. International Journal of

- Biopharmaceutics. 6(2): 60-65. e- ISSN 0976 – 1047. Print ISSN 2229 – 7499. Journal homepage: www.ijbonline.com
26. Sable MG, Puttewar TY, Patil RY, (2014). *Investigation of antibacterial activity of Allium cepa (onion), Zingiber officinale (ginger)*. International Journal of Current Research Vol.6, Issue, 09, pp.8768-8778, September. ISSN:0975-833X.
 27. Shanthi Sree KS, Yasodamma N, (2010). *Paramageetham CH, phytochemical screening and in vitro antibacterial activity of the methanolic leaf extract: Sebastiania chamaelea Müell.* The Bioscan, 5:173-175.
 28. Sibanda T, Okoh AI, (2007). *The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents.* Afr J Biotechnol. 6:2886–2896.
 29. SivasothyY, Chong WK, Hamid A, Eldeen İM, Sulaiman SF, Awang K, (2011). *Essential oils of Zingiber officinale var. rubrum Theilade and their antibacterial activities.* Elsevier Food Chemistry 124 , 514–517. Journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem
 30. Stefanello MÉ, Pascoal AC, Salvador MJ, (2011). *Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties.* Chem Biodivers. 8:73–94. doi: 10.1002/cbdv.201000098.
 31. Taura D W, Lawan S, Gumel S M, Umar S, Sadiu UF, (2014). *Antibacterial activity of ethanolic extract of Zingiber officinale and Piper nigrum against some clinical isolates.* Communications in Applied Sciences ISSN 2201-7372 Volume 2, Number 1, 52-64.
 32. Ungvarsky J, (2017). *Ginger (Zingiber officinale)*. Salem Press Encyclopedia, © 2017 by Salem Press, Inc., A Division of EBSCO Information Services, Inc.
 33. <http://lokman-hekim.net/bitkiler/zencefil.asp> (Erişim Tarihi:02.03.2019)

***Brucella abortus* S-19 Aşıasının Liyofilizasyon Öncesi Farklı Liyoprotektanlar ile Kritik Formülasyon Sıcaklıklarının Araştırılması**

Mustafa Sencer Karagül¹, Buket Erođlu²

¹ Kocaeli Üniversitesi Kartepe Atçılık Meslek Yüksekokulu, Kocaeli

² Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, İstanbul

Geliş Tarihi / Received: 14.04.2019, **Kabul Tarihi** / Accepted: 30.05.2019

Özet: Bu çalışmada, *Brucella abortus* S19 aşı şuşu ile liyoprotektan karışımlarının termal analizi yapılarak kritik formülasyon sıcaklıklarının belirlenmesi, karşılaştırılmalı sonuçlar ile liyofilizasyon optimizasyonu için istifade edilebilecek bilgilere ulaşılması amaçlanmıştır. S19 aşısı ile 3 farklı liyoprotektan (mannitol, sukroz, trehaloz) 3 farklı konsantrasyonda (%5, %10, %15) kullanılarak 9 farklı formülasyonun analizi termal görüntüleme cihazı olan dondurarak kurutma mikroskopu (FDM) ve Diferansiyel Termal Analiz (DTA) ile elektriksel direnç (Zsin) analizini sağlayan termal analiz cihazı ile yapılmıştır. Termal analiz ve görüntüleme cihazların kullanımıyla elde edilen kritik formülasyon sıcaklıkları ile liyoprotektan tercihi ve konsantrasyonu arasındaki ilişki araştırılmıştır. Aşı yarı mamulü ile liyoprotektantan oluşan formülasyon içeriğinde liyoprotektan değiştirildiğinde formülasyonun kritik sıcaklık değerinde de kayda değer farklar, gözlenmiştir. Her liyoprotektanın farklı konsantrasyonda kullanımında ise kurutma prosesinin yeni baştan dizayn edilmesini gerektiren farklar tespit edilmemiştir. Sonuç olarak çalışma sonucunda elde edilen bulguların gelecek çalışmalar için oluşturulmuş temel bir reçete üzerinden protektan madde konsantrasyonunun arttırılarak yapılacak liyofilizasyon proseslerinin yürütülmesi ile verim ve stabilitenin arttırılabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *B. abortus* S-19, Liyofilizasyon, Liyoprotektan, Termal Analiz.

Investigating the Critical Formulation Temperatures of *Brucella Abortus* S-19 Vaccine With Different Lyoprotectants Prior to Lyophilisation

Abstract: The aim of this study is to determine the critical temperatures of formulations composed of *Brucella abortus* S19 vaccine strain and lyoprotectants. It also attempts to obtain the necessary information that may be beneficial for the optimization of lyophilisation process by the help of comparative results among formulations. Thermal analysis of 9 different formulations consisting of S19 strain and each of 3 lyoprotectants (mannitol, sucrose, trehalose) at 3 different concentrations (5%, 10%,15%) was carried out by freeze drying microscopy (FDM), differential thermal analysis (DTA),and electrical impedance (Zsin) analysis. Correlations between lyoprotectant choice and lyoprotectant concentration were investigated by the help of critical formulation temperatures obtained through thermal analysis and screening instruments. Significant differences in the critical temperature of vaccine with lyoprotectant formulation were observed when a different lyoprotectant was used. However, differences that require the redesign of the whole drying process were not observed at the different concentrations of the same lyoprotectant. In conclusion, in the guide of a baseline recipe, evaluation of the lyophilisation process carried out through increasing the amount of lyoprotectant can be recommended to increase stability and performance.

Key words: *B. abortus* S-19, Lyophilisation, Lyoprotectant, Thermal Analysis.

Giriş

Liyofilizasyon, endüstrinin ve bilimin farklı dallarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyolojik materyallerin preservasyonundaki kullanımı da kayda değer seviyededir. Bu bağlamda liyofilizasyon, özellikle liyofilize formdaki zayıflatılmış aşıların üretim zincirinde önemli bir basamağı oluşturmaktadır. Liyofilizasyon basamaklarının, liyofilize edilecek ürünün formülasyon özelliklerine göre oluş-

turulması, üretim zincirindeki diğer basamaklar ile aynı seviyede önem taşımaktadır. Bir liyofilizasyon döngüsünün oluşturulmasında birincil ve en önemli basamak formülasyonun karakterize edilmesidir [11]. Formülasyonların, prosese bağlı ürün kusurlarını önlemek adına soğutulduğu ve birincil kurutma süresince aynı düşük sıcaklık derecesinin korunduğu kritik bir sıcaklığı bulunmaktadır [22]. Söz konusu kritik sıcaklıklar amorf ürünler için kollaps-çökme sıcaklığı (Tc) veya cam geçiş sıcaklığı (Tg') ve

kristalin yapılar için ötektik (Teu) erime noktasıdır [8,12]. Tc değeri materyalin yumuşayarak yapısını koruyamadığı sıcaklık noktasıdır. Çözünen materyalin eridiği ve çözücü ayrıldıktan sonra herhangi bir yapının oluşmadığı sıcaklık noktası da “Teu” olarak tanımlanmaktadır. “Tg” ise donmuş materyalin kırılma formu yitirip esneklik kazandığı sıcaklık değeridir [22]. Formülasyonların kritik sıcaklık değerleri, ürüne ait hassas özellikler arasında temel noktada bulunmaktadır.

Liyofilize bir formülasyon çok farklı yardımcı maddeler içerebilmektedir [26]. Liyofilizasyonda tercih edilen liyoprotektan gibi bazı yardımcı maddelerin hem dondurma hem de kurutma basamaklarında stabilizasyon sağladıkları paylaşılmıştır [17]. Liyoprotektan gibi ara maddeler, kimyasal olarak hassas biyoaktif bileşenler için koruma sağlayabilmektedirler [7]. Trehaloz, sukroz ve maltoz gibi dissakaridlerin, dondurma ve kurutmada stabilizasyon sağlayabildikleri bildirilmiştir [17]. Sukroz gibi sakkaridler genellikle suyun uzaklaşmasından kaynaklı denatürasyona karşı protein konformasyonunu korumak için kullanılmaktadır. Dissakarid ajanlar haricinde mannitol ise hacim arttırıcı olarak formülasyonlarda sıklıkla kullanılmaktadır [11,23]. Mannitol ayrıca sahip olduğu yüksek Teu değeri ile birincil kurutmanın kolay ve hızlı olmasını sağlamaktadır [26]. Hacim arttırıcı ajanlar, toplam katı içeriğini arttırarak mekanik olarak daha dirençli bir ürün dolgusu oluşturmak için kullanılmaktadır [8]. Prosesin birinci basamağı olan dondurmanın kontrolü ürün kalitesi ve prosesi optimize etmek adına son derece önemlidir [13]. Bu bakımdan dondurma prosesinin, reçeteye dökülmesinde ürüne ait kritik sıcaklıkları temsil eden Teu, Tc ve Tg’ değerlerinin göz önünde bulundurulması çok önemlidir [6]. Söz konusu kritik formülasyon sıcaklıkları, tercih edilen yardımcı ajanlara göre farklılık gösterebilmektedir. Liyofilizasyon döngüsünü tam olarak optimize etmek için en önemli yol, sublimasyon devam ederken formülasyonun ürün sıcaklığını “kritik sıcaklığına” yakın fakat aşmayacak seviyede kontrol etmektir. Bu amaçla yardımcı maddelerin ve final formülasyonun termal davranışını belirlemek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. En sık kullanılan teknikler FDM ile DTA ve/veya Zsin analizleridir [18]. Formülasyonun fiziko-kimyasal halinden kaynaklı olarak prosesin uygulama sıcaklığı,

aşılması gereken maksimum müsaade edilebilir ürün sıcaklığı ile sınırlıdır. Bu sıcaklık, “kritik formülasyon sıcaklığı” olarak tanımlanmaktadır [15]. Dondurarak kurutma prosesi için kurutulacak formülasyonların kritik parametrelere göre analiz edilmesi gereklidir. Tc değeri sıklıkla FDM ile tespit edilmektedir [9,10]. Bu amaçla değişken sıcaklık ve vakum altında kurumakta olan ürüne ait numunenin gözlemlenmesine izin veren FDM cihazı ile kritik formülasyon sıcaklıkları belirlenebilmektedir [8]. Tg’ analizi için kullanılan DTA ise, bir örneğin ve bir referansın (genellikle örneği hazırlamak için kullanılan su ile aynı standartta) birebir aynı koşullarda soğuma ve ısınmasını içeren, bu esnada ürün ve referanstaki sıcaklık değişimlerini gözlemleyerek bu gözlemi sıcaklık veya zaman işlevi içinde grafiklendiren bir teknik olarak tanımlanmaktadır [27]. DTA analiz cihazı, DTA ve Zsin analiz kabiliyetini beraber taşımaktadır [21]. Termal analiz ve görüntüleme cihazlarının etkin seviyede kullanımı proses geliştirilmesinde ve araştırma-geliştirme çalışmalarında zaman tasarrufu ve maliyet düşüşü sağlayabilecektir.

Liyofilizasyon genellikle zaman alıcı bir süreçtir ve özellikle optimum döngü koşulları tasarlanmadığı zaman gereksiz yere daha uzun birincil kurutma sürelerine ihtiyaç duyulmakta ve dolayısıyla daha masraflı bir işleme dönüşebilmektedir [12,18]. Uygun liyofilizasyon reçetesinin oluşturulması ve sonraki basamaklara devam edilmesi formülasyonun kritik sıcaklık parametrelerindeki gerekliliklere riayet edilmesine bağlıdır. Bu bakımdan liyofilizasyon işlemine başlamadan önce dondurma ve kurutma basamakları tasarlanırken kesinlikle prosese maruz kalacak ürün özellikleri ve solut-solvent muhteviyatı ile konsantrasyonu göz önünde bulundurulmalıdır.

Zoonoz bir hastalık olan bruselloz, sığırlarda yavru atmaya yol açarak ekonomik kayıplara neden olmakta, hayvan ve toplum sağlığı için de risk oluşturmaktadır. Bu çalışmanın amacı sığır brusellozuna karşı kontrol ve eradikasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan S19 aşısına ait kritik formülasyon sıcaklıklarını farklı liyoprotektanlar kullanılarak belirlemektir. Elde edilen veriler, S19 aşısı için liyobilizasyon kaybını azaltan ve stabiliteyi artıran uygun liyofilizasyon reçetelerinin kurgulanması için basamak oluşturmaktadır.

Materyal ve Metod

Kullanılan aşı suşu ve liyoprotektanlar: Bu çalışmada, *B. abortus* S19 aşı suşu ve 3 farklı liyoprotektan kullanılmıştır. S-19 aşı suşu üretimi Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Brusella Referans ve Aşı Üretim Laboratuvarında S-19 ana tohum suşundan (ATS-PVKEA-13-04) yapılmıştır. Sukroz (Cas No: 57-50-1), Trehaloz (Cas No: 6138-23-4) ve Mannitol (Cas No:69-65-8) her biri %5, %10 ve %15'lik konsantrasyonda kullanılmıştır.

Kullanılan Termal Analiz ve Görüntüleme Cihazları (FDM, DTA): Termal görüntüleme ve analiz için FDM ve DTA cihazları kullanılmıştır.

B. abortus S-19 aşı yarı mamulü ile liyoprotektanların birleştirilmesi: Ana tohum suşundan pasajlanan çalışma tohum suşu ile biyoreaktörde aşı suşu üretimi yapılmıştır. Biyoreaktörde üretilen S-19 aşı yarı mamulünün konsantrasyon işlemi sonrası, seyreltme yöntemiyle canlılık sayımı yapılarak, yarı mamulün bakteri yükü 1410×10^9 kob/ml olarak tespit edilmiştir [2]. Üretim sonrası canlılık sayımı ile bakteri yükü (kob/ml) belirlenmiş olan yarı mamul aşı ürünü her bir liyoprotektanın farklı konsantrasyonları ile seyreltilerek final yarı mamul aşı ürünü oluşturulmuştur. Her bir konsantrasyondaki liyoprotektanlar ile aşı bulk ürünü, 9,4 kat sulandırılarak, formülasyonun S-19 şuş yükü 150×10^9 kob/ml olarak düzenlenmiştir.

Kritik formülasyon sıcaklıklarının tespit edilmesi (FDM, DTA, Zsin): FDM ile numunelerin çalışması sırasında, 16-20 mm çapında ince bir cam slayt dondurarak kurutma aşamasının gerçekleşeceği gümüş blok üzerine yerleştirildi. Örnek çözeltinin yaklaşık 2 µl'si her deney sırasında bu cam slayt üzerine konulup, daha ince ve daha küçük (10-13 mm) bir cam slayt, numune damlacığının üstüne yerleştirildi [16]. Numunenin analizi için cihaza bağlı bilgisayarda tanımlanmış bir sıcaklık profili seçildi. Bu profile göre 20 °C/dk'lık soğutma ivmesi ile ürün -40 °C'ye ulaştırıldı. Bu sıcaklık noktasına ulaşana kadar 60 saniye aralıklarla cihazın kamerası ile örnek görüntüsünün resmi çekildi. Ardından vakum pompası devreye alındı. Numune, çökme noktası boyunca bir 1°C/dk düşüş hızı kullanılarak ısıtılmış ve bu süre boyunca süblimasyon ara yüzeyindeki yapı kayıplarının durumu (boşluklar, delikler, çatlaklar, vb.) incelenerek kollaps sı-

caklığı belirlenmiştir [16]. Isıtma aşamasında her 5 saniyede bir otomatik olarak mikroskoptaki görüntünün resmi çekilerek, üründeki termal değişim kısa zaman aralığında çekilen resimlerin gözlemlenmesi ile değerlendirilmiştir.

Zsin ve DTA analizinde, referans ve numunenin sıcaklığa karşı hem solüsyon impedansı hem de solüsyon donarken, erirken veya yumuşarken ki ekzotermik ve endotermik değişiklikler DTA analizi ile grafiklendirilir [3]. Zsin ve DTA analizi, her bir numune (3ml) üzerinde aynı anda gerçekleştirilmiştir. Örnek ve referans malzeme paslanmaz çelik örnek hücrelerine konularak, cihaza ait sıvı nitrojen tankı ile 100 °C'nin altına soğutulmuş ve ardından örnek taşıyıcı hücreler tanktan yukarı alınarak ısıtma işlemi başlatılmıştır ve tüm problemler 0°C'nin üzerini gösterene kadar örnekler ısıtılmıştır. Her bir örnek hücresinde yer alan problemler sayesinde termal değişikliklere ve iyonik hareketliliğin artmasına bağlı olarak, solüsyonlarda meydana gelen önemli olayların sıcaklıklarının belirlenmesi, ısınma profilinin yorumlanması ve çizilmesi için ham veriler doğrudan excel dosyasına aktarılmıştır [3].

Bulgular

Çalışma için seçilen liyoprotektanların ve aşı yarı mamul ürünü ile liyoprotektan birleşimi olan formülasyon numunelerinin 3 tekrarlı olarak yapılan analizlerin ortalama sonuçları Tablo-1'de listelenmektedir.

Aşı yarı mamulü ilavesi öncesi yapılan analizlerde farklı konsantrasyonlardaki salt sukroz, trehaloz ve mannitol solüsyonları arasında FDM cihazında kollaps sıcaklığı olarak elde edilen sıcaklık dereceleri arasında sırasıyla en yüksek 1,1; 0,5 ve 0,2°C fark olan, birbirine çok yakın sıcaklık noktaları tespit edilmiştir. Aynı numunelerin DTA ve Zsin analiz sonuçları FDM de tespit edilenlerden daha düşük sıcaklık noktaları olmuştur. Farklı konsantrasyonlardaki salt sukroz solüsyonlarına ait DTA ve Zsin analiz sonuçlarının kendi arasındaki en büyük fark ise sırasıyla 4,62 ve 2,71°C olarak bulunmuştur. Bu sıcaklık farkı trehaloz örnekleri için sırasıyla 1,58 ve 1,53 olarak mannitol örnekleri için 1,14 ve 0,67°C olarak belirlenmiştir. Mannitolün, Zsin ve DTA analizi sonucu elde edilen kritik sıcaklıklar Grafik-1'de yer almaktadır. Sukroz ve trehaloz göre daha yüksek sıcaklık noktaları tespit edilmiştir.

Tablo-1: Numunelerin FDM, Zsin ve DTA analizlerinde elde edilen kritik formülasyon sıcaklıkları.

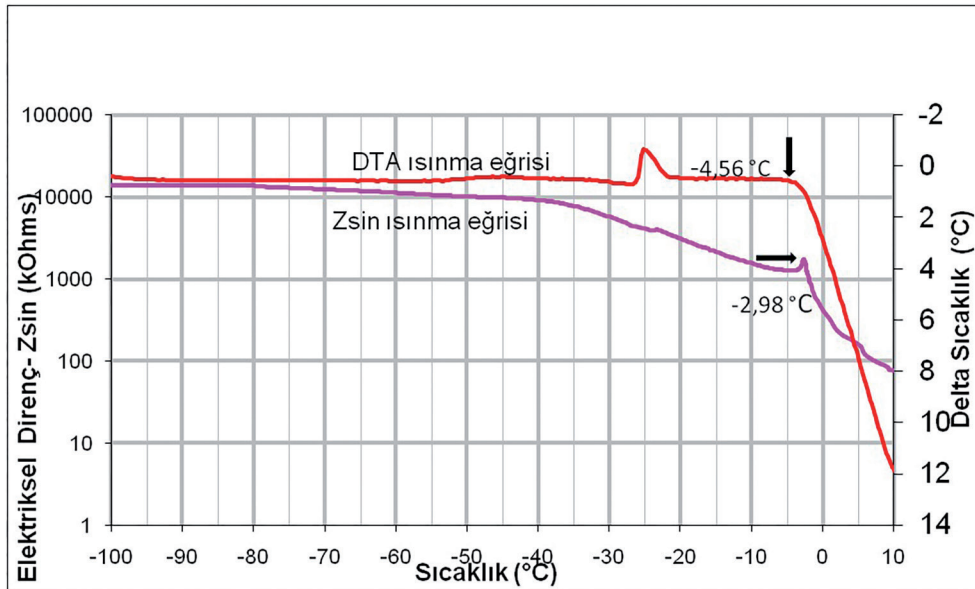
Numune	FDM (°C)	Zsin (°C)	DTA (°C)
Sucrose%5	-32,1	-37,22	-36,64
Sucrose%10	-31,1	-34,51	-37,72
Sucrose%15	-30,9	-36,88	-33,10
Sucrose%5 + S19	-30,96	-	-31,4
Sucrose%10 + S19	-31,73	-	-33,6
Sucrose%15 + S19	-30,75	-	-35,21
Trehalose%5	-27,27	-36,97	-32,33
Trehalose%10	-28	-38,5	-32,43
Trehalose%15	-27,5	-38,2	-30,85
Trehalose%5 + S19	-28,23	-	-32
Trehalose%10 + S19	-27,40	-	-33,25
Trehalose%15 + S19	-26,53	-	-31,73
Mannitol%5	-1,6	-3,35	-3,42
Mannitol%10	-1,4	-2,68	-4,13
Mannitol%15	-1,5	-2,98	-4,56
Mannitol%5 + S19	-5	-	-6,9
Mannitol%10 + S19	-4,5	-	-6,32
Mannitol%15 + S19	-2,8	-	-6,43

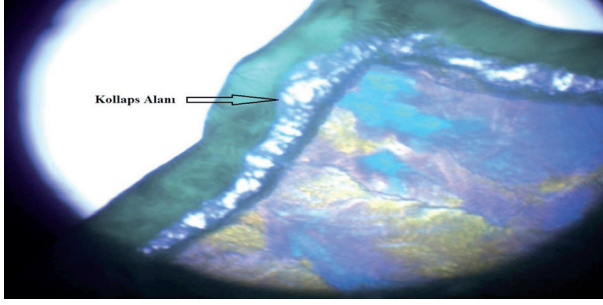
Aşı yarı mamulü ilavesi sonrası yapılan analizlerde aşı ürünü ile beraber farklı konsantrasyonlarda sukroz, trehaloz ve mannitol içeren formülasyonların kendileri arasında konsantrasyon farkına

bağlı FDM cihazında kollaps sıcaklığı olarak elde edilen sıcaklık değerleri arasında sırasıyla en yüksek 0,98, 1,7 ve 2,2°C fark olan, birbirine çok yakın sıcaklık noktaları tespit edilmiştir. Resim-1'de %15 Sukroz+S19 aşı formülasyonunda meydana gelen kollaps, FDM cihazında -30°C'de rahatlıkla gözlenmektedir.

Aynı örneklerin DTA analiz sonuçları FDM de tespit edilenlerden daha düşük sıcaklık noktaları olmuştur. Formülasyon örneklerinin Zsin eğrileri değerlendirilmemiştir. Farklı konsantrasyonlardaki sukroz solüsyonları ve aşı ürünü ile beraber hazırlanmış formülasyon örneklerine ait DTA analiz sonuçları arasındaki en büyük fark ise 3,81°C olarak bulunmuştur. Bu sıcaklık farkı trehalozun yer aldığı formülasyon örnekleri için 1,53 olarak mannitol için ise 0,58 olarak belirlenmiştir. S19 aşı suşu ile sukroz, trehaloz, mannitol solüsyonlarından hazırlanan formülasyon numunelerinin FDM ile DTA analizleri arasındaki en büyük sıcaklık farkları sırasıyla 4,46; 5,6 ve 3,68°C olarak gözlenmiştir.

Aşı ürünü ile birleştirilmemiş liyoprotektan solüsyonlarının FDM, DTA ve Zsin analizlerinde ve aşı ürünü ile liyoprotektan karışımı sağlanmış formülasyon örneklerinin FDM ve DTA analizlerinde konsantrasyon artışına bağlı kritik sıcaklıklarda çok büyük değişimlerin olmadığı gözlenmiştir.

**Grafik 1.** %15 Mannitole ait DTA ve Zsin analiz sonuçları.



Resim 1. %15 Sukroz + S19 aşı formülasyonu için kollaps alanı (-30 C°).

Tartışma ve Sonuç

Liyofilizasyonda kullanılan yardımcı maddelerin kristalizasyon davranışlarını yansıtan Tc ve Tg' değeri liyofilizasyon prosesinin geliştirilmesinde dikkate alınan önemli fizikokimyasal karakterlerdir [10]. FDM görüntüleme sonuçları değerlendirildiğinde, aşı yarı mamulü ve farklı konsantrasyonlardaki yardımcı ajanlar ile standart bir dilüsyon oranına göre hazırlanmış formülasyonlarda kollapsın veya erimenin gözlemlendiği sıcaklıklar arasında majör farklılıklar gözlenmemiştir. Sukroz için farklı çalışmalarda Tc değeri -32°C [8,19] ve Tg' -28°C [4,14] olarak belirtilmektedir. Trehaloz için -28°C [13] ve -30°C [18] Tg' ve -29°C ise Tc [1] değeri olarak paylaşılmıştır. Mannitol ise -3°C olan daha yüksek bir Teu değerine sahiptir [24]. Paylaşılan bu sıcaklık değerleri ile FDM analizinden elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında sukroz, trehaloz ve mannitolde konsantrasyon artışına rağmen sırasıyla en fazla 1,75; 2,47 ve 2°C sıcaklık değişimleri gözlemlenmiştir. Birincil kurutma süresince sıcaklığın kritik proses sıcaklık değerlerini aşmamak üzere azami seviyede yüksek tutulması gerekmektedir. Birincil kurutmayı takiben ikincil kurutmada sıcaklığın yükseltilmesi, üründen donmuş kısım uzaklaşmadığında erimeye neden olabilir. Birincil kurutmanın bitiş sıcaklık noktasının tayini bu açıdan çok büyük önem taşır [8]. Bu açıdan tespit edilen sıcaklıklar birinci kurutmada optimum hedef sıcaklığının belirlenmesinde sağlayacakları yardımdan ötürü kayda değer sonuçlardır.

FDM sonuçları görüntüleme cihazında elde edilen resimlerin değerlendirilmesi sonucu kayıt edilmiştir. Böylece FDM de tespit edilen Tc sıcaklığının başlangıç veya tam kollaps işaret edebildi-

ği paylaşılmıştır. Aynı zamanda FDM cihazının başlangıç kollapsının belirlenmesinin subjektif bir değerlendirme temeline dayanmakta olduğu belirtilmiştir [10]. Bizim yaptığımız analizlerde gözlem kriteri olarak kollaps hattında göz ile rahatlıkla seçilebilen başlangıç noktalarını temel aldık. Bu sonuçlar reçete oluşturulmasında sadece kollaps ve erime sıcaklıkları temel alındığında yardımcı madde konsantrasyon artışına bağlı majör varyasyonlar içermeyen sıcaklık aralıklarının kullanılabileceği göstermektedir. Görsel olarak bir kollapsı gözlemlene olasığının mikroskopun ışık kaynağı ve polarizasyon filtresi ile sınırlı olduğu da unutulmamalıdır [15].

Aşı yarı mamulü ile yardımcı madde formülasyonlarında DTA eğrilerinde görülen pik noktaları farklı konsantrasyonlarda dahil olmak üzere FDM cihazında tespit edilen kollaps sıcaklıklarından daha düşük sıcaklıkları işaret etmektedir. DTA analizinde gözlemlenen ekzotermik pikler donmuş materyal içinde stabilizasyon ve yeniden düzenlemeyi göstermektedir [3]. Bir diğer çalışmada benzer olarak ürün Tc değeri -18,6; -17,4 olarak tespit edilmişken DTA cihazı ile aynı ürün için impedans analizine göre -25 derecede ürün formunda bir yumuşama gözlenmiştir [22]. Ayrıca aynı liyoprotektan ve konsantrasyon için Tc ile Tg' ve Teu sıcaklıkları arasındaki söz konusu tespit edilen farklar için cihazlar arasında çalışma prensibi ve sonuçların değerlendirme metodu farklılığının göz önünde bulundurulması tavsiyesi ortaya konulabilmektedir.

Tc ve Tg', her iki değer de ürün sıcaklığının (Tp) üst limitini belirlemeye yardımcı olmaktadır. Tc değerleri genellikle 1-3°C Tg' değerinin üstünde olduğu ve Tc değerinin üzerinde bir kurutmanın makrokollaps ile sonuçlanabileceği belirtilmiştir [10]. Bir başka yayında ise Tg' ve Tc aynı deneysel parametreleri temsil etmedikleri açıklanmış ve Tc değerlerinin genellikle ilişkili Tg' değerlerinden 2-5°C daha yüksek olduğu raporlanmıştır [15]. Bizim çalışmamızda bahsedilen yayın sonuçlarındaki benzer sıcaklık farkları gözlemlenmiştir. Bu sıcaklıkların aşı yarı mamulü ile yardımcı madde karışımlarında devam ediyor olması, reçete dizaynı açısından göz önünde bulundurulması faydalı bir bulgudur. Zira gözlemlenen Tc ve Tg' değerleri arasındaki korelasyonun yorumlanmasını kolaylaştırabilir. Tg değeri için unutulmaması gereken nokta

Tg' nin bir sıcaklık aralığı olduğu ve tek bir sıcaklık noktası olmadığıdır [15].

Dondurarak kurutma uzun sürmesi nedeni ile oldukça pahalı bir proses olduğu için proses gelişiminde, en uzun süren birincil kurutma süresinin asgariye indirilmesi anahtar rol oynar. Fakat buzun tamamı üründen uzaklaşmadan ikincil kurutma aşamasında kollaps sıcaklığının üzerinde ürün sıcaklığındaki artış büyük olasılıkla kollaps veya ötektik erimeye neden olmaktadır [12,20]. Bu açıdan *B. abortus* S19 aşılarının liyofilizasyonunda, çalışmamızda tespit edilen kritik sıcaklıklarının, göz önünde bulundurularak sıcaklığın yükseltilmesi kollaps veya ötektik erimeyi önleyebileceği öngörülebilmektedir.

Çalışma sonucunda FDM cihazı ile Tc ve DTA ile de Tg' veya Teu belirlenmiştir. Tg' değerinde ama Tc'nin altında kurutma yüksek konsantrasyondaki protein formülasyonları için kullanılabilir [10]. Sukroz ve trehaloza kıyasla aşı yarı mamul ürünü ile mannitol karışımı için elde ettiğimiz daha yüksek ötektik sıcaklık değerleri liyofilizasyon reçetesinin oluşturulması daha geniş güvenli sıcaklık aralıkları sunabileceğine işaret edebilmektedir. Kristalin mannitolun, tek başında -40°C'de sukrozda gerçekleşen kollapsı, beraber kullanıldığında -10°C kuruyan sukroz yapısında önlediği bir raporda paylaşılmıştır [23]. Çalışmamızda gerek FDM ile gözlemlenen Tc ve gerekse DTA ile elde edilen Tg' veya Teu değerlerinde konsantrasyon değişikliğine bağlı yüksek sıcaklık farkları gözlenmemiştir. Benzer bir çalışmada da farklı konsantrasyonlardaki (%5, %10, %20) sukroz ve trehaloza ait DSC (Diferansiyel Taramalı Kalorimetri) analizlerinde belirlenen Tg' değerinde 1°C'den daha az sıcaklık farklılıkları gözlenmiştir [10]. Bu nedenle tercih edilecek protektan ajanın belirli seviyedeki yüksek konsantrasyonlarının kullanımı halinde bile çalışma numuneleri ve izlenen metoda göre prosesin yakın kritik sıcaklıklarda sürdürülebileceği düşünülmektedir. Bu sayede daha fazla koruyucu ajan ile ürünün çevrenmesinin sağlanabilmesi liyofilizasyon kaybını azaltan bir avantaj sağlayabilecektir. Zira mevcut uygulamada ürün güvenliği ve kalitesi adına proses dizaynı, ürün sıcaklığı için 2-5°C'lik bir güven aralığı ile ilişkili olarak belirlenmektedir. Bu aralık üretim hacminin yükseltilmesinde, teknoloji transferinde ve farklı liyofilizator kullanımında

küçük değişikliklere olanak sağlamaktadır [17,27]. Liyofilizasyon başından sonuna kadar bağlantılı bir proses olarak yorumladığımızda konsantrasyon artışının ikinci kurutma için de etkisini değerlendirmek gerekebilir. Sıklıkla birincil kurutma sırasında üründe kollaps oluşma ihtimali ikincil kurutmaya kıyasla daha fazladır [5]. Çünkü birincil kurutma sonrası ürün içeriğinde su miktarı daha düşük seviyelerde bulunmaktadır. Fakat ikincil kuruma koşulları ayrıca çözünen maddenin konsantrasyonuna bağlıdır. Çözünen maddenin konsantrasyonu yüksek olduğunda, emilen suyun çıkarılması daha zor hale geldiğinden, ikincil kurutma daha uzun zamanda veya daha yüksek sıcaklıkta gerçekleşir [6]. Bu nedenle protektan ajanın daha konsantre halde kullanılması dolaylı olarak ürün-protektan formülasyonun katı madde içeriğini yükselteceği için liyofilizasyon prosesi verimliliğini ve sürdürülebilirliğini olumsuz yönde etkileyebilir.

Dondurarak kurutma prosesinde ölü veya canlı organizmalar, enzimler, hormonlar, organ ekstraktı gibi materyaller, hassas biyolojik materyaller olarak kabul edilmiştir. Kurutmada zorluklara neden olan preperasyonlara örnek olarak da aşilar gösterilmiştir [25]. Bu açıdan çalışmamızda elde edilen sonuçlar, *Brucella abortus* S19 aşı suşu temel alınarak liyofilize aşılarda reçete optimizasyonu için daha geniş güvenli kurutma sıcaklık aralığını sağlayacak liyoprotektanın seçimi ve bu ajanın konsantrasyonunun belirlenmesi yönünde temel bir basamak oluşturmuştur.

Kaynaklar

1. Adams GDJ, Cook I, Ward KR, (2015). *The Principles of Freeze-Drying*. WF Wolkers, H Oldenhof eds. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Springer, New York. p.121-143.
2. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM, (1988). *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
3. Bandari S, Seshasai M, Reddy YRC, (2013). *Optimization Of Lyophilization Cycles for Gemcitabine*. Int J Pharm Pharm Sci. 5(2), 216-221.
4. Carpenter JF, Pikal MJ, Chang BS, Randolph TW, (1997). *Rational Design of Stable Lyophilized Protein Formulations: Some Practical Advice*. Pharm Res. 14(8), 969-975.
5. Day JG, Stacey GN, (2007). *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, Human Press, New Jersey.
6. Deepak B, Iqbal Z, (2015). *Lyophilization-Process and Optimization for Pharmaceuticals*. IJDR. 3(1), 30-40.

7. Franks F, (2007). *Freeze-drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals*, RSC Publishing, Cambridge.
8. Gaidhani KA, Harwalkar M, Bhambere D, Nirgude PS, (2015). *Lyophilization/FreezeDrying – A Review*. WJPR, 4(8), 516-543.
9. Hajare AA, More HN, Walekar PS, Hajare DA, (2012). *Optimization of Freeze Drying Cycle Protocol Using Real Time Microscopy and Integrated Differential Thermal Analysis-Electrical Impedance*, Research J Pharmand Tech. 5(7), 985-991.
10. Horn J, Friess W, (2018). *Detection of Collapse and Crystallization of Saccharide, Protein, and Mannitol Formulations by Optical Fibers in Lyophilization*. Front Chem. 6(49), 1-9.
11. Jenings AT, (1999). *Lyophilization, Introduction and Basic Principles*. CRC Press, Taylor and Francis Group, USA.
12. Karagül MS, Altuntas B, (2018). *Liyofilizasyon: Genel Proses Değerlendirmesi* Etlik Vet Mikrobiyol Derg. 29(1), 62-69
13. Kasper JC, Friess W, (2011). *The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals*. Eur J Pharm Biopharm. 78, 243-268.
14. Lueckel B, Bodmer D, Helk B, Leuenberger H, (1998). *Formulations of sugars with amino acids or mannitol - influence of concentration ratio on the properties of the freeze-concentrate and the lyophilizate*. Pharm Dev Technol. 3(3), 325-336.
15. Meister E, Gieseler H, (2008). *A significant comparison between collapse and glass transition temperatures*. European Pharmaceutical Review. Erişim: [https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/1479/a-significant-comparison-between-collapse-and-glass-transition-temperatures/], Erişim tarihi: 15.04.2018.
16. Meister E, Gieseler H, (2009). *Freeze-Dry Microscopy of Protein/Sugar Mixtures: Drying Behavior, Interpretation of Collapse Temperatures and a Comparison to Corresponding Glass Transition Data*. J PharmSci, 98(9), 3072-3087.
17. Mikal MJ, (2010). *Mechanisms of Protein Stabilization During Freeze Drying Storage: The Relative Importance Thermodynamic Stabilization and Glassy State Relaxation Dynamics*. L Rey, JC May eds. *Freeze Drying/Lyophilisation of Pharmaceutical and Biological Products*. Informa Healthcare, London. p. 198-232
18. Nail SL, Her LM, Proffitt CPB, Nail LL, (1994). *An improved microscope stage for direct observation of freezing and freeze drying*. Pharm Res. 11, 1098-1100.
19. Oetjen GW, (1999). *Freeze drying*. Wiley-VCH, German.
20. Patel SM, Doen T, Pikal MJ, (2009). *Determination of End Point of Primary Drying in Freeze-Drying Process Control*. AAPS Pharm Sci Tech. 11(1), 73-84.
21. Rey L, (2010). *Glimpses into the Realm of Freeze-Drying Classical issues and New Ventures*. 1-28. L Rey, JC May eds. *Freeze Drying/Lyophilisation of Pharmaceutical and Biological Products*. Informa Healthcare. London.
22. Ross C, Gaster T, WardK, (2008). *The Importance of Critical Temperatures in the Freeze Drying of Pharmaceutical Products*. Erişim: [http://www.biopharma.co.uk/wp-content/uploads/2010/07/importance_critical_temps.pdf], Erişim tarihi: 08.10.2018.
23. Searles JA, (2010). *Freezing and Annealing Phenomena in Lyophilization*. L Rey, JC May eds. *Freeze Drying/Lyophilisation of Pharmaceutical and Biological Products*. Informa Healthcare. London.
24. Tang XC, Pikal MJ, (2004). *Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice*. Pharm Res. 21(2), 191-200.
25. United States Patent Office, (1959): Use of dextran in freeze-drying process. 2,908,614.
26. Wang DQ, (2010). *Formulation Characterization*. L Rey, JC May eds. *Freeze Drying/Lyophilisation of Pharmaceutical and Biological Products*. Informa Healthcare. London. p.233-253
27. Ward KR, (2010). *The Use of Microscopy, Thermal Analysis, and Impedance Measurements to Establish Critical Formulation Parameters for Freeze-Drying Cycle Development*. L Rey, JC May eds. *Freeze Drying/Lyophilisation of Pharmaceutical and Biological Products*. Informa Healthcare. London. p.112-135.

Borrelia burgdorferi* ile Doğal Enfekte Köpeklerin Nötrofil-Lenfosit, Monosit-Lenfosit ve Platelet-Lenfosit Oranlarının Belirlenmesi

Kübra Çakır¹, Didem Pekmezci²

¹Vet-life Veteriner Kliniği, Kartepe, Kocaeli, Türkiye

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 13.05.2019, **Kabul Tarihi** / Accepted: 10.06.2019

Özet: Lyme hastalığı ya da Borreliozis; *Borrelia burgdorferi* adlı spiroket şekilli bir bakterinin neden olduğu, dünyada köpeklerde ve insanlarda yaygın olarak görülen, başlıca *Ixodes* cinsi kenelerle bulaşan, kalp, eklemler ve sinir sisteminde bozukluklarla karakterize ve kronikleşebilen enfeksiyöz bir hastalıktır. Günümüzde sistemik inflamatuvar yanıtın komplementleri olan nötrofil-lenfosit oranı (NLO), monosit-lenfosit oranı (MLO) ve platelet-lenfosit oranı (PLO) birçok hastalık prognozunun değerlendirilmesi ve prediktif parametreler olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmadaki amacımız ise ilk defa kronik bir inflamasyona neden olan *B. burgdorferi*'i yönünden doğal enfekte seropozitif köpekler ile seronegatif köpeklerin tedavi öncesi başüstü parametreleri olan nötrofil (NEU), NLO, lenfosit (LYM), monosit (MONO), MLO, platelet (PLT) ve PLO değerlerinin karşılaştırılmasıdır. Yirmi dört adet sahipli köpektan tedavi öncesi alınan tam kan ve serum örnekleri çalışma materyalini oluşturmuştur. Serum örneklerinin *B. burgdorferi*'ye karşı oluşan IgG antikor yanıtı ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Sonrasında bu 7 adet seropozitif örnek Western Blot yöntemi ile doğrulanmıştır. Gruplar arası NEU, NLO, MONO, MLO, PLT ve PLO değerleri karşılaştırılmış ancak, istatistiksel bir fark bulunamamıştır. Sonuç olarak Lyme hastalığı yönünden seropozitif köpekler ile seronegatif köpeklerin ilk kez NLO, MLO, ve PLO değerlerinin karşılaştırıldığı mevcut çalışma ile uygulaması kolay ve düşük maliyetli sistemik inflamasyon belirteçlerinin veteriner pratikteki kullanımlarının genişletilmesi yönündeki gerçekleştirilecek çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Köpek, *Borrelia burgdorferi*, nötrofil-lenfosit, monosit-lenfosit, platelet-lenfosit, oran

Detection of Neutrophil–Lymphocyte, Monocyte–Lymphocyte and Platelet–Lymphocyte Ratios in Dogs Naturally Infected with *Borrelia burgdorferi*

Abstract: Lyme disease or Borreliosis; is a commonly seen infectious disease in the dogs and men worldwide which caused by a spirochete shaped bacterium called *B. burgdorferi*, mainly transmitted with the *Ixodes* species of ticks and affects heart, joints and characterized with neurological system disorders. Nowadays, as being components of the systemic inflammatory response, the neutrophil-lymphocyte (NLR), monocyte-lymphocyte (MLR) and platelet-lymphocyte ratios (PLR) are used as predicting parameters for the evaluation of the progression of various diseases. Our interest in the current study is to determine whether pretreatment NEU, NLR, LYM, MONO, MLR, PLT and PLR levels as bedside markers, differ in seropositive dogs naturally infected with *B. burgdorferi* which leads a chronic inflammation from seronegative dogs for the first time. Twenty four whole blood and serum samples of the client-owned dogs formed the study material. Seven of the serum samples were showed IgG against *B. burgdorferi* by ELISA and detected as seropositive. Later these 7 seropositive dogs were confirmed by Western Blot method. NEU, NLR, MONO, MLR, PLT and PLR levels were compared between groups, but there were not found any statistical significance for these parameters between groups. Consequently, it is thought that within this study, which firstly compared the NLO, MLO, and PLO values of seropositive dogs and seronegative dogs in terms of Lyme disease, is thought to contribute to the studies to be carried out in order to expand the use of these easily applicable and low cost systemic inflammation markers in veterinary practice.

Key words: Dog, *Borrelia burgdorferi*, neutrophil-lymphocyte, monocyte-lymphocyte platelet-lymphocyte, ratio

Giriş

Lyme hastalığı ya da Borreliozis; *Borrelia burgdorferi* adlı spiroket şekilli bir bakterinin neden olduğu, dünyada yaygın olarak görülen, başlıca *Ixodes* cinsi kenelerle bulaşan, kalp, eklemler ve sinir sistemin-

de bozukluklarla karakterize, ancak birçok organı da etkileyen ve kronikleşebilen enfeksiyöz bir hastalıktır. Köpek Borreliozis'i ise ilk kez 1980'lerde Amerika Birleşik Devletleri'nde tanımlanmış ve kısa zamanda tüm dünyaya yayılmıştır [9].

* Bu çalışma Kübra Çakır'ın Yüksek Lisans Tez'inden üretilmiştir.

Yazışma adresi / Correspondence: Vet. Hekim Kübra Çakır, (ORCID: 0000-0001-7488-1400), Vet-life Veteriner Kliniği, Kartepe, Kocaeli E-posta: k_yarimbasm@hotmail.com

Köpeklerde Lyme hastalığı birçok organ ve sistemi etkilemekte birlikte, en sık eklemlerin etkilendiği rapor edilmiştir [7, 10]. Hastalık her yaşta köpekte eroziv olmayan artrit, topallık, ağrı, ateş ($T > 39,5^{\circ}\text{C}$), iştahsızlık, lenfadenopati ve yorgunluk şeklinde görülürken, yaşlı köpeklerde böbrek yetmezliğinin daha sık görüldüğü belirlenmiştir [10]. Miyokarditis ve endokarditis gibi kardiyak bozuklukların hastalıkta nadir olarak oluştuğu ortaya konulmuştur [7].

Köpeklerde lyme hastalığının eroziv veya eroziv olmayan artrit formlarının dışında şekillenen nefropati formunda ödemli vaskülit veya efüzyon; olası körlük veya kalp üfürümlü hipertansiyon; tromboembolik olaylar ve bazen vaskülit, hipertansiyon, üremik ensefalopati veya menenjitin nörolojik belirtileri (örneğin, nöbet, nistagmus, kollaps) gibi semptomlar görülebilmektedir [4, 20].

Bu sendromdaki laboratuvar anormalliklerini ise dejeneratif olmayan anemi, stres lökogramı, trombositopeni, hipoalbuminemi, azotemi, hiperkolesterolemi, hiperfosfatemi ve bazen hiperkalemi ve hiperbilirubinemi oluşturmaktadır. İdrar muayenesinde proteinüri ve hemoglobinüri, hematüri, glukozüri, bilirubinüri ve negatif bakteri kültürü ile aktif bir sedimentasyonda azalma görülebilmektedir. Çoğu vaka oligürik veya anürik olup böbrek yetmezliği nedeni ile hasta köpekler ölebilmektedir [6, 4, 15, 20].

Çoğu zaman immun ilişkili mediyatörlerin oldukça geniş ve karmaşık sraya sahip olmaları, kritik hastalıklarda immun yanıtın değerlendirilmesinde kullanılacak uygun biyokimyasal parametrelerden iyi bir prediktif belirteç olarak yararlanmayı mümkün kılmamaktadır [5]. Son zamanlarda hali hazırda kolaylıkla elimizin altında bulunan tam kan sayımından köken alan oranlar, henüz herhangi bir konsensus oluşturulmamasına rağmen potansiyel biyokimyasal belirteçler olarak beşeri hekimlikte yaygın olarak kullanılmaktadır [14, 16, 26].

Glasgow Prognostik Skoru'nun yanında sistemik inflamatuvar yanıtın komplementleri olarak nötrofil-lenfosit oranı (NLO), monosit-lenfosit oranı (MLO) ve platelet-lenfosit oranı (PLO) yer almaktadır [8, 18]. Son zamanlarda bu oranlar karsinogenezis ve tümör progresyonun değerlendirilmesinin yanı sıra birçok inflamasyon ilişkili hastalıklarda örneğin kardiyovasküler hastalıklar [13], malignan-

siler [22], otoimmün hastalıklar [3, 24], akut pankreatitis [23], kronik obstruktif pulmoner hastalıklar [12, 25], overiyen apselerinde, Chron hastalığı ve siroziste prognozun değerlendirilmesinde prediktif parametreler olarak kullanılmaktadır [1]. Ucuz ve kolaylıkla erişilebilecek olan bu oran ve skorlamaların henüz veteriner hekimlikte kullanılması için çok sayıda kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmanın amacı ise ilk defa kronik bir inflamasyona neden olan *B. burgdorferi*'nin neden olduğu lyme hastalığı yönünden seropozitif köpekler ile seronegatif köpeklerin NEU, NLO, MONO, MLO, PLT ve PLO değerlerinin karşılaştırılmasıdır.

Materyal ve Metot

Çalışma Materyali

Çalışma materyalini, Nisan 2017 ile Haziran 2018 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Uygulama ve Araştırma Hastanesi'ne tedavi veya kontrol amacıyla getirilen sahipli, çeşitli ırk ve yaşlarda, dişi ve erkek toplam 24 adet köpek oluşturmuştur. Çalışmaya daha önce *B. burgdorferi*'ye karşı aşılammamış ve Lyme hastalığı yönünden herhangi bir tedavi görmemiş toplam 24 adet köpek dâhil edilmiştir. Serolojik olarak *B. burgdorferi* yönünden pozitif kabul edilen 7 adet köpek deney grubunu oluştururken, geriye kalan ve serolojik olarak negatif kabul edilen 17 adet köpek ise kontrol grubunu oluşturmuştur. Çalışma yerel hayvan etik kurulunca onaylanmıştır (2016/64).

Total Kan Sayımı

Rutin muayenede tedavi öncesi 2 ml EDTA'lı tüplere, 5 ml kuru tüplere alınmış olan kan örnekleri çalışma materyali olarak kullanılmıştır. EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri total kan sayımı için sayım öncesi karıştırıcıda orta devirde karıştırılıp çalışmaya hazır hale getirilmiş, sonrasında 24 adet tam kan örneği BC-5000 Vet Auto Hematoloji cihazıyla çalışılmış ve sonuçlar (WBC, NEU, LYM, MONO, EOS, LY%, MONO%, EOS%, NEU%, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW-CV, RDW-SD, PLT, PCT, MPV, PDW) kayıt altına alınmıştır. Çalışma köpeklerine ait tam kan sayımı değerlerinden NLO (nötrofil/lenfosit), MLO (monosit/lenfosit) ve PLO (platelet/lenfosit), lenfosit sayılarının sırası ile nötrofil, monosit ve platelet sayılarına ayrı ayrı

bölünerek hesaplanmasından elde edilmiştir [19]. Lyme hastalığının serolojik tanısı amacıyla jelli tüplere alınan örnekler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları 2 farklı ependorf tüpüne aktarılarak çalışılana kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Serolojik Olarak Köpek Spesifik Anti *B. burgdorferi* IgG Seviyelerinin ELISA Yöntemi ile Tespiti

Köpeklerden alınan serum örnekleri öncelikle *B. burgdorferi*'ye karşı oluşan IgG antikor yanıtını belirlemek amacı ile EUROIMMUN® Anti-Borrelia ELISA Köpek IgG (Lübeck, Germany) kitleriyle üretici firmanın direktiflerine uygun olarak çalışılmış ve 450 nm'de ELISA okuyucuda okutulmuştur. Elde edilen okuma değerleri prospektüste belirtilen yöntemle göre hesaplanmış ve test sonucunda kalibrasyona ait değerlere bölünerek son değerlere ulaşılmıştır. Her bir örneğin pozitif, negatif ya da sınırdaki pozitifliği belirlenmiştir.

Serolojik Olarak Köpek Spesifik Anti *B. burgdorferi* IgG Pozitif Köpeklerin Western Blot Yöntemi ile Doğrulanması

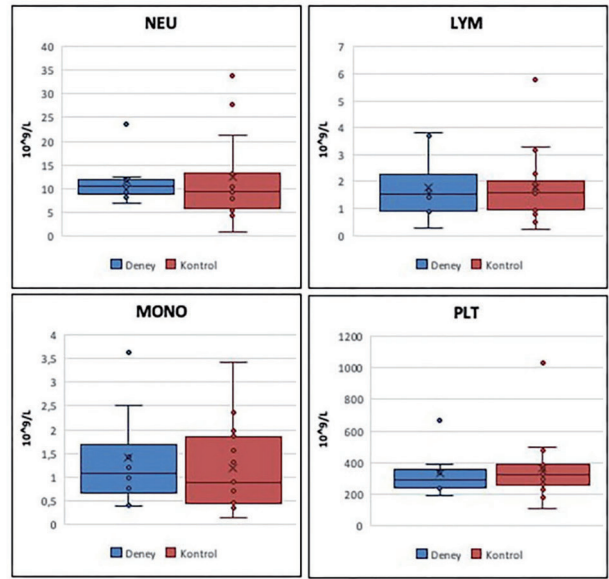
ELISA yöntemi ile pozitif bulunan serum örnekleri, EUROIMMUN® Anti-Borrelia EUROLINE Köpek IgG (Lübeck, Germany) kitleri ile çalışılmıştır. Test görsel olarak değerlendirilmiş olup, her bir örneğin verdiği bant sayısı ve çeşidine göre değerlendirme yapılmıştır. Spesifik antijen bant değerlendirmesinde; VisE, P100, P39, OspA (p31), OspC (P25), p21, p18 yer almaktadır. Sonuçlar üretici firmanın direktiflerine göre firmanın göndermiş olduğu test kontrol kâğıtlarının üzerinde görsel olarak değerlendirilmiştir.

İstatistiksel Analiz

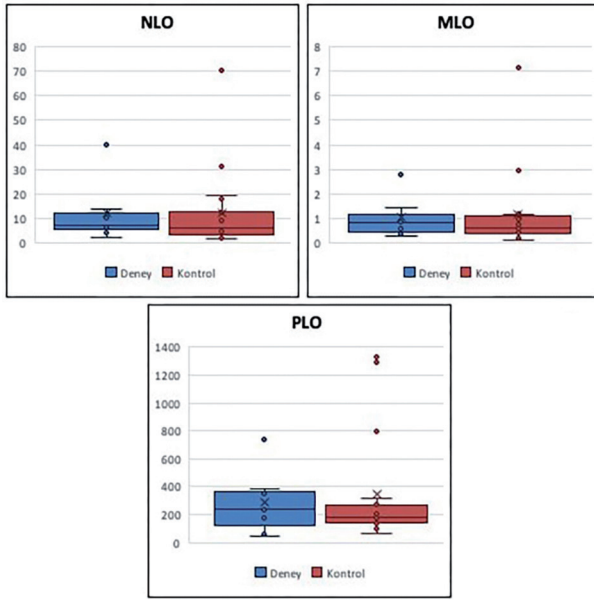
Çalışmaya dâhil edilen tüm köpeklerin NEU, LYM, MONO, PLT, NLO, MLO ve PLO değerlerinin normal dağılım gösterip göstermediğini belirlemek amacı ile Kolmogorov-Smirnov testi kullanılmıştır. Sonrasında deney ve kontrol grubu arasında NEU, LYM, MONO, PLT, NLO, MLO ve PLO değerlerinin karşılaştırılmasında ise Student t testi uygulanmıştır.

Bulgular

Çalışma materyalini oluşturan 24 köpeğin, 7'si *B. burgdorferi*'ye karşı oluşan anti IgG antikor yönünden seropozitif olarak bulunurken, 17 köpek seronegatif olarak tespit edilmiştir (Tablo 1). Deney grubunu oluşturan 7 köpeğin seropozitiflikleri ise sonrasında Western Blot yöntemi ile doğrulanmıştır. Deney ve kontrol gruplarına ait NEU, LYM, MONO, PLT değerleri Figür 1'de gösterilmiştir. Deney ve kontrol gruplarına ait NLO, MLO, PLO değerleri ise Figür 2'de gösterilmiştir.



Figür-1: *Borrelia burgdorferi* ile doğal enfekte seropozitif (Deney grubu; mavi renkli) ve seronegatif köpeklerin (Kontrol grubu; kırmızı renk) tedavi öncesi NEU, LYM, MONO ve PLT değerlerinin sunulduğu Kutu-Bıyık grafikleri (Box-and-whiskers plot). Orta Kutu, gözlemin %50'sini oluşturmaktadır; kutunun alt kısmı birinci çeyrekliği ve kutunun üstü üçüncü çeyrekliği oluşturmaktadır. Kutunun ortasındaki yatay çizgi ise medyandır. Her kutudaki çarpı işareti o kutuya ait ortalama değeri vermektedir. Bıyıklar, çeyrekler arası aralıktan 1,5 kez çıkartılan en küçük ve en büyük gözlemlere kadar uzanmaktadır ve ayrı ayrı noktalar halinde belirtilmişlerdir.



Figür-2: *Borrelia burgdorferi* ile doğal enfekte seropozitif (Deney grubu; mavi renkli) ve seronegatif köpeklerin (Kontrol grubu; kırmızı renk) tedavi öncesi NLO, MLO ve PLO değerlerinin sunulduğu Kutu-Bıyık grafikleri (Box-and-whiskers plot). Orta Kutu, gözlemin %50'sini oluşturmaktadır; kutunun alt kısmı birinci çeyrekliği ve kutunun üstü üçüncü çeyrekliği oluşturmaktadır. Kutunun ortasındaki yatay çizgi ise medyandır. Her kutudaki çarpı işareti o kutuya ait ortalama değeri vermektedir. Bıyıklar, çeyrekler arası aralıktan 1,5 kez çıkartılan en küçük ve en büyük gözlemlere kadar uzanmaktadır ve ayrı ayrı noktalar halinde belirtilmişlerdir.

Tablo 1. Çalışma materyalini oluşturan 24 köpeğin ırk, yaş ve cinsiyetlerine ait veriler.

Anti <i>B. burgdorferi</i> IgG yönünden pozitif köpekler			
İrk	Yaş	Cinsiyet	Uygulama ve Araştırma Hastanesine Getiriliş Nedeni
Golden Retriever	8	Dişi	Genel Muayene
Rottweiler	5	Erkek	Belirtilmemiş
Mastiff	5	Erkek	Topallık
Akbaş	5 aylık	Erkek	Gastritis
Pointer	6 aylık	Erkek	Çam Kese Böceği Toksikasyonu
Doberman Pinscher	10	Dişi	Piyometra
Golden Retriever	11	Dişi	Atopik Dermatit
Anti <i>B. burgdorferi</i> IgG yönünden negatif köpekler			
İrk	Yaş	Cinsiyet	Uygulama ve Araştırma Hastanesine Getiriliş Nedeni
İngiliz Pointer	1	Erkek	Genel Muayene
Golden Retriever	6	Erkek	Genel Muayene
Melez	6 aylık	Dişi	Belirtilmemiş
Melez	9 aylık	Dişi	Belirtilmemiş
Setter	2	Erkek	Ovariohistektomi
Pointer	1	Erkek	Gastritis
Alman Çoban Köpeği	8	Dişi	Genel Kontrol
Kangal	6 aylık	Dişi	Genel Kontrol
Labrador Retriever	9	Dişi	Ovariohistektomi
Melez	2	Dişi	Genel Kontrol
Melez	8 aylık	Dişi	Genel Kontrol
Melez	4 aylık	Dişi	Genel Kontrol
Melez	4 aylık	Erkek	Genel Kontrol
Melez	15	Dişi	Genel Kontrol
Belçika Malinois	1	Erkek	Genel Kontrol
Melez	5 aylık	Erkek	Genel Kontrol
Melez	3	Erkek	Genel Kontrol

Tartışma

Lyme hastalıklı insanlar ve köpeklerde hematolojik ve serum biyokimyasal değerler genellikle normal sınırlar içerisinde yer almaktadır [15]. Benzer sonuçlar çalışmamız içinde geçerli olmuştur. Zira deney grubuna ait ortalama NEU, LYM, MONO, PLT değerleri sırası ile $9,5 \times 10^9/L$, $2,05 \times 10^9/L$, $0,742 \times 10^9/L$ ve $318,68 \times 10^9/L$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar Scorpio ve ark. [21] yapmış oldukları çalışma ile benzerlik göstermektedir. Sunulan çalışmada deney ve kontrol grubunun NEU, LYM, MONO, PLT değerlerinin karşılaştırılmasında ise istatistiksel olarak bir farklılık ($P > 0.05$) tespit edilememiştir.

Deney ve kontrol gruplarının NLO, MLO ve PLO değerlerinin karşılaştırılmasında ise yine istatistiksel olarak bir farklılık ($P > 0.05$) olmamakla beraber deney grubunun NLO ortalama değerinin (7,2), kontrol grubuna göre (5,2) yüksek olduğu belirlenmiştir. Bazı çalışmalarda lokal lenfositik yanıtın, invazif yapıdaki lenfositik reaksiyonlar gibi değerlendirilmeleri neticesinde düşük NLO oranı ile karşılaşıldığını ve bunun sonucunda ise prognoz daha iyi olduğu bildirilmektedir [17]. Mevcut çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla deney grubunun yüksek LYM değerine sahip olmasına rağmen yine deney NLO değerinin de yüksek olduğu tespit edilmektedir. Bu durum çalışmamızdaki deney ve kontrol grup örnek sayılarının düşük olması ile açıklanabilir. MLO değerleri bakımından mevcut çalışmada deney (0,7) ve kontrol grubu (0,6) karşılaştırılmasında yine istatistiksel bir farklılık ($P > 0.05$) bulunmamıştır.

Deney ve kontrol gruplarının PLT ve PLO değerleri bakımından karşılaştırılmalarında yine istatistiksel bir farklılık ($P > 0.05$) tespit edilememiştir. Bununla birlikte deney PLO değerinin (241,2) kontrol grubuna göre (182,8) yüksek bulunduğu tespit edilmiştir. Sonuçlarımız Scorpio ve ark. [21]'nin yapmış oldukları ve PLT bakımından seropozitif ve negatif köpekleri karşılaştırdıkları çalışma ile benzerlik göstermektedir. Araştırmacılar çalışmalarında seropozitif köpeklerin PLT değerlerinin ($286,78 \times 10^9/L$) seronegatif olanlara ($202,42 \times 10^9/L$) istatistiksel olarak bir farklılık göstermediğini tespit etmişlerdir [21]. Yapılan son çalışmalar plateletlerin sistemik inflamasyonda özellikle de athe-

rogeneziste oldukça önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir [11]. Plateletler birçok farklı hücre tipleri ile örneğin endotelial ve dendritik hücreler, T-lenfositler, ve mononükleer fagositler ile etkileşim içindedir [2]. Çalışmamızda Lyme hastalıklı köpeklerde PLO'nun yükselme eğiliminde olduğu söylenebilir. Değerlendirmede PLO'nun yüksek bulunması ise bu hastalardaki sistemik inflamasyonun da yüksek olabileceğini göstermektedir. Son yıllarda beşeri hekimlikte uygulama kolaylığı ve düşük maliyetinden ötürü NLO, MLO ve PLO değerleri sayısız hastalığın prognozunu değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Beşeri hekimlikte meta analizler doğrultusunda tüm inflamatuvar yanıtta sitokin ve akut faz proteinleri ile korrelasyonları valide edilmiş NLO, MLO ve PLO'nun *B. burgdorferi* yönünden seropozitif ve negatif köpeklerde değerlendirildiği çalışmamızda örnek sayımızın her iki grupta az olması çalışmamızı kısıtlayan en önemli nedeni oluşturmaktadır.

Sonuç

Kronik inflamasyona neden olan *B. burgdorferi*'nin neden olduğu Lyme hastalığı yönünden seropozitif köpekler ile seronegatif köpeklerin ilk kez NLO, MLO ve PLO değerlerinin karşılaştırıldığı bu çalışmada, NLO ve PLO değerlerinin Lyme yönünden seropozitif köpeklerde yükselme eğiliminde olduğu söylenebilir. Sonuç olarak, bu çalışma ile uygulaması kolay ve düşük maliyetli sistemik inflamasyon belirteçlerinin veteriner pratikteki kullanımlarının genişletilmesi yönünde gerçekleştirilecek çalışmalara katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Teşekkür

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.17.020 proje numarası ile desteklenmiştir. Ayrıca çalışmanın istatistiğini yapan Prof. Dr. Filiz Akdağ'a şükranlarımızı sunarız.

Kaynaklar

1. Alay I, Kaya C, Karaca I, Eren E, Hoşgören M, Aslanova F, Cengiz ME, Yasar, L. (2019). The effectiveness of neutrophil to lymphocyte ratio in prediction of medical treatment failure for tubo-ovarian abscess. J Obstet Gynaecol Res. doi:10.1111/jog.13946

2. Borrisoff JI, Spronk HM, ten Cate H, (2011). The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl J Med.* 364, 1746-1776.
3. Chandrashekara S, Mukhtar Ahmad M, Renuka P, Anupama KR, Renuka K, (2017). Characterization of neutrophil-to-lymphocyte ratio as a measure of inflammation in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis.* 20, 1457-1467.
4. Dambach DM, Smith CA, Lewis RM, Van Winkle TJ, (1997). Morphologic, immunohistochemical, and ultrastructural characterization of a distinctive renal lesion in dogs putatively associated with *Borrelia burgdorferi* infection: 49 cases (1987–1992). *Vet Pathol.* 34, 85-96.
5. Djordjevic D, Rondovic G, Surbatovic M, Stanojevic I, Udovicic I, Andjelic T, Zeba S, Milosavljevic S, Stankovic N, Abazovic D, Jevdjic J, Vojvodic D, (2018). Neutrophil-to-lymphocyte ratio, monocyte-to-lymphocyte ratio, platelet-to-lymphocyte ratio, and mean platelet volume-to-platelet count ratio as biomarkers in critically ill and injured patients: Which ratio to choose to predict outcome and nature of bacteremia? *Mediators Inflamm.* 2018, 3758068.
6. Grauer GF, Burgess EC, Cooley AJ, (1988). Renal lesions associated with Lyme borreliosis in a dog. *J Am Vet Assoc.* 193, 237-239.
7. Greene RT, (1991). Canine Lyme borreliosis. *Vet Clin N Am Small Anim.* 21, 51-64.
8. Guthrie GJK, Charles KA, Roxburgh CSD, Horgan PG, McMillan DC, Clarke SJ, (2013). The systemic inflammation-based neutrophil-lymphocyte ratio: experience in patients with cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 88, 218-230.
9. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, (1997). Lyme disease. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, p. 964-971.
10. Kornblatt AN, Urband PH, Stere AC, (1985). Arthritis caused by *Borrelia burgdorferi* in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 186, 960-964.
11. Koyama H, Maeno T, Fukumoto S, Shoji T, Yamane T, Yokoyama H, Emoto M, Shoji T, Tahara H, Inaba M, Hino M, Shioi A, Miki T, Nishizawa Y, (2003). Platelet P-selectin expression is associated with atherosclerotic wall thickness in carotid artery in humans. *Circulation.* 108, 524-529.
12. Kurtipek E, Bekci TT, Kesli R, Sami SS, Terzi Y, (2015). The role of neutrophil lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio in exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *J Pak Med Assoc.* 65, 1283-1287.
13. Li H, Zhou Y, Ma Y, Han S, Zhou L, (2017). The prognostic value of the platelet-to lymphocyte ratio in acute coronary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Kardiol Pol.* 75, 666-673.
14. Liu X, Shen Y, Wang H, Ge Q, Fei A, Pan S, (2016). Prognostic significance of neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with sepsis: a prospective observational study. *Mediators Inflamm.* 2016, 8191254.
15. Magnarelli LA, Anderson JF, Schreier AB, (1987). Clinical and serologic studies of canine borreliosis, *J Am Vet Med Assoc.* 19, 1089-1094.
16. Naess A, Nilssen SS, Mo R, Eide GE, Sjursten H, (2017). Role of neutrophil to lymphocyte and monocyte to lymphocyte ratios in the diagnosis of bacterial infection in patients with fever. *Infection,* 45, 299-307.
17. Pine JK, Morris E, Hutchins GG, West NP, Jayne DG, Quirke P, Prasad KR, (2015). Systemic neutrophil-to-lymphocyte ratio in colorectal cancer: the relationship to patient survival, tumor biology and local lymphocytic response to tumor. *Br J Cancer.* 113, 204-211.
18. Proctor MJ, Morrison DS, Talwar D, Balmer SM, Fletcher CD, O'Reilly DSJ, Foulis AK, Horgan PG, McMillan DC, (2011). A comparison of inflammation-based prognostic scores in patients with cancer. A Glasgow Inflammation Outcome Study. *Eur J Cancer.* 47, 2633-2641.
19. Rossi S, Basso M, Strippoli A, Schinzari G, D'Argento E, Larocca M, Cassano A, Barone C, (2017). Are markers of systemic inflammation good prognostic indicators in colorectal cancer? *Clin Colorectal Cancer.* 16, 264-274.
20. Sanders NA, (2000). Canine Lyme nephritis Proc. 18th ACVIM Forum, 627-628.
21. Scorpio DG, Wachtman LM, Tunin RS, Barat NC, Garyu JW, Dumler JS, (2008). Retrospective clinical and molecular analysis of conditioned laboratory dogs (*Canis familiaris*) with serologic reactions to *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia rickettsii*. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 47, 23-28.
22. Shi L, Qin X, Wang H, Xia Y, Li Y, Chen X, Shang L, Tai YT, Feng X, Acharya P, Acharya, C, Xu Y, Deng S, Hao M, Zou D, Zhao Y, Ru K, Qiu L, An G, (2017). Elevated neutrophil-to-lymphocyte ratio and monocyte-to-lymphocyte ratio and decreased platelet-to-lymphocyte ratio are associated with poor prognosis in multiple myeloma. *Oncotarget.* 8, 18792-18801.
23. Wang Y, Fuentes HE, Attar BM, Jaiswal P, Demetria M, (2017). Evaluation of the prognostic value of neutrophil to lymphocyte ratio in patients with hypertriglyceridemia induced acute pancreatitis. *Pancreatology.* 17, 893-897.
24. Yang Z, Zhang Z, Lin F, Ren Y, Liu D, Zhong R, Liang Y, (2017). Comparisons of neutrophil-, monocyte-, eosinophil-, and basophil- lymphocyte ratios among various systemic autoimmune rheumatic diseases. *APMIS.* 125, 863-871.
25. Yao C, Liu X, Tang Z, (2017). Prognostic role of neutrophil-lymphocyte ratio and platelet- lymphocyte ratio for hospital mortality in patients with AECOPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 12, 2285-2290.
26. Zheng CF, Liu WY, Zeng FF, Zheng MH, Shi HY, Zhou Y, Pan JY, (2017). Prognostic value of platelet-to-lymphocyte ratios among critically ill patients with acute kidney injury. *Critical Care.* 21, 238.

Molecular Characterization of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Raphidascarididae) Larvae Infecting *Merlangius merlangus euxinus* (Linnaeus, 1758) from the Turkish Black Sea Coast Based on Mitochondrial Small Subunit Ribosomal RNA Gene Analysis

Gökmen Zafer Pekmezci¹

¹Department of Aquatic Animal Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University, Samsun, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 09.05.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 22.05.2019

Abstract: The taxonomy of *Hysterothylacium* genus remains incomplete and unclear in Turkish waters. In the present study, *H. aduncum* larvae were morphologically identified from *Merlangius merlangus euxinus* in the Black Sea, Turkey. The nuclear ribosomal internal transcribed spacer region (ITS-1, 5.8S subunit, ITS-2) and the small subunit of the mitochondrial ribosomal RNA (rrnS) gene of *H. aduncum* were amplified and sequenced. The BLAST analysis indicated that obtained ITS sequences were identical to that of the reference sequence of *H. aduncum* (accession no JX413596) recorded previously from the Black Sea, Turkey. The rrnS gene of *H. aduncum* from the Black Sea, Turkey (MK886768) showed 97.94 to 99.56% identity to the isolates of *H. aduncum* from the Mediterranean Sea (MF000685-MF000691) and the Chinese waters (MF140344). Moreover, pairwise comparison between the rrnS sequences of the *H. aduncum* from the Black Sea, Turkey (MK886768) and others *H. aduncum* isolates from the Mediterranean Sea (MF000685-MF000691), the Chinese waters (MF140344) showed differences ranged from 0.2 and 1.7%. Consequently, *H. aduncum* from the Black Sea was characterized for the first time by sequencing of the mitochondrial *rrnS* gene with the present study.

Key words: *Hysterothylacium aduncum*, molecular characterization, mitochondrial rrnS gene, Black Sea, Turkey

Türkiye'nin Karadeniz Kıyılarındaki *Merlangius merlangus euxinus*'u (Linnaeus, 1758) Enfekte Eden *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Raphidascarididae) Larvasının Küçük Alt Ünite Ribozomal RNA Gen Bölgesine Göre Moleküler Karakterizasyonu

Özet: Türkiye sularında *Hysterothylacium* cinsinin taksonomisi eksik ve belirsizdir. Bu araştırmada Türkiye'nin Karadeniz kıyılarında avlanan *Merlangius merlangus euxinus*'da *H. aduncum* larvaları morfolojik olarak teşhis edildi. *H. aduncum*'un nükleer ribozomal ITS (ITS-1, 5.8S subunit, ITS-2) ve küçük alt ünite mitokondriyal ribozomal RNA (rrnS) gen bölgeleri çoğaltıldı ve sekanslandı. *H. aduncum*'un ITS sekanslarının BLAST analizleri daha önce Türkiye'nin Karadeniz kıyılarından rapor edilen *H. aduncum*'un referans dizisiyle (erişim numarası JX413596) identik olduğunu gösterdi. Türkiye Karadeniz'den *H. aduncum* rrnS geni (MK886768), Akdeniz (MF000685-MF000691) ile Çin sularındaki (MF140344) bulunan *H. aduncum* izolatları ile %97.94-99.56 arasında benzerlik gösterdi. Bununla birlikte, Türkiye Karadeniz'den elde edilen *H. aduncum*'un rrnS dizisi ile Akdeniz (MF000685-MF000691) ve Çin sularındaki (MF140344) diğer *H. aduncum* izolatlarının ikili karşılaştırmasında %0,2 ile %1,7 arasında farklılık gözlemlendi. Bu çalışma ile ilk kez Karadeniz'den *H. aduncum*'un mitokondriyal rrnS geni moleküler olarak karakterize edildi.

Anahtar kelimeler: *Hysterothylacium aduncum*, moleküler karakterizasyon, mitokondriyal rrnS gen, Karadeniz, Türkiye

Introduction

Hysterothylacium species belonging to family of the Raphidascarididae has a circumpolar distribution in the Northern Hemisphere that mainly found in marine teleost in temperate and cold waters [4] and a few fresh water hosts [16, 21]. To date, there are over 70 recognizable *Hysterothylacium* species with worldwide distribution [17]. However, only three species, *H. aduncum*, *H. fabri* and *H. reliquens* have

been molecularly characterized from Turkish waters [11, 18, 20, 25]. These molecular studies have been also proven to be useful for the accurate identification of those *Hysterothylacium* species using DNA sequencing of ribosomal internal transcribed spacer (ITS) regions and the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) and (cox2) genes [11, 18, 20, 25]. Molecular data on *Hysterothylacium* genus infecting fish from Turkish waters is still not sufficient. Nevertheless, before the present study, there

had been no reports of characterizing the *H. aduncum* from the Black Sea using well-defined mitochondrial *rrnS* gene sequences. For this reason, in the present study, *H. aduncum* from the Black Sea were genetically characterized for the first time by sequencing of mitochondrial *rrnS* marker.

Materials and Methods

Parasite Collection and PCR Amplification

Hysterothylacium spp. larvae were collected from *Merlangius merlangus euxinus* in the Black Sea, Turkey between September and November 2018. Larvae were identified using the morphology of the labia, the position of the excretory pore, the intestinal cecum, ventricular appendix and the tail [3, 23]. Three of fourth-stage larvae were randomly selected among the total larvae samples and were subjected to the molecular analysis. Total DNA was extracted from the middle part of larvae using the DNA extraction kit (Thermo Scientific). The nuclear ribosomal ITS region (ITS-1, 5.8S subunit, ITS-2) and the small subunit of the mitochondrial ribosomal RNA (*rrnS*) gene were targeted for amplifications. ITS regions were amplified using the primers NC5 (5'-GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT-3') and NC2 (5'-TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT-3') [28]. PCR conditions followed the protocol described by Pekmezci et al. [18]. Then, the *rrnS* gene was amplified using MH3 (5'-TTG TTC CAG AAT AAT CGG CTA GAC TT-3') and MH4.5 (5'-TCT ACT TTA CTA CAA CTT ACT CC-3') [6]. PCR conditions were also used according to D'Amelio et al. [6]. PCR products were visualized on 1.5% agarose gel by UV transillumination.

DNA Sequencing and Phylogenetic Analysis

Three fourth stage larvae morphologically identified as *H. aduncum* were sequenced using ABI PRISM 310 genetic analyser (Applied Biosystems) for ITS and *rrnS* genes. The quality of the sequences were checked using Geneious R11 (Biomatters Ltd.) and Vector NTI Advance 11.5 (Invitrogen). Later, sequences were verified by forward and reverse comparisons, assembled, and edited with Contig Express in Vector NTI Advance 11.5 (Invitrogen) and Geneious R11 (Biomatters Ltd.). The obtained consensus sequences were compared with previously published data for identification by using the

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) via GenBank database [1]. The *rrnS* sequences were aligned with others known *H. aduncum* in previous studies [8, 15] using ClustalW in MEGA 7.0 multiple sequence alignments [27] and adjusted manually. Genetic distances were calculated using the Kimura two-parameter model with pairwise deletion in Mega 7.0 [13]. Phylogenetic relationships were inferred using maximum likelihood (ML) with selection of the best model for nucleotide substitution by the Find Best DNA Model test implemented in MEGA 7.0 [13]. The Hasegawa-Kishino-Yano model (HKY+G) was selected using Akaike information criterion (AIC). Bootstrap confidence values were calculated with for 100 repetitions for ML [7]. Bootstrap values ≥ 70 were considered well supported [10]. The nucleotide sequences were deposited in GenBank database under the accession numbers: MK886768 for *rrnS* gene. Reference specimens and isolated DNA samples are stored at the "Department of Aquatic Animal Diseases, Veterinary Medicine Faculty, Ondokuz Mayıs University," Samsun, Turkey.

Result

The amplifications of the *rrnS* gene and ITS region produced a fragment of approximately 500 bp and 1000 bp from different individuals, respectively, on agarose gels. While the *rrnS* products were subjected to direct sequencing giving products 480 bp long, ITS products were 900 bp long. No intraspecific nucleotide variability within different individuals was observed in the *rrnS* gene and ITS region. The *H. aduncum* isolates showed 100% identity to that of the reference sequence of *H. aduncum* (accession from JX413596) recorded previously from the Black Sea, Turkey [18]. The percent identities among *H. aduncum* isolates from Black Sea, Turkey (MK886768) showed 97.94-99.56% identity with various geographical isolates of *H. aduncum* from the Mediterranean Sea (MF000685-MF000691) and the Chinese waters (MF140344) from GenBank according to *rrnS* gene. Pairwise comparison between the *rrnS* sequences of the *H. aduncum* isolates from the Black Sea, Turkey (MK886768) and others *H. aduncum* isolates from the Mediterranean Sea (MF000685-MF000691), the Chinese waters (MF140344) showed differences ranged from 0.2 and 1.7% (Table 1). Also, the present *rrnS* sequence

(MF140344) was aligned with the same gene for *H. aduncum* (MF000685-MF000691 and MF140344) which was previously deposited in GenBank (Fig. 1). Moreover, *H. aduncum* (MK886768) in the Black

Sea, Turkey and others *H. aduncum* (EU852345-EU852348 and MF140344) isolates were clustered in the same clade in the ML tree (Fig. 2) inferred from the *rrnS* sequence analysis.

Table 1. Pairwise comparison of nucleotide sequence differences (%) in the *rrnS* among *H. aduncum* isolates and various geographical isolates

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1-MK886768, Black Sea, Turkey									
2-MF000685, Mediterranean Sea	0.007								
3-MF000686, Mediterranean Sea	0.007	0.004							
4-MF000687, Mediterranean Sea	0.009	0.007	0.007						
5-MF000688, Mediterranean Sea	0.004	0.002	0.002	0.004					
6-MF000689, Mediterranean Sea	0.007	0.004	0.004	0.007	0.002				
7-MF000690, Mediterranean Sea	0.007	0.004	0.004	0.007	0.002	0.004			
8-MF000691, Mediterranean Sea	0.009	0.007	0.007	0.009	0.004	0.007	0.007		
9-MF140344, Chinese waters	0.021	0.017	0.017	0.020	0.015	0.017	0.017	0.015	

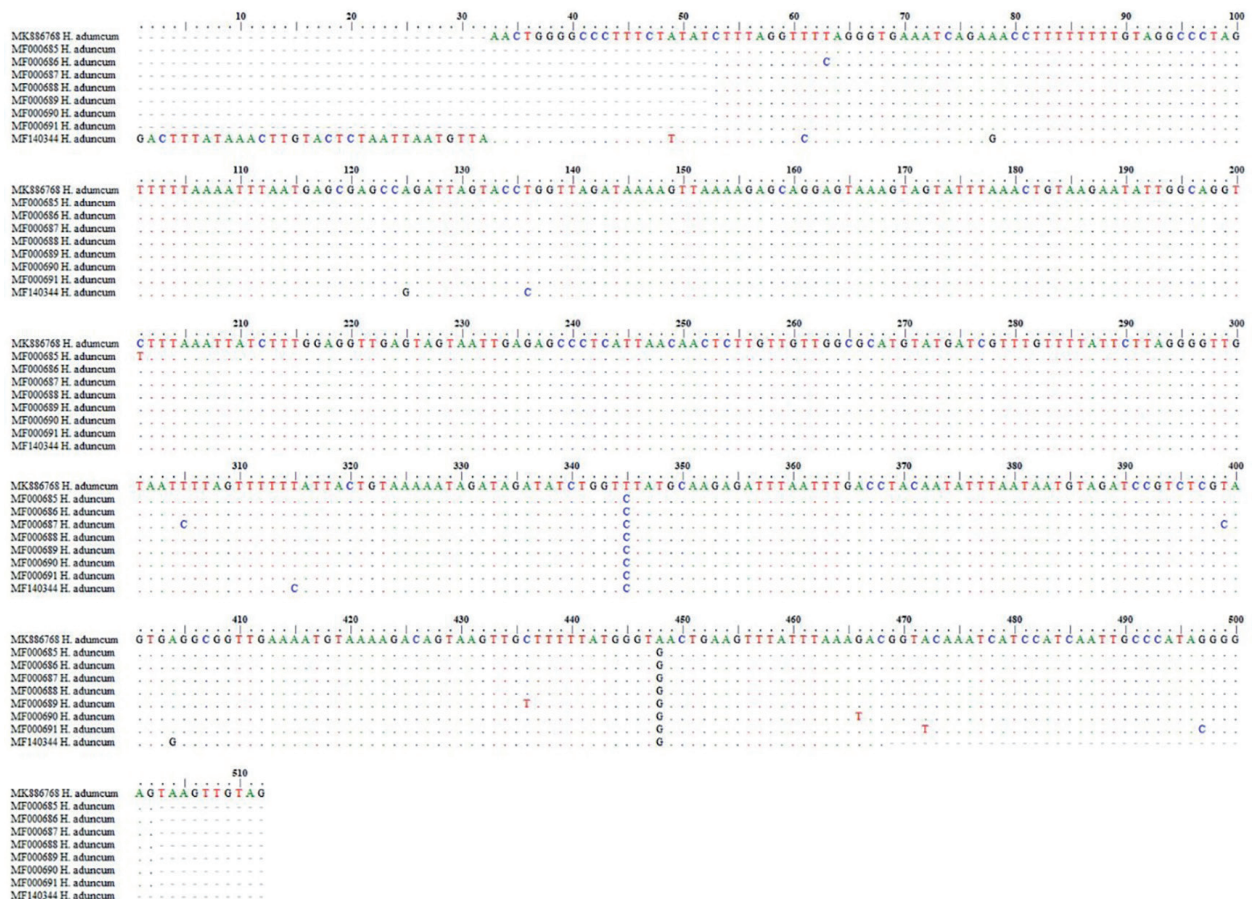


Figure 1. Alignment of the *rrnS* sequences of the *H. aduncum* larvae isolated from Black Sea with respect to the *H. aduncum* have previously been sequenced and deposited in GenBank under the accession numbers. The alignment was performed using BioEdit. Dots indicate identity with the first sequence and dashes are inferred insertion-deletion events.

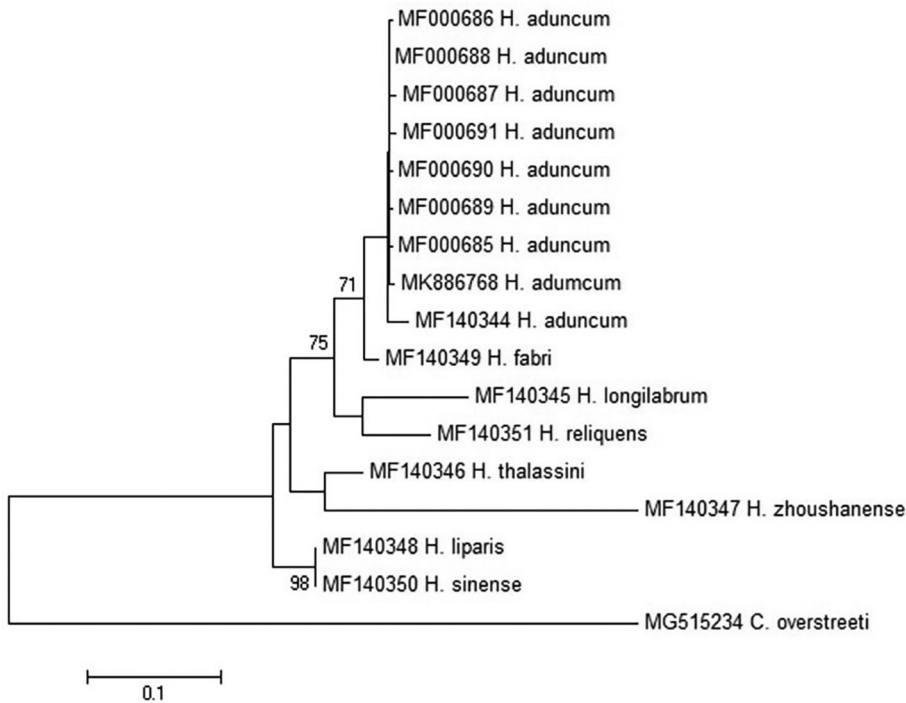


Figure 2. Phylogenetic relationships between *H. aduncum* (MK886768) from the present study and other *H. aduncum* as inferred by maximum likelihood obtained from *rrnS* gene. The scale bar indicates the distance in substitutions per nucleotide. Bootstrap values were calculated over 100 replicates and percentages $\geq 70\%$ are shown at the internal nodes. *C. overstreeti* was used as out group

Discussion

Morphologic identification of larval stage of anisakid and raphidascaridid nematodes is extremely difficult due to the existence of sibling or cryptic species. Therefore, molecular genetic techniques are more reliable for a proper species identification of larval and adult anisakid and raphidascaridid nematodes [12, 28, 18-20, 22, 24-26]. Until now, morphological and molecular data on species of *Hysterothylacium* genus infecting marine fish from Turkish waters have been still not sufficient. To date, only three *Hysterothylacium* species have been molecularly reported from different marine fish species from Turkish waters. *Hysterothylacium aduncum*, *H. fabri* and *H. reliquens* species were genetically characterized based on DNA sequencing of ITS regions and the mitochondrial *cox1* and *cox2* genes from Turkish waters [11, 18, 20, 25]. Moreover, in the present study, larvae of *H. aduncum* infecting *M. merlangus euxinus* caught off the Black Sea, Turkey were characterized for the first time by sequencing of the mitochondrial *rrnS* gene. Phylogenetic analysis revealed that our *H. aduncum* isolate clustered with others known *H. aduncum* sequences in a monophyletic clade in *rrnS* tree (Fig. 1). Furthermore, genetic distance analyses for *rrnS* gene also revealed

a very low intraspecific genetic distance between the obtained *H. aduncum* isolate (MK886768) and other *H. aduncum* isolates previously reported (MF000685-MF000691) from the Mediterranean Sea (p distance=0.004 to 0.009) (Table 1). Low intraspecific genetic variability among *H. aduncum* specimens has also previously been detected in the ITS sequences [2, 9, 12, 14, 18]. Whereas a low level of intraspecific nucleotide difference among the present isolate (MK886768) and others *H. aduncum* isolates (MF000685-MF000691) from the Mediterranean Sea in the *rrnS* sequence, *H. aduncum* only should be considered as a single species. Nevertheless, high intraspecific genetic diversity was detected among our isolate (MK886768) and *H. aduncum* from the Chinese waters (MF140344) in the *rrnS* gene (p distance=0.021) (Table 1). In addition to, geographically distant population of the same *Hysterothylacium* species may be cause intraspecific genetic differences.

Conclusion

In the current study, the mitochondrial *rrnS* gene sequences of *H. aduncum* from the Black Sea are determined for the first time. Sequence analysis of the *rrnS* gene provided a useful approach for the spe-

cific identification of *H. aduncum*. Moreover, these valid genetic data of *H. aduncum* (MF140344) can be used to establish the phylogenetic relationships with *Hysterothylacium* species from the Black Sea and various geographical areas. Further researches using the different genetic markers are required to examine the genetic variability and population's genetic structure within larvae and adult stage of *Hysterothylacium* species from the Turkish waters.

References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215, 403-410.
- Amor N, Farjallah S, Merella P, Said K, Ben Slimane B, (2011). Molecular characterization of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Raphidascaridae) from different fish caught off the Tunisian coast based on nuclear ribosomal DNA sequences. *Parasitol Res.* 109, 1429-1437.
- Berland B, (1961). Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia* 2, 1-50.
- Berland B, (1991). *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda) in fish. *ICES.* 44, 1-4.
- Costa A, Graci S, Cammilleri G, Buscemi MD, Collura R, Vella A, Ferrantelli V, (2018). Molecular identification of *Hysterothylacium* spp. in fishes from the Southern Mediterranean Sea (Southern Italy). *J Parasitol.* 104(4), 398-406.
- D'Amelio S, Barros NB, Ingrosso S, Fauquier DA, Russo R, Paggi L, (2007). Genetic characterization of members of the genus *Contracaecum* (Nematoda: Anisakidae) from fish-eating birds from west-central Florida, USA, with evidence of new species. *Parasitology* 134, 1041-1051.
- Felsenstein J, (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Gazzonis AL, Cavallero S, Zanzani SA, Olivieri E, Malandra R, Ranghieri R, D' Amelio S, Manfredi MF, (2017). *Anisakis* sp. and *Hysterothylacium* sp. larvae in anchovies (*Engraulis encrasicolus*) and chub mackerel (*Scomber colias*) in the Mediterranean Sea: Molecular identification and risk factors. *Food Cont.* 80, 366-373.
- Guo YN, Xu Z, Zhang LP, Hu YH, Li L, (2014). Occurrence of *Hysterothylacium* and *Anisakis* nematodes (Ascaridida: Ascaridoidea) in the tanaka's snailfish *Liparis tanakae* (Gilbert & Burke) (Scorpaeniformes: Liparidae). *Parasitol Res.* 113(4), 1289-1300.
- Hillis DM, Bull JJ, (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst Biol.* 42, 182-192.
- Keskin E, Koyuncu CE, Genc E, (2015). Molecular identification of *Hysterothylacium aduncum* specimens isolated from commercially important fish species of Eastern Mediterranean Sea using mtDNA *cox1* and ITS rDNA gene sequences. *Parasitol Int.* 64(2), 222-228.
- Klimpel S, Kleinertz S, Hanel R, Rückert S, (2007). Genetic variability in *Hysterothylacium aduncum*, a raphidascarid nematode isolated from sprat (*Sprattus sprattus*) of different geographical areas of the northeastern Atlantic. *Parasitol Res.* 101, 1425-1430.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K, (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 33, 1870-1874.
- Li L, Zhang LP, Liu YY, (2013). *Hysterothylacium* simile n. sp. (Nematoda: Raphidascaridae) and *H. aduncum* (Rudolphi, 1802) from marine fishes in the Bohai and Yellow Sea, China, with comments on the record of *H. paralichthydis* (Yamaguti, 1941) in the Chinese waters. *Syst Parasitol.* 84, 57-69.
- Li L, Lü L, Nadler SA, Gibson DI, Zhang LP, Chen HX, Zhao WT, Guo YN, (2018). Molecular phylogeny and dating reveal a terrestrial origin in the early carboniferous for ascaridoid nematodes. *Syst. Biol.* 67(5), 880-900.
- Moravec F, Nagasawa K, Urawa S, (1985). Some fish nematodes from fresh water in Hokkaido, Japan. *Folia Parasitol.* 32, 305-316.
- Moravec, F, Justine JL, (2015). Anisakid nematodes (Nematoda: Anisakidae) from the marine fishes *Plectropomus laevis* Lacépède (Serranidae) and *Sphyræna genie* Klunzinger (Sphyrænidae) off New Caledonia, including two new species of *Hysterothylacium* Ward & Magath, 1917. *Syst Parasitol.* 92(3), 181-195.
- Pekmezci GZ, Bolukbas CS, Gurler AT, Onuk EE, (2013). Occurrence and molecular characterization of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) from *Merlangius merlangus euxinus* and *Trachurus trachurus* off the Turkish coast of Black Sea. *Parasitol Res.* 112, 1031-1037.
- Pekmezci GZ, Onuk EE, Bolukbas CS, Yardimci B, Gurler AT, Acici M, Umur S, (2014a). Molecular identification of *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) from marine fishes collected in Turkish waters. *Vet Parasitol.* 201, 82-94.
- Pekmezci GZ, Yardimci B, Onuk EE, Umur S, (2014b). Molecular characterization of *Hysterothylacium fabri* (Nematoda: Anisakidae) from *Zeus faber* (Pisces: Zeidae) caught off the Mediterranean coasts of Turkey based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Parasitol Int.* 63, 127-131.
- Pekmezci GZ, Umur S, (2015). Presence of *Hysterothylacium gadi aduncum* (Rudolphi, 1802) (Anisakidae) in cultured Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) in fresh water farms from Turkey and its mortality. *Iran J Fish Sci.* 14(1), 150-157.
- Pekmezci GZ, Yardimci B, (2019). On the occurrence and molecular identification of *Contracaecum* larvae (Nematoda: Anisakidae) in *Mugil cephalus* from Turkish waters. *Parasitol Res.* 118(5), 1393-1402.
- Peter AJ, Maillard C, (1988). Larves d'ascarides parasites de poissons en Méditerranée occidentale. *Bull Mus Natl Hist Nat.* 10 (sect. A), 347-369.
- Simsek E, Ciloglu A, Aypak S, Yildirim A, Aldemir OS, Unlu AH, Pekmezci GZ, (2016). First molecular charac-

- terization of *Raphidascaris acus* Bloch, 1779 (Nematoda: Anisakidae) from European eels (*Anguilla anguilla* Linnaeus, 1758) caught off the Aegean Region streams, Turkey. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 22 (4), 529-532.
25. Simsek E, Ciloglu A, Yildirim A, Pekmezci GZ, (2018). Identification and molecular characterization of *Hysterothylacium* (Nematoda: Raphidascarididae) larvae in bogue (*Boops boops* L.) from the Aegean Sea, Turkey. Kafkas Univ Vet Fak Derg 24, 525-530.
26. Tedesco P, Gustinelli A, Caffara M, Patarnello P, Terlizzi A, Fioravanti ML, (2018). *Hysterothylacium fabri* (Nematoda: Raphidascarididae) in *Mullus surmuletus* (Perciformes: Mullidae) and *Uranoscopus scaber* (Perciformes: Uranoscopidae) from the Mediterranean. J. Parasitol. 104(3), 262-275.
27. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673-4680.
28. Zhu X, Gasser RB, Podolska M, Chilton NB, (1998). Characterization of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. Int J Parasitol. 28, 1911-1921.

Enfeksiyöz Nekrotik Hepatitis Aşısının Üretiminde Poli (D, L-Laktik-Ko-Glikolik Asit) (PLGA) Biyopolimerinin Adjuvant Etkisinin Araştırılması*

Zehra Akıncı¹, Hakan Kalender²

¹Sanovel İlaç San. ve Tic. A.Ş., İstanbul, Türkiye

²Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Elazığ, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 22.03.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 17.06.2019

Özet: Bu çalışmada, koyunların enfeksiyöz nekrotik hepatitis hastalığına karşı alüminyum hidroksit ve poli (D, L-Laktik-Ko-Glikolik Asit) (PLGA) adjuvantları kullanılarak üretilen aşılarda oluşturduğu bağışıklık düzeyleri karşılaştırıldı. *Clostridium novyi* tip A kültürünün formol ile inaktivasyonundan sonra, alüminyum hidrokside adsorbe edilmiş ve çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi uygulanarak PLGA (laktid/glikolid oranı: (50/50), moleküler ağırlık: 30.000-60.000 dalton) ile enkapsüle edilmiş antijen içeren iki farklı toksoid aşı hazırlandı. Aşıların oluşturduğu bağışıklık düzeyini belirlemek için 5-6 aylık ve ağırlıkları 400-500 gr olan erkek kobaylar kullanıldı. Her biri 10 kobaydan oluşan 3 grup oluşturuldu. Birinci gruptakilere 21 gün arayla çift doz (2 ml+2ml) alüminyum hidroksitli aşı, ikinci gruptakilere PLGA mikrosferli aşı tek doz (2 ml) ve üçüncü gruptakilere PLGA mikrosferli aşı yarım doz (1ml) derialtı yolla verildi. Birinci gruptaki kobaylardan rapel aşılamaadan, ikinci ve üçüncü gruptaki kobaylardan tek doz aşılamaadan sonraki 15, 30 ve 45'inci günlerde kalpten kan örnekleri alınarak havuzlanmış serum örnekleri elde edildi. Kan serumlarındaki antikor düzeyi fare Toksin Nötralizasyon Test (TNT) ile belirlendi. Tek doz mikrosferli aşı ile çift doz alüminyum hidroksitli aşı uygulamalarından sonraki 30'uncu ve 45'inci günlerde aynı düzeyde antikor (8 IU/ml) saptandı. Ancak 15'inci günde çift doz alüminyum hidroksitli aşının antikor düzeyi 4 IU/ml iken, tek doz PLGA mikrosferli aşının antikor düzeyi 2 IU/ml olarak bulundu. Yarım doz PLGA mikrosferli aşı verilen kobaylarda yeterli düzeyde (antikor titresi < 2.5 IU/ml) bağışıklık elde edilemedi. Sonuç olarak, tek dozlu veteriner aşılarda geliştirilmesi amacıyla farklı polimer tipi ve enkapsulasyon yöntemleri kullanılarak daha geniş kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Adjuvant, alüminyum hidroksit, aşı, *Clostridium novyi*, PLGA

Investigation of Adjuvant Effect of Poly (D, L-Lactic-Co-Glycolic Acid) (PLGA) Biopolymer in the Vaccine Production Against Infectious Necrotic Hepatitis

Abstract: In this study, immunity levels of the vaccines produced by using aluminum hydroxide and Poly (D, L-Lactic-Co-Glycolic Acid) (PLGA) adjuvants against infectious necrotic hepatitis of sheep were compared in guinea pigs. After the culture of *Clostridium novyi* tip A was inactivated by formaldehyde, the two different toxoid vaccines containing antigen adsorbed onto aluminum hydroxide and encapsulated in PLGA (lactide/glycolide ratio: (50/50), molecular weight: 30.000-60.000 dalton) were prepared. Encapsulation of antigen in PLGA particles was performed by double emulsion solvent evaporation method. Male guinea pigs (400-500 g, 5-6 months old) were used to determine the immune response to vaccination. Animals were divided into 3 groups with 10 in each group. The first group received double dose aluminum hydroxide-adsorbed vaccine (2 ml + 2 ml) with 21 days intervals, the second group received a single PLGA microsphere vaccine (2 ml) and the third group received a half dose PLGA microsphere vaccine (1 ml) subcutaneously. At 15th, 30th and 45th days after booster dose in the first group and a single dose in the other groups, blood samples were taken from the heart and pooled serum samples were obtained. Antibody levels in the pooled serum samples were determined by the mouse Toxin Neutralization Test (TNT). The same antibody level (8 IU/ml) was determined at 30th and 45th days after vaccination with double dose aluminum hydroxide-adsorbed vaccine and a single dose PLGA microsphere vaccine. However, on day 15, the antibody level of the double dose aluminum hydroxide-adsorbed vaccine was 4 IU/ml and the antibody level of the single dose PLGA microsphere vaccine was found to be 2 IU/ml. A half dose of PLGA microsphere vaccine did not produce a sufficient immun response (antibody titer < 2.5 IU/ml). In conclusion, more extensive studies should be done to develop single-dose veterinary vaccines by using different polymer types and encapsulation methods.

Key words: Adjuvant, aluminum hydroxide, vaccine, *Clostridium novyi*, PLGA

* Bu çalışma birinci yazarın yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

Yazışma adresi / Correspondance: Hakan Kalender, Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Elazığ
E-mail: hkalender@firat.edu.tr, hkalender061@gmail.com

Giriş

Aşılar, insan ve hayvanları enfeksiyonlara karşı koruyan biyolojik maddelerdir [34]. İlk aşı 1796 yılında Edward Jenner tarafından çiçek hastalığına karşı uygulanmıştır [29]. Aşılama, enfeksiyon hastalıklardan korunmak için maliyeti en düşük ve etkili yöntemlerden biri olarak kabul edilir [8, 25]. Bir aşı tipik olarak hastalık etkenlerinin ölü ya da hastalık yapma gücü zayıflatılmış formları, mikroorganizmaların toksinleri veya yüzey proteinlerini içermektedir [34]. Konvansiyonel yöntemlerle hazırlanan canlı (atenue), ölü (inaktif) ve toksoid aşılar halen başarılı bir şekilde uygulanmaktadır [5]. Son yıllarda moleküler biyoloji ve immünolojideki gelişmelere paralel olarak DNA aşıları, rekombinant DNA aşıları ve rekombinant subunit aşılar gibi biyoteknolojik aşılar geliştirilmiştir [8]. Canlı aşılar hem hücrel hem de humoral immün yanıtı uyatarak daha güçlü bağışıklık oluştururlar. Ancak bağışıklık sistemi zayıf canlılarda aşı içerisindeki mikroorganizmanın hastalığa yol açması ve apatojen suşun yeniden patojen özellik kazanması dezavantaj oluşturmaktadır [10]. Ölü aşıların hastalığa yol açma riski yoktur fakat canlı aşılarla göre daha kısa süreli bir yanıt oluştururlar. Özellikle hücrel bağışıklık daha zayıf şekillenir [26]. Uzun süreli ve yeterli bir bağışıklığın elde edilebilmesi için ölü aşıların adjuvantlarla birlikte verilmesi ve rapel dozların uygulanması gerekir [25].

Adjuvantlar aşı antijenlerinin immunojenik özelliğini artıran maddelerdir [39]. İlk adjuvant 1920 yılında keşfedilmiştir. Daha sonraki yıllarda adjuvant etkisi gösteren birçok madde keşfedilmesine rağmen toksik etkilerinden dolayı aşı ile kullanımını kabul görmemiştir. Alüminyum tuzları, MF59, ASO3, ASO4 ve virozomlar insan aşılarında kullanılan lisanslı adjuvantlardır [26]. Adjuvantlar depo etkisi göstererek antijenlerin yavaş salınımını sağlarlar ve bağışıklığın şekillenmesinde görev alan antijen sunan hücreler, B ve T lenfositlerinin nonspesifik aktivasyonuna yol açarlar [13]. Adjuvantlarla birlikte alınan antijenlerin çoğu dendritik hücreler tarafından lenf nodüllerine taşınır. Dendritik hücreler, makrofajlar ve B lenfositleri gibi antijen sunan hücreler antijeni işler ve büyük doku uyusum kompleks molekülleri içerisinde T hücrelerine sunarlar [39]. Alüminyum tuzları, adjuvant olarak hem insan hem de hayvan aşılarında uzun zaman

dan beri yaygın olarak kullanılmaktadır. Genellikle Th2 hücrelerinin uyarılmalarını sağladıklarından humoral bağışıklığın şekillenmesinde etkindirler [26]. Bu adjuvantlar güvenlidir, ancak nadir de olsa alerjik reaksiyonlar ve granulomların oluşumuna yol açabilirler [39].

Nanopartiküller yaklaşık 40 yıl önce aşıların ve kanser tedavisinde kullanılan ilaçların taşınması amacıyla geliştirilmiştir. Doğal veya sentetik polimerlerle hazırlanan nanopartiküllerin boyutları 10-1000 nm arasında değişmektedir [24]. Polimerler aşı antijenini korur ve depo görevi yaparak antijenin kontrollü salınımını sağlarlar. Polimerik partiküllerin tek doz aşıların ve mukozal aşıların geliştirilmesinde etkili olduğu bildirilmiştir [29]. Klasik adjuvantlarla karşılaştırıldığında toksik olmamaları, biyouyumlu ve biyobozunur olmaları önemli bir avantaj sağlamaktadır. Polimerler hem hücrel hem de humoral bağışık yanıtı uyarırlar [35]. PLGA doku mühendisliğinde ve aşıların kontrollü salınımı için en fazla kullanılan ve FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanan bir polimerdir [20]. Son yıllarda insan [16, 17, 21, 28, 32, 33, 36, 43] ve hayvan [37, 38, 40] aşılarının geliştirilmesinde PLGA biyopolimerinin etkinliği üzerinde birçok çalışma yapılmıştır.

Ülkemizde koyun yetiştiriciliğinde ekonomik kayıplara neden olan enfeksiyöz nekrotik hepatitis hastalığı akut, toksemik ve karaciğer nekrozları ile karakterize, öldürücü bakteriyel bir hastalıktır. Hastalık bazen sığırlarda da görülür. Hastalığın etkeni *Clostridium novyi* tip B'dir. Hastalığın oluşumunda bakterinin ürettiği özellikle alfa toksin önemli bir rol oynamaktadır [3]. Hastalıktan korunmada ülkemizde özel sektör tarafından üretilen veya ithal edilen toksoid aşılar kullanılmaktadır. Ancak yeterli bağışıklık elde etmek için 21 gün arayla aşının ikinci dozunun verilmesi gerekir. Tek doz aşı hayvanları korumamaktadır [22]. Literatür bilgisine göre, insan toksoid aşılarının geliştirilmesinde PLGA kullanılmış olmakla birlikte, bir hayvan aşısı olan enfeksiyöz nekrotik hepatitis toksoid aşısının geliştirilmesinde PLGA'nın etkisi daha önce araştırılmamıştır. Bu çalışmada, enfeksiyöz nekrotik hepatitis hastalığına karşı klasik yöntemlerle üretilen alüminyum hidroksitli aşının çift dozu ile PLGA kullanılarak üretilen aşının tek dozunun etkinliğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışma için Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'nın 05.10.2016 tarih, 2016/17 sayı ve 160 nolu kararı ile etik kurul onayı alındı.

Bakteri Suşu ve Standart Toksin: Aşı üretiminde kullanılan *C. novyi* tip A (UK) suşu ve Toksin Nötralizasyon Testinde (TNT) kullanılan *C. novyi* tip A alfa (α) standart toksin (L+/20, Dilüsyon Oranı: 1/6) Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden satın alındı.

Deney Hayvanları: Üretilen aşının bağışıklık gücünü ölçmede kullanılan 5-6 aylık, 400-500 gr ağırlığındaki 30 adet erkek kobay (Guinea pig) ile toksin titresinin belirlenmesi, detoksifikasyon kontrolü ve TNT testinde kullanılan 4 haftalık 18-20 gr ağırlığındaki erkek fareler (Balb/c) Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edildi. Kobaylardan deneme öncesi kan örnekleri alındı ve TNT testi ile kan serumlarında antikor olmadığı belirlendi.

Poli (D, L-Laktik-Ko-Glikolik Asit) (PLGA): Antijenin kapsüllenmesinde PLGA (Sigma, lactide/glycolide: (50/50), MW: 30.000-60.000) biyopolimeri kullanıldı.

Aşı Üretim Çalışmaları: Liyofilize *C. novyi* tip A suşu 1 ml Tarrozi buyyon sıvısı ile sulandırıldı. Bu sulandırmadan 0.5'er ml alınarak daha önce kaynatılıp soğutulmuş iki adet Tarrozi buyyon tüplerine ekim yapıldı ve 37°C'de 24 saat anaerobik ortamda inkubasyona bırakıldı. Tarrozi buyyon kültüründen Gram boyama yapıldı ve besiyerlerine ekimler yapılarak süşun saf olup olmadığı kontrolü edildi. *C. novyi* dışında herhangi bir mikroorganizma üremedi. Saflik kontrolünden sonra Tarrozi buyyon kültürleri, içerisinde bir litre Ardehali besiyeri bulunan şişeye aktarıldı. Bu besiyeri anaerobik gaz paketi içeren anaerobik jar içerisinde kondu ve 37°C'de 72 saat anaerobik ortamda inkubasyona bırakıldı. Fareler (Balb/c) kullanılarak Ardehali besiyerinde üreyen *C. novyi* kültürünün alfa toksin titresini belirlendi ve minimal letal doz (MLD₅₀/ml) değerleri saptandı. İnaktivasyon için kültüre %0.6 oranında formol katıldı ve 10 gün 37°C'de bekletildi. İnaktivasyon işlemi takiben kültürden numune alınarak canlılık ve detoksifikasyon kontrolü yapıldı. Canlılık kontrolü için kıymalı buyyon, Tarrozi

buyyon, nutrient buyyon (LAB068, LAB M) ve nutrient agara (LAB008, LAB M) ekim yapıldı ve besiyerleri 37°C'de 1 hafta inkubasyona bırakıldı. Kültürün detoksifikasyon kontrolü farelerde yapıldı. Daha sonra 1 litrelik kültürün yarısı alüminyum hidroksit ile adjuvantlama için ayrıldı. Diğer yarısı ise PLGA mikrosferlerinin hazırlanması için ayrı bir şişeye aktarıldı.

Alüminyum Hidroksit ile Adjuvantlama: Herhangi bir bakteri ve aktif toksin içermediği belirlenen anakültür ve toksoid karışımına alüminyum hidroksit %20 oranında ve %80'lik fenol solüsyonu %0.32 oranında katıldı. Oda ısısında bekletilen ana kültür ve toksoid karışımı 2 gün süre ile çalkalayıcı (Mipro) ile 50 rpm'de karıştırılarak adjuvanta adsorbe edildi. Sterilite kontrolü için; aerobik bakteriler yönünden kanlı agara, anaerobik bakteriler yönünden kıymalı buyyona, mikoplazmalar yönünden PPLO agara (Difco) ve mantarlar yönünden sabouraud dextrose agara (Difco) ekim yapıldı. Zararsızlık kontrolü için 2 adet kobaya derialtı yolla 0.5 ml aşı verilerek aşılandı ve yan etkiler yönünden gözlem altına alındı. Aşı +4°C'de buzdolabında saklandı [6].

PLGA Mikrosferlerinin Hazırlanması: PLGA mikrosferleri çift emülsiyon çözücü buharlaştırma metoduna göre hazırlandı [17]. Kısaca, 2 ml toksoid içerisine %1.5 oranında trehaloz ve %2 oranında Mg(OH)₂ katıldı. Bunun üzerine metilen klorid içerisinde hazırlanmış %5'lik PLGA solüsyonundan 25 ml ilave edilerek süspanse edildi. Daha sonra 50 W ve 10 saniye süre uygulanarak ultrasonik homojenizatörde (Bandelin) homojenize edildi. Bu emülsiyona %1'lik polivinil alkolden (PVA) 100 ml eklendi ve homojenizatör (Heidolph Silent CrusherS) ile yüksek hızda (30.000 rpm) 10 saniye süreyle karıştırıldı. Bu emülsiyon 125 ml %0.3'lük PVA içerisine boşaltıldı ve 1 saat karıştırıldı. Daha sonra santrifüj işlemi uygulanarak mikrosferler toplandı ve distile su ile yıkandı. Mikrosferler vakumlu desikatörde kurutuldu ve +4 °C'de buzdolabında saklandı. Bir aşı dozu (2 ml) toksoid miktarı (1/4000 MLD₅₀/ml) kullanıldığında yaklaşık 1 gr kurutulmuş mikrosfer elde edildi. Tüm hayvanları aşılayacak miktarda mikrosferler hazırlandı.

Taramalı Elektron Mikroskop ile Mikrosferlerin İncelenmesi: Mikrosferlerin büyüklüğü ve şekli Fırat Üniversitesi Merkez

Laboratuvarı'nda bulunan Zeiss EVO MA10 marka taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelendi.

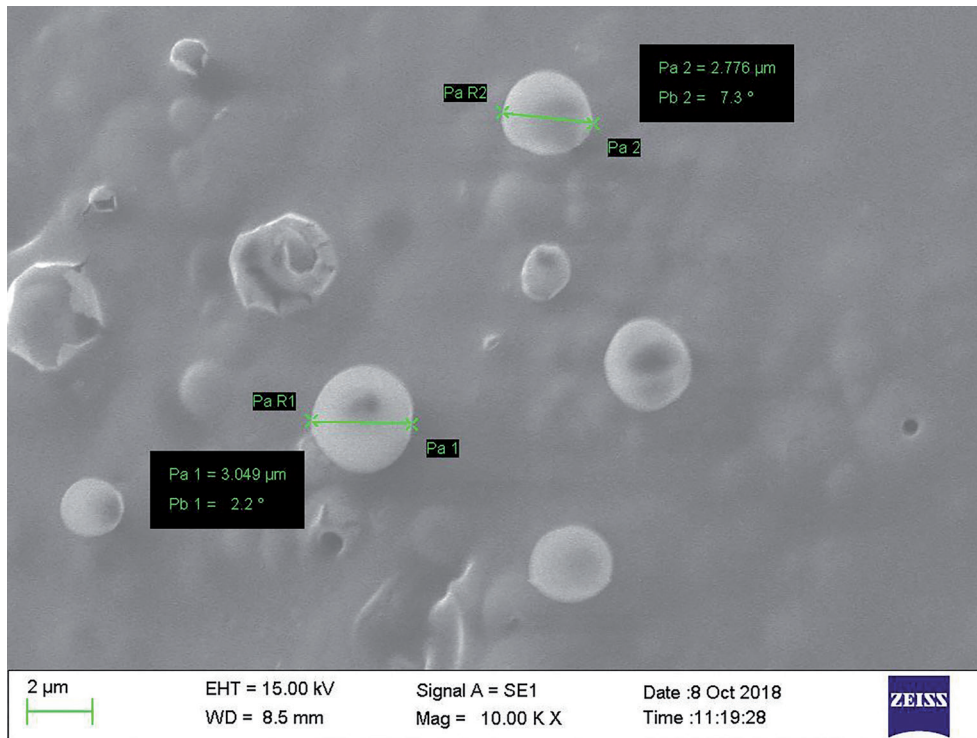
PLGA Mikrosferlerinin İçindeki Antijen Miktarının Belirlenmesi: PLGA mikrosferlerinin içindeki yüklü protein miktarı Lowry metodu ile belirlendi [30].

Bağışıklık Kontrolü: Hayvanları bağışıklamak için, kurutulmuş mikrosferler (15 gr) 30 ml PBS ile sulandırıldı. Alüminyum hidroksit adjuvantlı ve PLGA mikrosferli aşının bağışıklık testleri için her biri 10 kobaydan (5-6 aylık, 400-500 gr) oluşan 3 grup oluşturuldu. Birinci gruptaki kobaylara 21 gün ara ile 2 ml alüminyum hidroksit adjuvantlı aşı deri altı yolla çift doz verildi. İkinci gruptaki kobaylara PLGA mikrosferli aşından 2 ml, üçüncü gruptaki kobaylara PLGA mikrosferli aşından 1 ml deri altı yolla tek doz enjekte edildi. Birinci gruptaki hayvanlardan ikinci aşılama, ikinci ve üçüncü gruptaki hayvanlardan tek doz aşılama 15, 30 ve 45 gün sonra kalpten kan alınarak serumlar elde edildi. Her gruptaki hayvanların serumları havuzlanarak bir tüpte toplandı. Kobay kan serumlarında en az 2.5 IU/ml düzeyinde antitoksinin varlığı farelerde Toksin Nötralizasyon Test (TNT) ile belirlendi [6, 22].

Bulgular

Tarrozi buyyonda üreyen ana tohum suşu kültüründen yapılan Gram boyamada Gram pozitif, çomak şeklinde bazıları sporlu *C. novyi* bakterileri görüldü. Safılık kontrolünde suşun saf olduğu belirlendi. Toksin üretim ortamı olarak kullanılan Ardehali besiyerinde üreyen kültürdeki *C. novyi* alfa toksin titresinin 1/4000 MLD₅₀/ml olduğu tespit edildi. Aşı kültürünün inaktivasyonundan sonra yapılan canlılık testinde herhangi bir mikroorganizma üremesi ve detoksifikasyon kontrolünde farelerde ölüm gözlemlenmedi. Deneysel olarak üretilen aşının aerobik ve anaerobik bakteriler, mikoplazmalar ve mantarlar yönünden yapılan sterilite testinde herhangi bir üreme saptanmadı. Kobaylarda yapılan zararsızlık testi sonucunda, hayvanlarda herhangi bir olumsuz reaksiyon gözlemlenmedi.

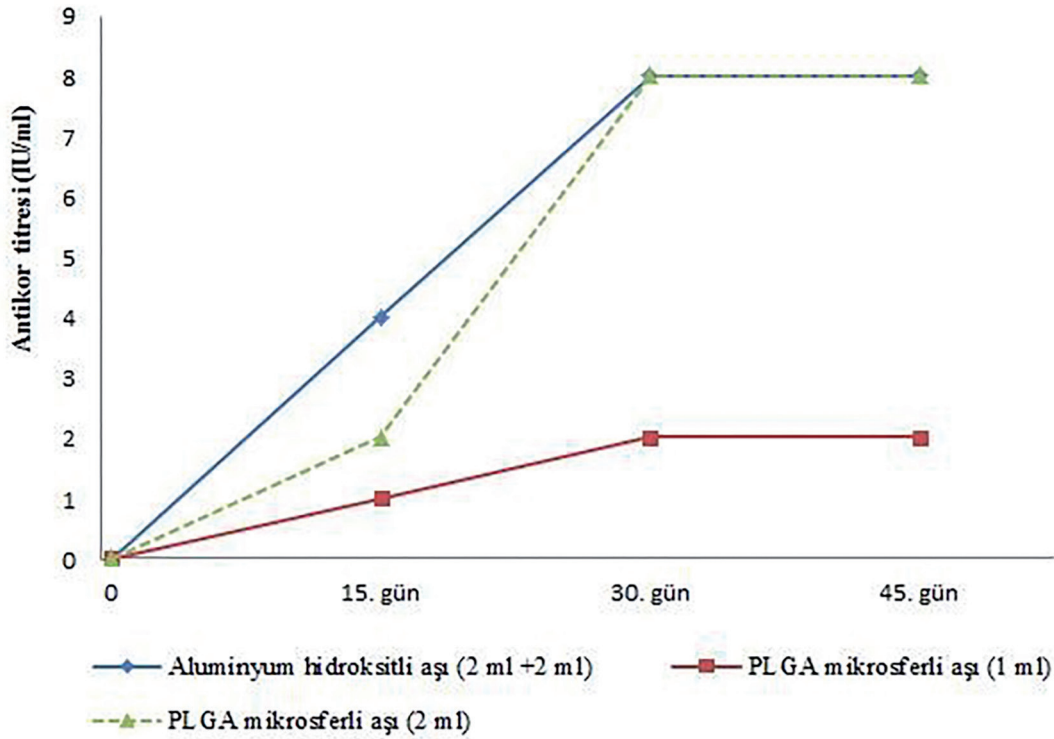
PLGA biyopolimeri ile kapsülleme işlemi sonrasında antijenin %88 oranında mikrosferler içerisine yüklendiği saptandı. Taramalı elektron mikroskop analizinde mikrosferlerin çoğunun düzgün yuvarlak şekilli olduğu görüldü. Bazı alanlarda kırık ve delik mikrosferler tespit edildi. Mikrosfer çaplarının ölçümü sonucunda çoğunun 1-5 µm çapında olduğu belirlendi (Şekil 1).



Şekil 1. PLGA mikrosferlerinin SEM görüntüsü.

Alüminyum hidroksit adjuvantı katılmış aşı ile çift doz (2 ml+2 ml) aşılanmış kobayların kan serumlarında antikor düzeyi 15'inci günde 4 IU/ml, 30'uncu ve 45'inci günlerde 8 IU/ml olarak belirlendi. Bununla birlikte PLGA mikrosferli aşı ile tek doz (2 ml) aşılanmış kobayların kan serumlarında antitoksin düzeyi 15'inci günde 2 IU/ml, 30'uncu ve 45'inci günlerde 8 IU/ml, PLGA mikrosferli aşı ile yarım doz (1 ml) aşılanmış kobayların kan serumlarında antikor düzeyi 15'inci günde 1 IU/ml,

30'uncu günde ve 45'inci günde 2 IU/ml olarak tespit edildi. Alüminyum hidroksit adjuvantlı aşı ile ikinci aşılamadan ve PLGA mikrosferli aşının tek doz uygulanmasından sonra hayvanlardaki bağışıklık düzeyi, uluslararası standartlara göre minimum olması gereken düzeyin (2.5 IU/ml) üzerinde bulundu. Bununla birlikte 1 ml PLGA mikrosferli aşı verilen hayvanlarda yeterli bağışıklık düzeyi sağlanamadı (Şekil 2).



Şekil 2. PLGA mikrosferli ve alüminyum hidroksitli aşılar ile aşılama sonrası oluşan antikor titreleri.

Tartışma ve Sonuç

İnsan ve hayvan aşılarının geliştirilmesinde nanoteknolojinin kullanımı son yıllarda önem kazanmıştır [23]. PLG ve PLGA gibi sentetik polimerler mükemmel biyobozunur ve biyouyumlu polimerlerdir. Bu nedenle nanopartikül hazırlamada yaygın olarak kullanılmaktadırlar [1, 31]. Sentetik polimerlere ilave olarak aljinat ve kitosan gibi polisakkarit yapıdaki doğal polimerler de nanopartiküllü aşıların hazırlanmasında kullanılmıştır [12, 17, 27].

Bu çalışmada, laboratuvarında küçük ölçekte enfeksiyöz nekrotik hepatitıs hastalığı aşısı üretilmiş

ve adjuvant olarak alüminyum hidroksit ve PLGA biyopolimeri kullanılmıştır. Kobayları aşılamadan sonraki 15'inci günde alüminyum hidroksit adjuvantlı çift doz aşının antikor titresi 15'inci günde 4 IU/ml iken, tek doz verilen PLGA mikrosferli aşının antikor titresi 2 IU/ml olarak belirlenmiştir. Ancak 30'uncu ve 45'inci günlerde çift doz alüminyum hidroksit adjuvantlı aşı ile tek doz PLGA mikrosferli aşının antikor titresi aynı seviyede (8 IU/ml) bulunmuştur. PLGA mikrosferli aşı yarım doz (1 ml) verildiğinde uluslararası kabul edilen titrenin (2.5 IU/ml) altında bir titre elde edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, PLGA mikrosferli enfek-

siyöz nekrotik hepatitis aşısının tek dozunun yeterli bir bağışıklık oluşturduğunu göstermektedir. Daha önce PLGA mikrosferli enfeksiyöz nekrotik hepatitis aşısı ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmadığından tespit edilen antikor titrelerini karşılaştırmak mümkün olmamıştır. Bununla birlikte bu çalışmaya benzer bir şekilde tek doz PLGA mikrosferli insan tetanoz [17], difteri [43] ve hepatit B [16] aşılarında da yeterli bir bağışıklık düzeyi elde edilmiştir.

Bu çalışmanın sonuçları, kapsülleme esnasında bir miktar antijeninin kaybına rağmen 30'uncu günden sonra tek doz PLGA mikrosferli ve çift doz alüminyum hidroksitli aşının aynı düzeyde bağışıklık seviyesine ulaştığını göstermektedir. 15'inci günde PLGA mikrosferli aşının antikor titresinin düşük olması mikrosferler içerisinde ilk günlerde antijenin yavaş salınımından kaynaklanabilir. Polimerik partikül büyüklüğü, polimerin molekül ağırlığı ve hidrofobitesi gibi faktörler antijen salınım süresini etkilemektedir. Düşük hidrofobite ve daha küçük partikül büyüklüğüne sahip mikrosferden daha hızlı antijen salınımı gerçekleşir. Hidrofobitesi yüksek ve daha büyük partiküllü mikrosferden antijen salınımı çok yavaştır [18]. PLGA polimerinin bozunma yarı ömrünün polimerin monomer kompozisyonuyla ilişkili olduğu, glikolid/laktid oranı 50/50 olduğunda bozunma yarı ömrünün minimum düzeyde gerçekleştiği bildirilmiştir [9]. Bununla birlikte laktid/glikolid oranı 75/25 olarak arttığında PLGA'nın bozunma oranının laktid/glikolid oranı 50/50 olan PLGA'dan daha hızlı olduğu saptanmıştır [15]. Diğer bir çalışmada ise, en yavaş hepatit B antijeni salınımı, laktid/glikolid oranı 50/50 olan PLGA polimeri kullanıldığında elde edilmiştir [36]. Partikül büyüklüğü 10 µm'den küçük mikrosferler hemen antijen sunan hücreler (dendritik hücreler ve makrofajlar) tarafından alınır ve adjuvant etkisi hemen başlar. Bundan daha büyük mikrosferler enjeksiyon yerinde kalır, yavaş yavaş antijen salınımı gerçekleşir [19]. Thomas ve ark. [41] tarafından yapılan bir çalışmada, 5µm çapındaki hepatit B antijeni yüklü mikrosferlerin 12 µm çapındakilerden daha güçlü bir immun yanıt oluşturduğu saptanmıştır. Eldridge ve ark. [11] tarafından yapılan çalışmada ise, stafilokok enteroksin B toksoidi yüklü 10 µm'den küçük PLGA mikrosferlerinin daha güçlü immune yanıt oluşturduğu belirlenmiştir. Gutierrez ve ark. [14], 200, 500 ve 1000 nm büyüklüğündeki BSA yüklü

PLGA partiküllerinin farelerde oluşturduğu antikor miktarlarını karşılaştırmışlar, küçük partiküllerden başlangıçta antijen salınımının daha yavaş olduğu fakat 1000 nm büyüklüğündeki partiküllerin daha yüksek IgG oluşumuna yol açtığını bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise, antijenin kapsüllenmesinde laktid/glikolid oranı 50:50 ve molekül ağırlığı 30.000-60.000 dalton olan PLGA biyopolimeri kullanılmış ve mikrosferlerin çoğunun çapı 5 µm'den küçük bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları laktid/glikolid oranı 50:50 olan PLGA polimerin *C. novyi* toksoidinin enkapsülasyonu için kullanılabileceğini göstermektedir.

Koyunların enfeksiyöz nekrotik hepatitis hastalığı etkeni olan *C. novyi* tip B ekstraselüler toksinler (alfa, beta, zeta ve eta) üretir. Bu toksinler letal, ödematöz ve sitotoksik aktiviteye sahiptir. Bu bakterinin sebep olduğu hastalıktan korunmada toksoid aşılardan yararlanılmaktadır. Alfa toksini etkili toksin olup bu toksini içeren aşılardan koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir [3, 7]. Bu çalışmada saptanan antikor titreleri, aynı suş kullanılarak Baş ve Alp [6] tarafından hazırlanan monovalan ve kombine aşılardan elde edilen alfa antitoksin (antikor) değerinden (>10) biraz düşük bulunmuştur. Bu farklılık aşı hazırlama tekniğinin farklılığından kaynaklanabilir. Baş ve Alp [6], aşığı hazırlarken ultrafiltrasyon yöntemiyle konsantrasyon gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar ultrafiltrasyon cihazı ile 10.000-30.000 dalton büyüklüğündeki molekülleri filtre etmek suretiyle kültürü 3 kat konsantre ederek, kültürün hacmini düşürmüşlerdir. Fakat bizim çalışmamızda konsantrasyon işlemi uygulanmamıştır. Konsantre edilmiş aşı içerisindeki antijen miktarının fazla olması daha yüksek oranda antikor oluşumuna neden olabilir. Nitekim Amitoo ve ark. [2], *C. novyi* tip B toksoid aşısının kobaylara verdikleri aşı miktarını azalttıklarında antikor titresinin düştüğünü belirlemişlerdir.

Aşı bağışıklık çalışmalarında elde edilen antikor titreleri hayvan türlerine göre değişebilmektedir. *C. novyi* aşısının bağışıklık çalışmaları tavşanlarda yapıldığında elde edilen titreler, kobaylarda elde edilen titrelerle göre 3-10 kat daha düşük bulunmuştur [42]. Baş ve Alp [6], alüminyum hidroksitli *C. novyi* aşısının bağışıklık testini hem kobaylarda hem de koyunlarda yapmışlar, kobaylarda 10 IU/ml'nin üzerinde ve koyunlarda 2.5-5 IU/ml

titre elde etmişlerdir. Kılıç ve Kılınc [22], alüminyum hidroksit adjuvantlı enfeksiyöz nekrotik hepatitis aşısı uygulanan koyunlarda aşının oluşturduğu bağışıklık düzeyini araştırmışlar, çift doz aşının 2. ayda antikor titresini 16 IU/ml düzeyinde tespit etmişlerdir. Her iki çalışmada da havuzlanmış serum örnekleri kullanılmıştır.

Önceki çalışmalar PLGA ile kapsülleme işleminde ilave edilen trehalozun toksoid içindeki antijenin stabilitesini artırdığını göstermektedir. PLGA'nın hidrolizi sonucu laktik ve glikolik asit açığa çıktığından mikrosferler içinde pH 3'ün altına düşer. Asidik pH'yı nötralize etmek için $Mg(OH)_2$ katılır. Trehaloz kapsülleme esnasında organik çözücülerden antijenik proteini korur. Trehaloz sulu ortamda kayda değer çözünürlüğe sahiptir. Trehalozlu ortamda antijen salınımı daha hızlıdır [16]. Protein stabilizatörü olarak sığır serum albümin (BSA), manntitol ve sükröz kullanılmasına rağmen antijenin yapısının korunması ve daha iyi salınım için sadece trehalozun etkili olduğu, kapsülleme işleminde trehaloz konsantrasyonu % 0.5'den %2'ye artırıldığında, antijen salınımının da %80-90 oranına ulaştığı, trehalozsuz mikrosferlerdeki yüklü protein miktarının %30-40 oranında olduğu bildirilmiştir [17]. Bununla birlikte, Quintilio ve ark. [32] tarafından yapılan bir çalışmada, protein stabilizatörü içermeyen PLGA mikrosferleriyle kapsüllenmiş tetanoz ve difteri aşuları uygulanan fare ve kobaylarda yeterli düzeyde bağışıklık elde edilmiştir. Yapılan bu çalışmada, mikrosferlerin hazırlanmasında antijen kaybını önlemek için toksoid içerisine %1.5 oranında trehaloz ve %2 oranında $Mg(OH)_2$ katılmıştır. Mikrosferler hazırlanırken eklenen toksoid içerisindeki proteinin yaklaşık %88'i mikrosferler içerisine yüklenmiştir. Protein miktarında yaklaşık % 12 oranında bir kayıp görülmesine rağmen çift doz alüminyum hidroksitli aşıyla aynı seviyede bağışıklık elde edilmiştir. Jaganathan ve ark. [17], trehaloz ilave ederek tetanoz antijenini PLGA ve kitosan ile kapsüllediklerinde mikrosferler içine protein yüklenme oranının %90'a çıktığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte yapılan bir çalışmada [43] daha düşük protein yüklenme oranı saptanmıştır. Protein yüklenme oranlarındaki bu farklılıklar, kullanılan polimerin tipi, antijenin özelliği ve mikrosfer hazırlama yöntemlerinin farklı olmasından kaynaklanabilir.

Sonuç olarak, PLGA mikrosferli enfeksiyöz nekrotik hepatitis aşısının tek dozunun alüminyum hidroksitli aşının çift dozu ile aynı düzeyde bağışıklık oluşturduğu ortaya konmuştur. Veteriner alanda daha ekonomik olması için maliyeti düşük polimerler üretilmelidir. Farklı biyopolimerlerin veteriner aşılarının üretiminde kullanılabilirliği araştırılmalıdır. Polimer kullanılarak üretilen aşuların bağışıklık düzeyleri, mikrosferleri hazırlamada kullanılan yöntem, polimerin tipi, solventlerin çeşidi, protein stabilizatörleri gibi birçok faktörden etkilendiği için daha kapsamlı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışmayı MF.16.70 proje numarası ile destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP)'ne çok teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Akagi T, Baba M, Akashi M. (2012). Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine. *Adv Polym Sci.* 247, 31-64.
2. Amitoto K, Sasaki O, Isogai M, et al. (1998). The protective effect of *Clostridium novyi* type B alpha-toxoid against challenge with spores in guinea pigs. *J Vet Med Sci.* 60, 681-685.
3. Arda M, Minbay A, Leloğlu N, ve ark. (1997). Özel Mikrobiyoloji, Medisan Yayın Serisi No:13, Medisan Yayınevi, Ankara.
4. Ardehali M, Darakhshan H, Moosawi M. (1986). Mass production and standardization of *Clostridium oedematiens* vaccine against black disease (infectious necrotic hepatitis) of sheep. *Dev Biol Stand.* 64, 137-140.
5. Arnon R, Yedidia TB. (2003). Old and new vaccine approaches. *Int Immunopharmacol.* 3, 1195-1204.
6. Baş T, Alp R. (2005). Clostridial aşuların kombine hazırlanması. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg.* 36, 35-45.
7. Blood DC, Radostits OM. (1989). *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*, 7 th., London.
8. Büyüktanır Ö. (2010). Günümüzde biyoteknolojik bakteriyel aşular. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg.* 5, 97-105.
9. Cleland JL. (1995). Design and production of single-immunization vaccines using polylactide polyglycolide microsphere systems. in: Powell M. F., Newman M. J. (Eds.) *Vaccine design: The subunit and adjuvant approach*. Plenum Press, New York.
10. Clem AS. (2011). *Fundamentals of vaccine immunology.* J Glob Infect Dis. 3, 73-78.
11. Eldridge JH, Staas, JK, Meulbroek JA, et al. (1991). Biodegradable and biocompatible poly(dl-lactide-co-glycolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal en-

- terotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies. *Infect Immun.* 59, 2978–2986.
12. Feng G, Jiang Q, Xia M, et al. (2013). Enhanced immune response and protective effects of nano-chitosan-based DNA vaccine encoding T cell epitopes of Esat-6 and FL against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS One.* 8, 4.
 13. Gupta A, Chaphalkar SR. (2015). Vaccine adjuvants: the current necessity of life. *Shiraz E-Med J.* 16, 1-11.
 14. Gutierrez I, Hernandez RM, Igartua M, et al. (2002). Size dependent immune response after subcutaneous, oral and intranasal administration of BSA loaded nanospheres. *Vaccine.* 21, 67-77.
 15. Isobe M, Yamazaki Y, Oida SI, et al. (1996). Bone morphogenetic protein encapsulated with a biodegradable and biocompatible polymer. *J Biomed Mater Res.* 32, 433–438.
 16. Jaganathan KS, Singh P, Prabhakaran D, et al. (2004). Development of a single-dose stabilized poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres-based vaccine against hepatitis B. *J Pharm Pharmacol.* 56, 1243-1250.
 17. Jaganathan KS, Rao YUB, Singh P, et al. (2005). Development of a single dose tetanus toxoid formulation based on polymeric microspheres: a comparative study of poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) versus chitosan microspheres. *Int J Pharm.* 294, 23–32.
 18. Johansen P, Linda M, Tamber H, et al. (2000). Immunogenicity of single-dose diphtheria vaccines based on PLA/PLGA microspheres in guinea pigs. *Vaccine.* 18, 209-215.
 19. Johansen P, Martinez-Gomez JM, Gander B. (2007). Development of synthetic biodegradable microparticulate vaccines: a roller coaster story. *Exp Rev Vac.* 6, 471-474.
 20. Kerimoğlu O, Alarçin, E. (2002). Poly(lactic-co-glycolic acid) based drug delivery devices for tissue engineering and regenerative medicine. *ANKEM Derg.* 26, 86-98.
 21. Khademi F, Sahebkar A, Fasihi-Ramand M, et al. (2018). Induction of strong immune response against a multicomponent antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in BALB/c mice using PLGA and DOTAP adjuvant. *APMIS.* 126, 509–514.
 22. Kılıç A, Kılıç Ü. (2005). Enfeksiyöz nekrozan hepatit aşısı uygulanan koyunlarda aşının oluşturduğu bağışıklık düzeyinin araştırılması. *FÜ Sağ Bil Derg.* 19, 145-149.
 23. Kim MG, Park JY, Shon Y, et al. (2014). Nanotechnology and vaccine development. *Asian J Pharm Sci.* 9, 227-235.
 24. Kumar M. (2000). Nano ve microparticles as controlled drug delivery devices. *J Pharm Sci.* 3, 234-258.
 25. Lee NH, Lee JA, Park SY, et al. (2012). A review of vaccine development and research for industry animals in Korea. *Clin Exp Vaccine Res.* 1, 18-34.
 26. Lee S, Nguyen MT. (2015). Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune Network.* 15, 51-57.
 27. Li P, Luo Z, Liu P, et al. (2013). Bioreducible alginate-poly(ethylenimine) nanogels as an antigen-delivery system robustly enhance vaccine-elicited humoral and cellular immune responses. *J Control Release.* 168, 271–279.
 28. Li P, Asokanathan C, Liu F, et al. (2016). PLGA nano/micro particles encapsulated with pertussis toxoid (PTd) enhances Th1/Th17 immune response in a murine model. *Int J Pharm.* 513, 183-190.
 29. Lin CY, Lin SJ, Yang YC, et al. (2015). Biodegradable polymeric microsphere-based vaccines and their applications in infectious diseases. *Hum Vaccin Immunother.* 11, 650-656.
 30. Lowry OH, Rosbrough NJ, Farr AL, et al. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-275.
 31. Peek LJ, Middaugh CR, Berkland C. (2008). Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 60, 915–928.
 32. Quintilio W, Takata CS, Sant'Anna OA, et al. (2009). Evaluation of a diphtheria and tetanus PLGA microencapsulated vaccine formulation without stabilizers. *Curr Drug Deliv.* 6, 297-304.
 33. Rosas JE, Pedraz JL, Hernandez RM, et al. (2002). Remarkably high antibody levels and protection against *P. falciparum* malaria in Aotus monkeys after a single immunisation of SPf66 encapsulated in PLGA microspheres. *Vaccine.* 20, 1707-1710.
 34. Sanghi DK, Tiwle R. (2014). A detail comprehensive review on vaccines. *Int J Res Dev Pharm L Sci.* 3, 887-895.
 35. Shakya AK, Nandakumar KS. (2013). Applications of polymeric adjuvants in studying autoimmune responses and vaccination against infectious diseases. *J R Soc Interface.* 10, 1-6.
 36. Shi L, Caulfield MJ, Chern RT, et al. (2002). Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-shot hepatitis B vaccine formulated with PLGA microspheres. *J Pharmaceut Sci.* 91, 1019-1035.
 37. Singh SM, Alkie TN, Nagy E, et al. (2016). Delivery of an inactivated avian influenza virus vaccine adjuvanted with poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) encapsulated CpG ODN induces protective immune responses in chickens. *Vaccine.* 34, 4807-4813.
 38. Souza CD, Bannantine JP, Brown WC, et al. (2017). Nano particle vector comprised of poly lactic-co-glycolic acid and monophosphoryl lipid A and recombinant *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* peptides stimulate a pro-immune profile in bovine macrophages. *J Appl Microbiol.* 123, 54–65.
 39. Spickler AR, Roth JA, (2003). Adjuvants in veterinary vaccines: Modes of action and adverse effects. *J Vet Intern Med.* 17, 273–281.
 40. Taha-Abdelaziz K, Hodgins DC, Alkie TN, et al. (2018). Oral administration of PLGA-encapsulated CpG ODN and *Campylobacter jejuni* lysate reduces cecal colonization by *Campylobacter jejuni* in chickens. *Vaccine.* 36, 388-394.
 41. Thomas C, Gupta V, Ahsan F. (2010). Particle size influences the immune response produced by hepatitis B vaccine formulated in inhalable particles. *Pharm Res.* 27, 905-919.
 42. Webster A, Frank CL. (1985). Comparison immune response stimulated in sheep, rabbits and guinea pigs by the administration of multicomponent clostridial vaccines. *Australian Vet J.* 62, 112-114.
 43. Woo HS, Kim SR, Yoon M, et al. (2018). Combined poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing diphtheria toxoid for a single-shot immunization. *AAPS Pharm Sci Tech.* 19, 1160-1167.

Atık Yapan Sığırlarda Anti-*Neospora caninum* Antikorlarının Yaygınlığının Araştırılması

Ufuk Erol, Erdem Danyer, Selim Tuncer, Çağla Korkmaz, Ahmet Deniz

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Parazitoloji Laboratuvarı, Ankara.

Geliş Tarihi / Received: 04.04.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 10.05.2019

Özet: Bu araştırma sığırların önemli atık etkenlerinden biri olan *Neospora caninum*'un atık yapmış sığırlardaki yaygınlığının araştırılması amacıyla yapıldı. Bu amaçla, atık geçmişi ile Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne 25 ilden gönderilen 986 sığır kan serumu *N. caninum* antikorları yönünden competitive ELISA (c-ELISA) ile tarandı ve örneklerde %32,35 (319/986) oranında *N. caninum* tespit edildi. Sığır çiftliklerinde *N. caninum* kaynaklı enfeksiyonlarda atıklara ilave olarak süt verimlerinde azalmaya, döl tutma problemine bağlı olarak erken damızlıktan çıkarmaya ve persiste enfekte buzağuların doğmasına neden olarak ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır.

Anahtar kelimeler: c-ELISA, *Neospora caninum*, sığır,

Distribution of Anti-*Neospora caninum* Antibodies in Cattle with Abortion History

Abstract: This study was carried out to investigate the distribution of *Neospora caninum* which is a crucial aborting agent in cattle breeding. For this purpose, 986 cattle serum samples, sent to Veterinary Control Central Research Institute from 25 different provinces in Turkey with abortion history, were tested with Competitive ELISA (c-ELISA) and anti-*N. caninum* antibodies were detected from 32.35% (319/986) of the samples. In addition to abortion in cattle, *N. caninum* causes economic losses in dairy and beef cattle farms due to reduction in milk yield, early separation from breeding by reason of reproductive disorders and persistently infected calf births.

Key words: c-ELISA, cattle, *Neospora caninum*

Giriş

Neospora caninum, Toxoplasmatidae ailesinde yer alan zorunlu hücre içi protozoal etkidir. Etken ilk defa 1984 yılında Norveç'te yavru köpeklerde merkezi sinir sistemi ve iskelet kaslarında yangı olgularında tespit edilmiş ve tür teşhisi yapılamadığı için "teşhis edilememiş sporozoon kist" olarak tanımlanmıştır [9]. Sonraki yıllarda ABD'de toxoplasmosis benzeri hastalık belirtileri gösteren 23 köpeğin 10'unda etkene rastlanmış, etkenin yapısal ve antijenik özelliklerinin *Toxoplasma gondii*'den farklı olması nedeniyle *Neospora caninum* olarak isimlendirilmiştir [13].

Neospora caninum'un son konağının kanideler (köpek, çakal gibi), ara konağının ise başlıca sığırlar, nadiren de koyun, keçi, at ve köpek olduğu bildirilmiştir [15, 16]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bazı kanatlı türlerinin de *N. caninum*'un ara konağı olabileceğini ortaya koymuştur. [1, 10, 11]. Etken ayrıca insan olmayan primatlar [4], kanguru [24] ve rodentlerde de [25] tespit edilmiştir.

Etkenin biyolojisinde, ara konak ve son konaklarda enfeksiyona neden olan üç ayrı (takizoit, bradizoit ve ookist) form bulunmaktadır. Son konakların dışkılarıyla atılan sporlanmamış ookistler dış ortamda yaklaşık 24 saat içerisinde sporlanarak ara konaklar için enfektif hale dönüşür. Ara konaklar yemde, suda ya da toprakta bulunan sporlanmış ookistleri alarak enfeksiyona yakalanırlar. Yine gebe ineklerde, etken endojen transplasental yolla %90'lara kadar yüksek oranda yavruya geçebilir ve gebeliğin dönemine bağlı olarak abort ya da enfekte buzağı doğumlarına yol açabilmektedir [12, 15].

Neospora caninum ara konak sığırlarda atıklara neden olduğu için veteriner hekimlik açısından oldukça önemlidir. Meksika'da 1987 yılında ilk kez bir süt çiftliğinde atıklar *Bovine neosporosis* ile ilişkilendirilmiş ve daha sonrasında da birçok atık vakasında etken ile karşılaşmıştır [6]. Gebe sığırlarda etkenin vertikal yolla yavruya geçmesi sonucunda atığa, konjenital bozukluklara sahip (koordinasyon bozukluğu, tremor ve ekstremitelerde hiperrekstansiyon gibi) ya da persiste enfekte buzağuların

doğmasına, döl tutmaması sonucunda damızlıktan ayrılmaya ve süt veriminin azalmasına yol açması nedenleriyle neosporiosis sığır yetiştiriciliğinde ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır [6, 12, 15, 16].

Sığırlarda *N. caninum*'un yaygınlığının araştırılması amacıyla yapılan çalışmalar incelendiğinde etkenin teşhisinde yoğun olarak ELISA ve IFA testlerinin kullanılmakta olduğu görülmüştür [7, 15, 17, 21]. Dünya'da sığırlarda *N. caninum*'un yaygınlığının araştırılması amacıyla yapılan serolojik çalışmalar incelendiğinde, etkenin altı kıtada da görüldüğü ve yaygınlığının kıtalara göre Kuzey Amerika'da %5,2-79, Güney Amerika'da %3,9-97,2, Avrupa'da %0,7-65, Asya'da %5,5-70, Afrika'da %8,96-20,4 ve Avustralya'da %7,6-53 olduğu görülmektedir [7, 8, 14, 15, 18, 21, 22, 23, 27, 28].

Türkiye'de sığırlarda *N. caninum*'un yaygınlığının araştırılması amacıyla yapılan serolojik çalışmaların hemen tamamında ticari ELISA testinin kullanıldığı görülmüş ve bu çalışmalarda *N. caninum*'un yaygınlığının, Sakarya'da %9,2 [30], Kırıkkale'de, İzmir'de ve Tokat'ta %10,77 [36], Ankara'da %10,15, Çankırı'da %6,93, Nevşehir'de %5,10, Eskişehir'de %5,43, Yozgat'ta %20,32 [34], Kayseri'de %7-10,82 [19, 34], Kırşehir'de %18,1-19,55 [34, 35], Kırıkkale'de %32,72-66,66 [29, 34], Burdur'da %21,97, Aksaray'da %34,9 [29, 34], Kars'ta %2-7,2 [2, 26], Van'da %4,88 [5], Şanlıurfa'da %7,5 [31], Adana'da %10,7 [17], Elazığ'da %8,19-15 [3, 33], Malatya'da %4, Muş'ta %4,86 ve Bingöl'de %4,69 [3] olduğu bildirilmiştir.

Çalışmanın amacı, Türkiye'nin 25 ilinden Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne gönderilmiş olan atık yapmış sığır kan serumlarında *N. caninum*'un yaygınlığının araştırılmasıdır.

Materyal ve Metot

Çalışma materyalini, *N. caninum* varlığı yönünden incelenmesi amacıyla Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne gönderilmiş olan atık yapmış 986 sığıra ait kan serum örneği oluşturmaktadır. Serum örnekleri toplamda 25 ilden, soğuk zincir şartları altında gönderilmiştir. Örneklerin gönderildiği iller ve örnek sayıları Tablo 1'de verilmiştir. Serum örneklerinde *N. caninum* antikorlarının aranması için compative ELISA (cELISA)

(VMRD®, Pullman, ABD) kiti üretici firma talimatlarına göre kullanılmıştır.

Sonuçlar Excel® (Microsoft®, V.2016, Washington, ABD) programıyla kayıt altına alınmış ve SPSS® (IBM®, V. 21, Armonk, NY, ABD) programıyla sonuçların istatistiksel değerlendirilmiştir. Levene's Test ile varyansların homojenliği kontrol edilmiştir. Pozitif ve negatif numuneler arasındaki önem farkı Bağımsız örneklem t-testi ile değerlendirilmiştir. İstatistik analizleri için önem sınırı $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

Bulgular

Tablo 1. Atık yapan sığır numunelerinin illere göre dağılımı.

Sıra No	İl	Toplam Numune	Pozitif Numune	Pozitiflik Oranı (%)
1	Adana	16	4	25,00
2	Aksaray	307	162	52,77
3	Ankara	14	1	7,14
4	Bartın	2	0	0,00
5	Bursa	33	3	9,09
6	Çankırı	11	1	9,09
7	Çorum	5	2	40,00
8	Denizli	3	0	0,00
9	Erzincan	11	0	0,00
10	Erzurum	3	0	0,00
11	Eskişehir	8	3	37,50
12	İstanbul	8	0	0,00
13	İzmir	13	3	23,08
14	Kastamonu	23	2	8,70
15	Kırıkkale	147	23	15,65
16	Kırklareli	25	4	16,00
17	Kırşehir	4	0	0,00
18	Malatya	6	1	16,67
19	Manisa	10	1	10,00
20	Muğla	100	32	32,00
21	Sakarya	4	0	0,00
22	Samsun	10	2	20,00
23	Siirt	2	0	0,00
24	Şanlıurfa	201	67	33,33
25	Tekirdağ	20	8	40,00
Toplam		986	319	32,35

Çalışmamızda incelenen 986 sığır kan serumunun 319 (%32,35)'unda *N. caninum* tespit edilmiştir.

Sonuçların illere göre dağılımı ve yüzde pozitiflik değerleri Tablo-1’de gösterilmektedir.

Ülkemizde yapılan diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında çalışmamızın örneklem büyüklüğü ($p=0,50$) ve pozitiflik sayısı ($p=0,80$) önceki çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Tartışma ve Sonuç

Neospora caninum, dünya genelinde sığırlarda atıklara neden olan en önemli etkenlerden biri olup, bunun yanında sığırlarda konjenital hasarlı buzağuların doğmasına veya bazen de herhangi bir klinik belirti göstermeyen ancak *N. caninum* ile enfekte buzağuların doğmasına neden olmaktadır [12, 15]. Enfekte doğan bu hayvanların ilerleyen dönemlerde gebe kaldıklarında atık yapma ihtimalinin, etken ile karşılaşmamış hayvanlara göre yaklaşık iki kat daha fazla olduğu bildirilmiştir [15].

Bu çalışmada, atık yapmış sığırların %32,35’inde *N. caninum* tespit edilmiştir. Çalışma sonucu, çeşitli ülkelerde atık yapan sığırlarda *N. caninum* yaygınlığının c-ELISA ile araştırıldığı çalışmalarla karşılaştırıldığında, Bulgaristan’dan (%10) [15], Çekya’dan (%0,5-3,9) [8, 15], Polonya’dan (%15,6) [15], Slovakya (%22,2)’dan [15], Sırbistan’dan (%7,2-15,4) [22, 23], Romanya’dan (%27,7) [20] ve Sudan’dan (%10,7) [18], daha yüksek bulunmuşken, yine bu oranın Brezilya’dan (%42,1), Meksika’dan (%42-59), ABD’den (%79), Portekiz’den (%49), İspanya’dan (%35,4), İsveç’ten (%63), Birleşik Krallık (%60), Yeni Zelanda (%50-53)’dan [15] ve Pakistan’dan (%43) [27] daha düşük olduğu görülmüştür.

Ülkemizde şimdiye kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde, atık geçmişi olan sığırlarda *N. caninum*’un yaygınlığının araştırılması amacıyla yapılmış yalnızca iki çalışma tespit edilmiştir. Bu çalışmaların birinde 134 sığırın %35,7’sinin [31], diğerinde ise Kırıkkale, Burdur ve Aksaray illerindeki 427 sığırın %37,7’sinin kan serumunda *N. caninum* tespit edilmiştir [29]. Bu çalışmada ise atık yapan 986 sığırın %32,35’inin kan serumunda *N. caninum* tespit edilmiş ve sonuç bu çalışmalar ile karşılaştırıldığında pozitiflik oranının daha düşük olduğu görülmüştür. *Neospora caninum*’un yaygınlığının araştırılması amacıyla yapılan diğer çalışmalarda ise, örneklemenin bir bölgedeki sığırların tesadüfi olarak örneklenmesi ile oluşturulduğu görülmüş ve

bu nedenle çalışma sonuçlarımız bu çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılmamıştır.

Neospora caninum’un yaygınlığının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda elde edilen pozitiflik oranlarındaki farklılık nedenleri, sürü yönetimine, hayvanların beslenme ve barınma şekillerine, sürü büyüklüğüne, iklime, hayvanların temin edilme şekline ve hayvan ırkına bağlı olduğu belirtilmektedir [15].

Çalışma sonucunda atık yapan 986 sığırların %32,35’inde *N. caninum* antikorlarının tespit edilmesi kayda değer bir veri olup, sığır atık vakalarında *N. caninum*’un göz ardı edilmemesi gerektiğini düşündürmektedir. Bu nedenle atık vakaları değerlendirilirken sığırlarda atıklara neden olan diğer etkenlerle birlikte *N. caninum* yönünden de analiz yaptırılması ve sonuçların değerlendirilmesi oldukça önemlidir. Sığırlarda atık vakalarının yanı sıra; persiste enfekte buzağı doğması, süt veriminde azalma ve erken damızlıktan çıkarma gibi ciddi ekonomik kayıplara neden olan *N. caninum*’un, ülkemizdeki gerçek yaygınlığının belirlenebilmesi için önceki çalışmalara ek olarak ülkesel çapta epidemiyolojik bir çalışma gerektiği düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Abdoli A, Arbabi M, Pirestani M, Mirzaghavami M, Ghaffarifar F, Dalimi A, Sadraei J (2018). *Molecular assessment of Neospora caninum and Toxoplasma gondii in hooded crows (Corvus cornix) in Tehran, Iran*. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 57, 69-73.
2. Akca A, Gokce HI, Guy CS., McGarry JW, Williams DJ (2005). *Prevalence of antibodies to Neospora caninum in local and imported cattle breeds in the Kars province of Turkey*. Research in veterinary science, 78(2), 123-126.
3. Aktaş M, Şaki CE, Altay K, Şimşek S, Ütük AE, Köroğlu E, Dumanlı N (2005). *Doğu Anadolu bölgesinin bazı illerinde bulunan sığırlarda Neospora caninum’un araştırılması*. Türkiye Parazitolojisi Dergisi, 29(1), 22-25.
4. Akue JP, Tomo NE, Badiambile J, Moukama H, Mbou-Mountsimbi RA, Ngoubangoye B (2018). *Seroprevalence of Toxoplasma gondii and Neospora caninum in non-human primates at a primate center at Franceville, Gabon*. Journal of Parasitology and Vector Biology, 10(1), 1-7.
5. Alan M, Cetin Y, Sendag S, Akkan HA, Karaca M (2011). *Seroprevalence of Antibodies Against Neospora caninum in Cows in Van Province*. Kafkas üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 17(5), 767-771.
6. Anderson ML, Andrianarivo AG, Conrad PA (2000). *Neosporosis in cattle*. Animal reproduction science, 60, 417-431.

7. Asmare K, Regassa F, Robertson LJ, Skjerve E (2013). *Seroprevalence of Neospora caninum and associated risk factors in intensive or semi-intensively managed dairy and breeding cattle of Ethiopia*. Veterinary parasitology, 193(1-3), 85-94.
8. Bártová E, Sedlák K, Budíková M (2015). *A study of Neospora caninum and Toxoplasma gondii antibody seroprevalence in healthy cattle in the Czech Republic*. Ann Agric Environ Med, 22, 32-34.
9. Bjerkas I, Mohn SF, Presthus J (1984). *Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs*. Zeitschrift für Parasitenkunde, 70(2), 271-274.
10. Darwich L, Cabezon O, Echeverria I, Pabón M, Marco I, Molina-López R, Alarcia-Alejos O, López-Gatius F, Lavin S, Almería S. (2012). *Presence of Toxoplasma gondii and Neospora caninum DNA in the brain of wild birds*. Veterinary Parasitology, 183(3-4), 377-381.
11. De Barros LD, Miura AC, Minutti AF, Vidotto O, Garcia JL (2018). *Neospora caninum in birds: A review*. Parasitology international. 67(4), 397-402.
12. Dubey JP (2003). *Review of Neospora caninum and neosporosis in animals*. The Korean journal of parasitology, 41(1), 1.
13. Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, ANDA U (1988). *Newly recognized fatal protozoan disease of dogs*. Journal of the American Veterinary Medical Association, 192(9), 1269-1285.
14. Dubey JP, Schares G (2011). *Neosporosis in animals the last five years*. Veterinary parasitology, 180(1-2), 90-108.
15. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM (2007). *Epidemiology and control of neosporosis and Neospora caninum*. Clinical microbiology reviews, 20(2), 323-367.
16. Dumanlı N, Aktaş M (2015). *Toxoplasmatidae (Toxoplasma, Neospora)*. Dumanlı N, Karaer KZ. Eds. Veteriner Protozooloji. Medisan Yayınevi, Ankara. p.133-150.
17. Eşki F, Ütük AE (2018). *Detection of anti-Neospora caninum antibodies in cattle in Adana province of Turkey*. Van Veterinary Journal, 29(2), 93-99.
18. Ibrahim AME, Elfahal AM, Hussein ARME (2012). *First report of Neospora caninum infection in cattle in Sudan*. Trop Anim Health Prod, 44, 769-772.
19. İça A, Yıldırım A, Düzlü Ö, İnci A (2006). *Kayseri yöresinde sığırlarda Neospora caninum'un seroprevalansı*. Türkiye Parazit Derg, 30(2), 92-94.
20. Imre K, Morariu S, Ilie MS, Imre M, Ferrari N, Genchi C, Darabus G (2012). *Serological survey of Neospora caninum infection in cattle herds from western Romania*. J Parasitol, 98, 683-685. (Romanya %27,7).
21. Kamga-Waladjo AR, Gbati OB, Kone P, Lapo RA, Chatagnon G, Bakou SN, Pangui LJ, Diop PEH, Akakpo JA, Tainturier D (2010). *Seroprevalence of Neospora caninum antibodies and its consequences for reproductive parameters in dairy cows from Dakar-Senegal, West Africa*. Tropical animal health and production, 42(5), 953-959.
22. Klun I, Ćirković V, Maletić M, Bradonjić S, Djurković-Djaković O (2019). *Seroprevalence of Neospora caninum infection and associated risk factors in dairy cattle in Serbia*. Parasitology research, 1-9.
23. Kuruca L, Spasojević-Kosić L, Simin S, Savović M, Laus S, Lalosević V (2013). *Neospora caninum antibodies in dairy cows and domestic dogs from Vojvodina, Serbia*. Parasite, 20, 40.
24. Mayberry C, Maloney SK, Mitchell J, Mawson PR, Bencini R (2014). *Reproductive implications of exposure to Toxoplasma gondii and Neospora caninum in western grey kangaroos (Macropus fuliginosus ocydromus)*. Journal of wildlife diseases, 50(2), 364-368.
25. Meerburg BG, De Craeye S, Dierick K, Kijlstra A (2012). *Neospora caninum and Toxoplasma gondii in brain tissue of feral rodents and insectivores caught on farms in the Netherlands*. Veterinary Parasitology, 184(2-4), 317-320.
26. Mor N, Akça A (2012). *Kars Yöresinde sığır ve köpeklerde Neospora caninum üzerine epidemiyolojik araştırmalar: gruplar arası çalışma*. Kafkas üniversitesi veteriner fakültesi dergisi, 18, 193-199.
27. Nazir MM, Maqbool A, Khan MS, Sajjid A, Lindsay DS (2013). *Effects of age and breed on the prevalence of Neospora caninum in commercial dairy cattle from Pakistan*. J Parasitol, 99, 368-370.
28. Njiro SM, Kidanemariam AG, Tsotetsi AM, Katsande TC, Mnisi M, Lubisi BA, Potts AD, Baloyi F, Moyo G, Mpofo J, Kalake A, Williams R (2011). *A study of some infectious causes of reproductive disorders in cattle owned by resource-poor farmers in Gauteng Province, South Africa*. Journal of the south african veterinary association, 82(4), 213-218.
29. Öcal N, Atmaca HT, Albay MK, Deniz A, Kalender H, Yıldız K, Kul O (2014). *A new approach to Neospora caninum infection epidemiology: neosporosis in integrated and rural dairy farms in Turkey*. Turkish journal of veterinary and animal sciences, 38(2), 161-168.
30. Öncel T, Bıyıkoğlu G (2003). *Sakarya yöresi süt sığırlarında Neosporosis caninum*. Uludağ Univ J Fac Vet Med, 22, 1-2.
31. Pişkin FÇ, Ütük AE (2009). *Ölü doğum ve abort yapan ineklerde Neospora caninum prevalansı*. Etlik Vet Mikrobiyol Derg, 20, 23-26.
32. Sevgili M, Altaş MG, Keskin O (2005). *Seroprevalence of Neospora caninum in cattle in the province of Şanlıurfa*. Turkish journal of veterinary and animal sciences, 29(1), 127-130.
33. Simsek S, Utuk AE, Koroglu E, Dumanli N, Risvanli A (2008). *Seroprevalence of Neospora caninum in repeat breeder dairy cows in Turkey*. Archives animal breeding, 51(2), 143-148.
34. Vural G, Aksoy E, Bozkir M, Kuçukayan U, Erturk, A (2006). *Seroprevalence of Neospora caninum in dairy cattle herds in Central Anatolia, Turkey*. Veterinarski arhiv, 76(4), 343-349.
35. Yıldız K, Gökpınar S, Sürsal N, Değirmenci R (2017). *Seroprevalence of Neospora caninum in Dairy Cattle Raised in Çiçekdağı District of Kırşehir Province*. Türkiye parazitoloji dergisi, 41(3), 135.
36. Yıldız K, Kul O, Babur C, Kilic S, Gazyagci AN, Celebi B, Gurcan IS (2009). *Seroprevalence of Neospora caninum in dairy cattle ranches with high abortion rate: Special emphasis to serologic co-existence with Toxoplasma gondii, Brucella abortus and Listeria monocytogenes*. Veterinary parasitology, 164(2-4), 306-310.

Altın Çakal'da (*Canis aureus* Linnaeus, 1758) Bulunan Helmint Enfeksiyonları ve Zoonotik Önemi

Ufuk Erol^{1*}, Gökben Özbakış Beceriklisoy², Erdem Danyer^{1,3}, Dilek Tekyiğit²,
H. Oğuz Sarımehtetoğlu²

¹Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Parazitoloji Laboratuvarı, Ankara.

²Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Ankara.

³Türk Deniz Araştırmaları Vakfı, İstanbul.

Geliş Tarihi / Received: 18.04.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 14.05.2019

Özet: Altın çakal (*Canis aureus* Linnaeus, 1758), Türkiye'de bulunan, dünyada da oldukça geniş yayılıma sahip yabani karnivorlardan biridir. Yabani karnivorlar çeşitli zoonoz helmintleri çevreye, insanlara ve diğer hayvanlara bulaştırmaları bakımından önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Bu çalışmada, çakallarda bulunabilecek, çevreye bulaşarak insan ve hayvan sağlığını tehdit edecek helmintlerin varlığı aranmaktadır. Bu amaçla, Türkiye'nin Batı Karadeniz ve Güney Marmara bölgesinden Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü'ne gönderilen iki çakal incelenmiş, sindirim sistemlerinde; *Alaria* sp., *Joyeuxiella echinorhyncoides*, *Mesocestoides* sp., *Uncinaria stenocephala*, *Rictularia cahirensis* erişkinleri ile, *Linguatula serrata* nimfleri saptanmıştır. Bu çalışmada tespit edilen *Alaria* sp. ve *L. serrata* nimfleri bildiğimiz kadarıyla Türkiye'de altın çakallardan bildirilen ilk kayıttır.

Anahtar kelimeler: Altın çakal, Helmint, *Linguatula serrata*, *Alaria* sp., Zoonoz Helmintler

Helminth Infections in Golden Jackals (*Canis aureus* Linnaeus, 1758) and Their Zoonotic Importance

Abstract: Golden jackal (*Canis aureus* Linnaeus, 1758) is one of the wild carnivore in the worldwide spread. Wild carnivores are an important source of transmission of various zoonotic helminths to the environment, humans and other animals. In this study, it was aimed to diagnose helminths which can be found in golden jackals and will threaten human and animal health by transmitting to the environment. For this purpose, two jackals which were brought from Western Blacksea and Southern Marmara region of Turkey to the Veterinary Control Central Research Institute were examined; and adults of *Alaria* sp., *Joyeuxiella echinorhyncoides*, *Mesocestoides* sp., *Uncinaria stenocephala*, *Rictularia cahirensis* and *Linguatula serrata* nymphs had been found in their gastrointestinal system. To the best of our knowledge, it is the first record of *Alaria* sp. and *L. serrata* nymphs in golden jackals from Turkey.

Key words: Golden Jackals, Helminth, *Linguatula serrata*, *Alaria* sp., Zoonotic helminths

Giriş

Altın çakal, mesokarnivor türlerinden olup, dünyada geniş yayılıma sahip karnivor türlerindedir [14]. Polytypic tür olan altın çakalın, 14 alt türü farklı coğrafik bölgelerde bulunmaktadır [10]. Altın çakal Afrika, Güney Doğu Asya, Orta Asya, Orta Doğu, Basra Körfezi ülkelerinde [14] ve Kuzey İtalya, Slovakya, Avusturya, Macaristan, Çek Cumhuriyeti, Kuzey Polonya, Slovenya, Romanya, Bosna-Hersek, Karadağ, Sırbistan, Ukrayna, Yunanistan, Bulgaristan ve Türkiye'de yaşadığı bilinmektedir [4].

Türkiye'de oldukça geniş bir alanda yaşam sürdüren altın çakallar özellikle sahil bölgelerinde ve deniz seviyesinden 1500 metre yükseklikteki nehir

vadilerinde (Kocaeli, İstanbul, Kırklareli, Sakarya, Ankara, Adana, Mersin, Hatay, Gaziantep, Şanlıurfa, İzmir, Denizli, Muğla, Aydın, Burdur, Zonguldak, Karabük, Bolu, Artvin, Rize, Trabzon, Giresun, Ordu, Samsun, Kastamonu, Bartın ve küçük bir popülasyon halinde Hakkari'de) bulunmaktadır [2].

Altın çakallar, 1,1 km²'den 20 km²'ye uzanan bir yaşam alanına sahiptir. Bu durum çakalların çeşitli parazitler türleri dışında diğer karnivorlar ile de temas ederek taşıdığı parazitleri onlara bulaştırarak etkenlerini daha geniş alanlara yayılma ihtimalini arttırmaktadır. Parazitlerin çevreye bulaşmasında ve insanlar için indirekt enfeksiyon kaynağı olmasında önemli rolü olduğu düşünülmektedir [10]. Altın ça-

kallarda yapılan parazitolojik çalışmalar çoğunlukla helmintler üzerine olup, 38 ülkeden 119 helmint türü bildirilmiş ve bu helmint türleri içerisinde zoonoz öneme sahip olanlar da kaydedilmiştir [10].

Türkiye'nin Avrupa'daki komşusu Bulgaristan, Yunanistan ve doğu sınır komşusu İran'da çakal parazitlerinin yayılışı ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmasına rağmen [7, 21, 25, 28, 30], Türkiye'deki çalışmalar sınırlı sayıdadır [16, 17, 19]. Yapılan bu çalışmalarda nekropsi sonrasında, Altın çakalda *Mesocostoides lineatus*, *Taenia polyacantha*, *Rictularia cahirensis* [19], *Uncinaria stenocephala* [17] ve *Joyeuxiella echinorhynchoides*, *Toxascaris leonina*, *Toxocara canis*, *Uncinaria stenocephala* kaydedilmiştir [16]. İnsan sağlığını da etkileyen çok sayıda helmintin son konağı olduğu bilinmesine rağmen, örnek bulmadaki zorluklar nedeniyle özellikle Türkiye'de bu hayvanların helmint yükü ile ilgili çok az bilgi bulunmaktadır. Bu yüzden çakal gibi yabani karnivorların helmintlerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda elde edilen verilerin tamamının değerli olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmanın amacı, Türkiye'nin iki farklı bölgesinden (Çanakkale-Ayvacık ve Bolu-Kıbrısık) elde edilen iki altın çakaldaki helmintlerin durumunu saptamak, bulunan helmintlerin zoonotik özellikleri ve Türkiye'ye komşu ülkelerdeki (Yunanistan, Bulgaristan, İran) altın çakallarda kaydedilen helmintlerin karşılaştırılması yapılmaktadır.

Materyal ve Metot

Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne 2014 yılında Bolu-Kıbrısık ve 2016 yılında Çanakkale-Ayvacık'tan iki ölü erkek altın çakal gönderilmiş, nekropsileri Munson ve ark. [20]'nin belirttiği yöntemle yapılmıştır. Kalp, karaciğer ve akciğer örnekleri helmintolojik inceleme yapılana kadar -20°C'de, ince ve kalın bağırsaklar ise önce olası *Echinococcus* sp. yumurtalarını inaktif hale getirebilmek amacıyla en az bir hafta süreyle -80°C'de bekletilmiş, sonrasında inceleme yapılana kadar -20°C'de saklanmıştır [9]. Örnekler incelemeden bir gece önce +4°C'de çözdürülmüştür.

Kalp, Akciğer ve Karaciğer Muayenesi

Kalp örnekleri makas yardımıyla açılarak, atrium ve ventriküller makroskopik olarak *Dirofilaria immitis*

ve *Angiostrongylus vasorum* yönünden incelenmiştir [24].

Karaciğer ve akciğer örneklerinin makroskopik incelenmesi sonunda, organlar steril makas yardımıyla yaklaşık 2 cm³'lük parçalara ayrılarak, ılık %0,9'luk fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde 37°C etüvde 2-4 saat inkube edilmiştir. Süre sonunda örnekler musluk suyu altında 100 µm'lik elekten geçirilmiş, üste kalan miktar stereo mikroskopta (×40) (Leica® M165 C) incelenmiştir [22].

Sindirim Sistemi Muayenesi

İnce ve kalın bağırsaklar Sedimentasyon ve Sayım Tekniği ile incelenmiştir [12]. Bağırsaklar beşer eşit parçaya bölünüp, tek ucu küt makas yardımıyla uzunlamasına açılmıştır. Bağırsak içeriği makroskopik olarak helmint yönünden kontrol edilmiştir. Ardından 100 µm'lik elekte yıkanmış, elek üstünde kalan içerik stereo mikroskop altında incelenmiştir. Bağırsak parçaları ise %0,9'luk FTS bulunan şişelere alınarak, birkaç dakika şiddetli bir şekilde çalkalanmıştır. Süre sonunda bağırsak parçaları baş ve işaret parmağının arasına alınarak sıyrılmıştır. Kalan içeriğe ise sedimentasyon tekniği uygulanmıştır. Sediment porsiyonlara ayrılarak stereo mikroskop altında incelenmiştir. Bulunan helmintler teşhisleri yapılana kadar gliserin alkolde +4°C'de saklanmıştır [12, 18]. Tespit edilen trematod ve cestod örnekleri Borax Carmen ile boyanırken [11], nematodlar laktofenol ile şeffaflandırılmıştır. Tespit edilen tüm helmintler tek tek incelenerek morfolojik özellikleri kaydedilmiş, tür teşhisleri ilgili literatürlere [3, 13, 19, 29] göre yapılmıştır.

Bulgular

Çakallara ait kalp, karaciğer ve akciğer örneklerinde herhangi bir helmint ya da gelişim dönemine rastlanmazken, bağırsaklarda bulunan helmintler ve sayıları Tablo 1'de gösterilmiştir. Çanakkale'den gönderilen altın çakal bir helmint türü (*Joyeuxiella echinorhynchoides*) ile enfekte iken, Bolu'dan gönderilen çakalda beş farklı helmint türü (*Alaria* sp., *Mesocostoides* sp., *Uncinaria stenocephala*, *Rictularia cahirensis* ve *Linguatula serrata* nimfi) saptanmıştır (Şekil 1).

Karnivorlarda bulunması muhtemel *Echinococcus* sp. yumurtalarının inaktivasyonu amacıyla

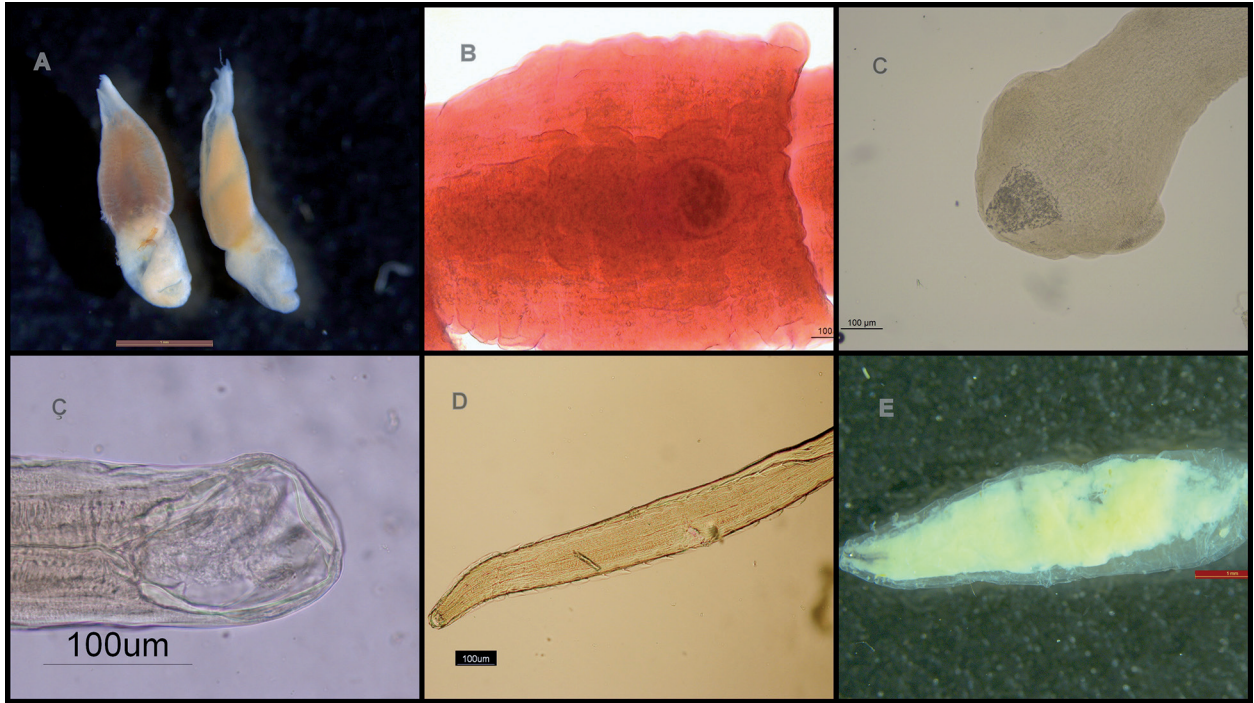
örnekler -80°C 'de bekletilmiş, bu esnada çalışmada tespit edilen helmintlerin, morfolojilerinin büyük ölçüde bozulduğu görülmüştür.

Yapılan ölçümlerde; ölçümü yapılan 6 dişi *U. stenocephala* örnekleri 7,72-10,43 mm uzunluğunda ve 290-340 μm genişliğinde bulunmuştur. Vulva, parazitin arka ucuna 2,25-3,55 mm mesafelerde olup, parazitin son 1/3'ünde bulunduğu kaydedilmiştir. Bu türde morfolojisinin bozulmadığı görülen bir erkek parazitten alınan ölçümlerde ise parazitin 6,714 mm boyunda ve 270 μm eninde olduğu ölçülmüştür. Parazitin spikülümleri neredeyse birbirine eşit ve 650 μm uzunluğunda olduğu ölçülmüştür. Tespit edilen erkek *Rictularia cahirensis* ise 7,26 mm uzunluğunda ve 270 μm eninde olduğu ölçülmüştür. Boylarının birbirine neredeyse eşit olduğu görülen spikülümlerin ise 217,5 μm olduğu ölçülmüştür. Morfolojisi bozulmamış *Linguatula serrata* nimflerinin üçü ölçülmüş ve boyutlarının 6,06-8,20 mm \times 1236-1967 μm olduğu ölçülürken, parazitin kütikulasında yaka şeklinde küçük dikenciklerin

bulunduğu tespit edilmiştir. Ölçümü yapılan iki *Alaria* sp. örneğinin 2,53-2,62 mm \times 622-793 μm boyutlarında olduğu görülmüştür. *Mesocestoides* sp. nin ise 10 gebe halkası ölçülmüş ve boyutlarının 1152-1397 \times 1348-1912 μm olduğu ölçülmüştür. *Joyeuxiella echinorhynchoides*'in rostellumunda 19-22 sıra çengel bulunduğu tespit edilmiştir. Halka laterallerinde bulunan iki genital atrium halkalarının ön 1/3'ünde yer almaktadır. Halkalarda bulunan cirrus keseleri ise 169-228 μm uzunluğunda saptanmıştır.

Tablo 1. Bağırsaklarda bulunan helmintler ve sayıları.

Bulunan helmint türleri	Bolu	Çanakkale
<i>Alaria</i> sp.	2	-
<i>Joyeuxiella echinorhynchoides</i>	-	29
<i>Mesocestoides</i> sp.	11	-
<i>Uncinaria stenocephala</i>	10 (7 ♀- 3 ♂)	-
<i>Rictularia cahirensis</i>	2 (♂)	-
<i>Linguatula serrata</i> nimfi	24	-



Şekil 1. A. *Alaria* sp. erişkin parazit, B. *Mesocestoides* sp. gebe halka, C. *J. echinorhynchoides* skoleksi Ç. *U. stenocephala* ön nihayeti D. *R. cahirensis* ön nihayeti ve tegümentteki dikenleri, E. *L. serrata* nimfi

Tartışma ve Sonuç

Altın çakallarda görülen; *Alaria alata*, *Alaria canis*, *Heterophyes dispar*, *H. heterophyes*, *Trichinella* sp.,

Toxocara sp., *Ancylostoma* sp., *Joyeuxiella pasqualei*, *Dipylidium caninum*, *Mesocestoides lineatus*, *Macracanthomynchus* sp. ve *Echinococcus granulo-*

sus gibi diğer karnivorlara da bulaşabilen ve zoonoz olan helmintler daha önce çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir [7, 10, 14, 15, 28]. Tespit edilen zoonoz helmint türleri, altın çakalların geniş yaşam alanlarına sahip olmaları ve günümüzde yaşam alanlarının şehirlere yaklaşması sebebiyle halk sağlığını da tehdit etmektedir. Ayrıca köpeklerin ve yabani karnivorların birbiriyle etkileşimi arttıkça enfeksiyonların da görülme ihtimali, yayılışı artmaktadır [14].

Türkiye'nin komşu ülkelerinde altın çakallarda yapılan helmint çalışmalarında saptanan türler birbirlerine benzerlik göstermektedir. Ancak araştırmalarda kullanılan örnek sayılarının Türkiye'de yapılan çalışmalara oranla fazla sayıda olması nedeniyle, bu ülkelerde saptanan helmint çeşitliliğinin de Türkiye'de saptananlara oranla daha fazla olmasının nedeni olduğu düşünülmektedir. Örneğin Yunanistan'da incelenen beş altın çakalda *Alaria alata*, *Mesocestoides* sp., *Taenia pisiformis*, *Taenia* sp., *Toxocara canis*, *Uncinaria stenocephala*, *Ancylostoma caninum*, *Rictularia* sp. türleri bulunmuştur [21]. İran'da bir çakalda *Mesocestoides* sp. ve kancalıkurt [30], 10 altın çakalda yapılan çalışmada *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina*, *Rictularia affinis*, *Taenia hydatigena*, *Dipylidium caninum*, *Mesocestoides lineatus*, *Joyeuxiella pasqualei*, *Dipylidium nolleri*, *Macroacanthorhynchus hirudinaceus*, *Macroacanthorhynchus* sp., *Alaria canis* [7] ve 11 çakalda yapılan araştırmada ise *Dipylidium caninum*, *Toxocara canis*, *Echinococcus granulosus*, *Toxascaris leonina*, *Dioctophyma renale*, *Taenia hydatigena*, *Ancylostoma caninum*, *Dirofilaria immitis* [28] türleri bildirilmiştir. Sırbistan'da 447 altın çakalda 12 helmint türü saptanırken, en yaygın türlerin *Mesocestoides lineatus*, *Alaria alata* ve *Toxocara canis* olduğu kaydedilmiştir [6]. Ayrıca 60 altın çakalda yapılan başka bir çalışmada ise, 6 helmint türü teşhis edilmiş, bunlardan *A. alata*, *Ancylostomatidae*, *T. canis* en yaygın türler olarak kaydedilmiştir [14].

Çalışmamızda bulunan helmint türlerinden *Rictularia cahirensis*, *Uncinaria stenocephala*, *Mesocestoides* sp., ve *Joyeuxiella echinorhynchoides* daha önce Türkiye'de çakallarda bildirilmiştir [16, 17, 19]. Zoonotik önemi bulunan *Alaria* Türkiye'de daha önce tilkilerde [19] ve sokak köpeğinde [27] saptanmış, altın çakallarda ise kaydedilmemiştir. Ayrıca *Linguatula serrata* da daha sokak köpek-

rinden bildirilmiş [1, 8], ancak çakallarda herhangi bir bildirim yapılmamıştır. Bu çalışmada tespit edilen *Alaria* sp. ve *L. serrata* nimfi bildiğimiz kadarıyla Türkiye'de altın çakallardaki ilk bildirimlerdir.

Çakallarda tespit edilen ve zoonoz özelliği olan helmintlerin insanlara bulaşma yolları ve neden olduğu klinik tablolar incelendiğinde; insanlar enfeksiyona *Alaria* sp.'nin mezoserkerli paratenik konaklarının (kurbağa gibi) çiğ ya da az pişmiş olarak alınması ile yakalanmaktadır. Alınan mezoserkerlerin insanlarda direkt veya dolaşım yoluyla göz dahil tüm dokulara yayılabildiği ve insanlarda ölümlere neden olabildiği bildirilmiştir [27]. Benzer şekilde, *Mesocestoides* sp. tetrathyridiumları ile enfekte yılan, tavuk ve av kuşları gibi ara konakların çiğ ya da az pişmiş olarak insanlar tarafından tüketilmesi ile pleural ve peritoneal tetrathyridiosis oluşmakta, ciddi klinik belirtilere, hatta ölümlere neden olabileceği bildirilmektedir [23]. *Uncinaria stenocephala* L3'lerinin insan derisi ile temas etmesi durumunda, larvalar deriyi delerek Cutaneus Larva Migrans (Deri Larva Göçü) oluşturmakta, bu durum insanlarda dermatitislere neden olmaktadır [5]. *Linguatula serrata*'nın larval dönemleri de insanlarda görülen visceral pentastomiasis'in nedenlerinden biridir. Genelde asemptomatik görülse de, hepatik ya da pulmoner malignite şeklinde klinik ve radyolojik olarak görülebilmektedir [26]. Çalışmada tespit edilen helmintlerin tamamının, ya ara konakları ya da paratenik konakları çakalların yoğun olarak avladığı fare, rat, tavşan, kertenkele gibi sürüngenler ve kuşlardır [2]. Bu durum çakal gibi yabani karnivorların beslenme davranışları ile parazit çeşitliliği ve parazit yükleri arasında bağlantı olduğunu da göstermektedir. Ayrıca çalışmada tespit edilen tüm helmint türlerine köpeklerin de son konak olduğu bilinmektedir. Bu nedenle köpek kaynaklı helmint enfeksiyonlardan korunma ve eradikasyon ile ilgili yapılacak her türlü programda yabani karnivorların da göz önüne alınması, oluşturulacak programların başarı ihtimalini daha da arttıracakları düşünülmektedir. Bu nedenle oldukça geniş yayılışa sahip bu karnivor türündeki parazitlerin belirlenmesi amacıyla daha geniş çaplı çalışmalar yapılarak bu hayvanların taşıdığı parazitlerin belirlenmesi hem halk sağlığı, hem de hayvan sağlığının korunması için oldukça gereklidir. Bu bağlamda çalışmamızda elde edilen sonuçlar altın çakallardaki parazitler hakkında güncel veri niteliği taşımaktadır.

Kaynaklar

- Aldemir OS, (2004). *Erzurum yöresi sokak köpeklerinde Linguatula serrata'nın yayılışı*. Türkiye Parazit Derg. 28 (1): 42-44.
- Ambarlı H, Ertürk A, Soyumert A, (2016). *Current status, distribution and conversation of Brown bear (Ursidae) and wild canids (gray wolf, golden jackals, and red fox; Canidae) in Turkey*. Turk J Zool. 40, 944-956.
- Anderson RC, (2000). *Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission*. 2nd ed.
- Arnold J, Humer A, Heltai M, Murariu D, Spassov N, Hacklander K, (2012). *Current status and distribution of golden jackals Canis aureus in Europe*. Mammal Review. 42(1), 1-11.
- Centers for Diseases Control and Prevention (2017). *Hookworm*. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/dpdx/hookworm/index.html>, Erişim tarihi: 10.04.2019.
- Cirovic D, Pavlovic I, Penezic A, Kulisic Z, Selakovic S, (2015). *Levels of infection of intestinal helminth species in the golden jackals Canis aureus from Serbia*. J Helminthol. 89, 28-33.
- Dalimi A, Sattari A, Motamedi GH, (2006). *A study on intestinal helminthes of dogs, foxes and jackals in the western part of Iran*. Vet Parasitol. 142, 129-133.
- Doğanay A, (1983). *Ankara sokak köpeklerinde Linguatula serrata Frohlich, 1789'un yayılışı ve halk sağlığı açısından önemi*. Ankara Univ Vet Fak Derg. 30 (4), 652-656.
- Eckert J, Gottstein B, Heath D, Liu FJ, (2001). *Prevention of echinococcosis in human and safety precautions*. In: WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern, edited by J. Eckert, M.A. Gemmell, F.X. Meslin, Z.S. Pawlowski. World Organisation for Animal Health, Paris, France, pp.: 238-246.
- Gherman CM, Mihalka AD, (2017). *A synoptic overview of golden jackal parasites reveals high diversity of species*. Parasite Vector, 10, 419-459.
- Gökçen, A, (2008). *Helminlerde Tespit, Boyama ve Kalıcı Preparat Yapımı*. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 32 (2): 177 - 181, 2008
- Hofer S, Gloor S, Müller U, Mathis A, Hegglin D, Deplazes P, (2000). *High prevalence of Echinococcus multilocularis in urban red foxes (Vulpes vulpes) and voles (Arvicola terrestris) in the city of Zürich, Switzerland*. Parasitology. 120(2), 135-142.
- Hrčkova G, Miterpakova M, O'connor A, Šnábel V, Olson PD, (2011). *Molecular and morphological circumscription of Mesocostoides tapeworms from red foxes (Vulpes vulpes) in central Europe*. Parasitology, 138 (5), 638-647.
- Ilic T, Becskei Z, Petrovic T, Polacek V, Ristic B, Milic S, Stepanovic P, Radisavljevic K, Dimitrijevic S, (2016). *Endoparasitic fauna of red foxes (Vulpes vulpes) and golden jackals (Canis aureus) in Serbia*. Acta Parasitol. 61(2), 389-396.
- Lahmar S, Boufana B, Ben Boubaker S, Landolsi F (2014). *Intestinal helminths of golden jackals and red foxes from Tunisia*. Vet Parasitol. 204(3-4), 297-303.
- Merdivenci A, (1983). *Son 30 yıl (1952-1982) içinde Türkiye'de varlığını ilk kez bildirdiğimiz parazitler*. Türk Mikrobiol Cem Derg. 13, 23-38.
- Merdivenci A, Buyurman Ü, (1965). *The case of uncinaria-sis in a jakal in Turkey*. Türk J Biol. 15(1-2), 52-60.
- Meshgi B, Eslami A, Bahonar Ar, Kharrazian-Moghadam M, Gerami-Sadeghian A, (2009). *Prevalence of parasitic infections in the red fox (Vulpes vulpes) and golden jackal (Canis aureus) in Iran*. Iran J Vet Res. 10(4), 387-391.
- Mimioğlu MM, Güralp N, Tolgay N, Sayın F, (1965). *Ankara civarında tilki (Vulpes vulpes)lerde bulunduğumuz helminthler*. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 12(3), 164-190.
- Munson L, Karesh WB, Mcentee MF, Lowenstine LJ, Roelke-Parker ME, Williams E, Woodford MH, Haines D, (2006). *Necropsy of wild animals*. Wildlife Conservation Society. Erişim adresi: <http://www.cldavis.org/ghpn/tools/Necropsy%20of%20Wild%20Animals.pdf>, Erişim tarihi 17.04.2019.
- Papadopoulos H, Himonas C, Papazahariadou M, Antoniadou-Sotiriadou K, (1997). *Helminths of foxes and other wild carnivores from rural areas in Greece*. J Helminthol. 71, 227-231.
- Saeed I, Maddox-Hyttel C, Monrad J, Kapel CM, (2006). *Helminths of red foxes (Vulpes vulpes) in Denmark*. Vet Parasitol. 139(1), 168-179.
- Széll Z, Tolnai Z, Sréter T (2015) *Environmental determinants of the spatial distribution of Mesocostoides spp. and sensitivity of flotation method for the diagnosis of mesocostoidosis*. Veterinary parasitology, 212(3-4), 427-430.
- Şenlik, B. (2011). *"Teşhis Yöntemleri"*, Editör: Tınar R. Veteriner Helminoloji. Bursa, Dora Basım Yayın.
- Takacs A, Szabo L, Juhasz L, Takacs AA, Lanszki J, Takacs PT, Heltai M, (2014). *Data on the parasitological status of golden jackal (Canis aureus L, 1758) in Hungary*. Acta Vet Hung. 62(1), 33-41.
- Tappe D, Büttner DW, (2009). *Diagnosis of Human Visceral Pentastomiasis*. PLoS Negl Trop Dis. 3(2), e320.
- Umur Ş, (1998). *Bir köpekte Alaria alata olgusu*. Turk J Vet Anim Sci. 22, 89-92.
- Vafae Eslahi A, Kia EB, Mobedi I, Sharifdini M, Badri M, Mowlavi G, (2017). *Road killed carnivores illustrate the status of zoonotic helminthes in caspian sea littoral of Iran*. Iran J Parasitol. 12(2), 230-235.
- Yamaguti S (1961). *Systema Helminthum Volume III The Nematodes of Vertebrates Part I*. Interscience Publishers Inc., Newyork. 578-579.
- Zare-Bidaki M, Mobedi I, Sadeghieh Ahari S, Habibzadeh S, Naddaf SR, Siavashi MR, (2010). *Prevalence of zoonotic intestinal helminths of canids in moghan Plain, Northwestern Iran*. Iran J Parasitol. 5(2), 42-51.

Laboratuvar Hayvanlarında Ötenazi Yöntemleri

Sedat Gökmen¹, Aylin Pehlivan², Abdurrahman Aksoy²

¹Amasya Üniversitesi, Suluova Meslek Yüksekokulu, Veteriner Bölümü, Amasya-Suluova, Türkiye

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji AD., Samsun, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 15.01.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 28.03.2019

Özet: Ötenazi; hayvanlarda acı, korku ve sıkıntıya sebep olmadan, insancıl bir şekilde hayatı sonlandırma eylemidir. Laboratuvar hayvanları, çeşitli kimyasal, aşı, ilaç ve gıda katkı maddeleri gibi ürünlerin sağlık üzerindeki potansiyel etkilerini değerlendirmek için yapılan araştırmalarda kullanılmaktadır. Bu araştırmaların sonunda en çok uygulanan işlemlerden biri de ötenazidir. Laboratuvar hayvanlarının ötenazisinde kullanılan yöntemler kimyasal ve fiziksel olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bu derlemede, laboratuvar hayvanlarında uygulanan ötenazinin tarihçesi, etik ilişkisi, etki mekanizması, kalıntıların ortadan kaldırılması ve yöntemleri hakkında bilgi verilmiştir.

Anahtar kelimeler: Ötenazi, Laboratuvar Hayvanı, Tarihçe, Etik, Yöntem

Euthanasia Methods in Laboratory Animals

Abstract: Euthanasia is humanitarian end-of-life action without causing pain, fear and distress in animals. Laboratory animals are used in research to evaluate the potential impacts on health in products such as various chemicals, vaccines, medicines and food additives. One of the most common operations at the end of these investigations is euthanasia. The methods used for euthanasia of laboratory animals are divided into chemical and physical methods. In this review article; history, ethical relation, mode of action, removal of remains and methods of euthanasia in laboratory animals are inform.

Key words: Euthanasia, Laboratory Animals, History, Ethics, Methods

Giriş

Tanım

Ötenazi, Yunanca “iyi” ve “ölüm” anlamına gelen sırasıyla “eu” ve “thanatos” kelimelerinin bir araya getirilmesiyle türetilmiştir. Daha geniş anlamda ötenazi; hayvanlarda acı, korku ve sıkıntıya sebep olmadan insancıl bir şekilde hayatı sonlandırma eylemidir [25]. Ötenazi, sırasıyla bilinç kaybı, dolaşım-solunumun durması ve beyin fonksiyon kaybı ile sonuçlanmaktadır [13]. Laboratuvar hayvanları, çeşitli kimyasal, aşı, ilaç ve gıda katkı maddeleri gibi ürünlerin sağlık üzerindeki kısa ve uzun süreli potansiyel etkilerini değerlendirmek için yapılan araştırmalarda kullanılmaktadır [12, 16]. Ötenazi, bilimsel araştırmalarda kan, doku ve organ elde etmek, aynı zamanda hayvanlarda ağrı, acı ve sıkıntı seviyelerini sonlandırmak için yapılır. Ötenazi yöntemi ve tekniği, araştırmalardan elde edilecek sonuçlarda ölçülecek parametreleri doğrudan; örnek toplama, zamanlama ve yer seçimi ile ilgili olarak da dolaylı şekilde etkilemektedir. Ayrıca, deney hayvanlarında çeşitli seviyelerde stres tepkisi oluş-

turabilmekte, bu da kortikosteron ve diğer endokrin sinyal moleküllerinin seviyelerini etkileyerek; biyolojik belirteç olarak kullanılabilir dokular da hedef düzeylerini etkilemektedir [7]. Evcil ve laboratuvar hayvanlarının ötenazisinde kullanılan yöntemler için esaslar, Kanada Konseyi (CCAC) ve Amerikan Veteriner Hekimler Birliği (AVMA) gibi kuruluşlar tarafından sağlanmaktadır [39].

Tarihçe

İnsanlar, başlangıçta hayvanları beslenme, ulaşım ve arkadaşlık için kullanmışlardır. Deneysel araştırmalarda hayvanların kullanımı ise Aristoteles (MÖ 384-322) ve Hipokrat'ın (MÖ 460-370) insan anatomisi ve fizyolojisini araştırdığı çalışmalarla başlamıştır. Cladius Galen (MS 130-210), domuz, maymun ve üzerinde fizyolojik deneyler gerçekleştirilmiştir. Galen'den sonra, Rönesans'ın başlangıcına (~1300) kadar deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalara ara verilmiş, Avrupa'nın karanlık çağları olarak tanımlanan VII. ve XIV. yüzyıllar arasında, müslüman bilim insanları tarafından hayvanlar üzerinde,

davranış, yetiştirme, anatomi, operasyon ve tedavi ile ilgili birçok eser bilim dünyasına kazandırılmıştır. Daha sonra Andreas Vesalius'un (1514-1564) "16.Yüzyılın Anatomik Rönesans'ı" kabul edilen anatomi çalışmalarıyla devam edilmiştir. 17.yüzyılda Descartes, insanların akıl ve maddeden oluşan ve düşünebilen varlıklar, hayvanların ise düşünemeyen makineler olarak görüldüğü Kartezyen felsefesini ortaya koymuştur. 20.yüzyılda farmakoloji, toksikoloji ve immünoloji gibi bilim alanlarındaki gelişmeler ile deney hayvanlarının kullanımı daha da artmıştır [3, 12, 24].

Ötenazi ve etik ilişkisi

Deneylerde kullanılan hayvanların ağrı, ıstırap ve stresini en az düzeye indirmek gerekmektedir. Bu nedenle araştırmacılar, deney sırasında veya sonunda ve hayvanın gerçek ölümünden önce ötenazi kararı verebilirler. Buna göre ötenazi: araştırma protokolünde gerekliyse, analjezik, sedatif ve diğer tedavilerle hayvanın ağrı ve sıkıntısı giderilemiyorsa veya hayvanlar ölmek üzere ise uygulanmalıdır [20]. Ölmek üzere olan hayvanlarda görülen başlıca belirtiler; solunumun çok yavaş, yüzeysel ve çabalararak olması, hızlı kilo kaybı, duruş bozukluğu, iştahsızlık, davranış bozukluğu, kaslarda atrofi, letarji ve ayağa kalkamamasıdır. Ötenazi sonrasında elde edilecek dokuların araştırmanın amacına uygun ve kullanılabilir durumda olması gerekir, aksi takdirde hayvanların kullanımı nedensiz ve etik dışı olacaktır [32, 37]. Ötenazi yöntemi seçilirken araştırmacılar uygun ve yasaklanan yöntemleri iyi bilmelidirler. Uygulamak istenilen ötenazi yöntemi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna sunulan projede ayrıntılı olarak yazılmalı ve mutlaka etik kurul tarafından onaylanan yöntem uygulanmalıdır [11,12, 20].

Ötenazi yöntemlerinin etki mekanizmaları

Ötenazide kullanılan yöntemler üç temel mekanizma ile ölüme neden olmaktadır. Bunlar doğrudan veya dolaylı şekilde gelişen hipoksi, hayati önem taşıyan nöronların baskılanması, beyin aktivitesinin ve önemli nöronların tahrip edilmesidir [7].

Ötenazide sonucun onaylanması

Ölümün tanımlanmasında en önemli bulgular; kalp ve solunumun durması, reflekslerin olmaması ve ölüm sertliği (rigor mortis) gözlenmesidir. Küçük

laboratuvar hayvanlarında vücut sıcaklığının 25°C'nin altına düşmesi de ölümün diğer bir belirtisi olarak tanımlanmaktadır. Ölüm teyidi konusunda herhangi bir şüphe söz konusu ise ikinci bir ötenazi yöntemi kullanılmalıdır [7, 9]. Ölümün gerçekleştiğini onaylamak için solunum, kalp atışı, nabızın olmaması, mukozalarda renk kaybı, kornea ve palpebra reflekslerinin kaybolması, gözlerde buzlu cam görüntüsü ve rigor mortis işaretleri kullanılmaktadır [20, 17].

Kalıntıların ortadan kaldırılması

Hayvanlarda ölüm onaylandıktan sonra seçilen ötenazi yöntemine bakılmaksızın kalıntılar dikkatli ve uygun bir şekilde ortadan kaldırılmalıdır. Kalıntıların imha edilmesinde gömme, yakma ve gübreleştirme gibi yöntemler kullanılmaktadır. Yalnızca hayvan kalıntıları değil kullanılan ilaçlar ve ötenazi sırasında ortaya çıkan diğer atıklar da dikkatli bir şekilde imha edilmelidir. Özellikle zoonoz hastalık taşıyan ya da radyoizotop ve toksik kimyasalların uygulandığı bilinen hayvanlar taşınırken olası tehlikeler değerlendirilmeli ve korunmak için gerekli tedbirler alınmalıdır [7, 20, 28].

Ötenazi Yöntemleri

Laboratuvar hayvanlarının ötenazisinde kullanılan yöntemler; kimyasal ve fiziksel olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Kimyasal yöntemler; hayvanlarda ölüme neden olan farmasötik ya da kimyasal formülasyonların uygun yollarla verilmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde kullanılan enjektabl ya da uçucu bileşikler, ilk olarak merkezi sinir sistemini daha sonra kardiyovasküler sistemi baskı altına alarak etkilerini gösterirler. Bu yöntem genellikle anestezik maddelerin yüksek dozları uygulanarak gerçekleştirilir. Fiziksel yöntemlere göre daha hızlı ve estetik metotlardır. Fiziksel yöntemler ise beyin ya da medulla spinalisin fiziksel travması ile hızlı bir şekilde bilinç kaybı oluşturmaktadır. Fiziksel yöntemler, farmasötik maddelerin kalıntı problemi-ne yol açmadığı ve kimyasal yöntemlerden meydana gelen fizikohistokimyasal ve biyokimyasal değişimler oluşturmeyen yöntemlerdir. Tür, yaş, vücut ağırlığı, kullanılacak teknik, uzmanlık ve ötenazi sonrası incelemeler gibi çeşitli faktörler göz önüne alınarak farklı ötenazi yöntemleri seçilebilir ya da birlikte uygulanabilir [7, 14, 15, 24].

Kimyasal yöntemler

Kimyasal yöntemler; inhalasyon anestezipler, karbonmonoksit (CO), nitrojen (azot, N₂), argon (Ar) ve karbondioksit (CO₂) gibi uçucu bileşiklerin uygun kapalı sistemler aracılığıyla veya barbitürik asit ve türevleri, pentobarbital kombinasyonu, potasyum klorid, T-61, tribromoetanol, dissosiyatif ajan kombinasyonu ve alkoller gibi uçucu olmayan bileşiklerin uygun yollarla laboratuvar hayvanlarına verilmesi ile gerçekleştirilir [33, 36].

Uçucu bileşikler

a) İnhalasyon anestezipler ajanlar; halotan, izofluran, enfluran, sevofluran ve desfluran gibi ajanlar tek başlarına ya da azot peroksit ile birlikte laboratuvar hayvanlarının ötenazisinde kullanılmaktadır. Ancak azot protoksit tek başına ötenazi amacıyla kullanılmaz [5]. Oluşabilecek hipoksiyi önlemek için inhalasyon anestezipler ajanlarıyla birlikte kapalı sisteme hava veya oksijen (O₂) verilmelidir [20]. Halotan; laboratuvar hayvanlarının ötenazisinde sıklıkla kullanılan hızlı ve etkili bir ajandır [10]. %4'lük halotan fare, rat, kobay ve tavşanlarda 90 saniye için de kalbi baskı altına alarak ölüm şekillendirir [28]. Halotan; rat ve fareler için enfluran ve izofluran ile karşılaştırıldığında daha az irkilticidir. Enfluran karaciğerde metabolize olduğundan; ilaç metabolizması ya da toksikolojik çalışmalarda tercih edilmemelidir. Bunun yerine halotan tercih edilebilir [19]. İzofluran, laboratuvar hayvanlarının ötenazisine yaygın olarak kullanılan diğer bir anestezipler ajan olup etkisini solunum ve kardiyovasküler sistemini baskılayarak meydana getirir. Karaciğerde metabolize olmadığı için karaciğer dokusu ile ilgili toksikolojik veya mikrozomal çalışmalarda ilk tercih edilen kimyasal bileşiklerdendir. Fakat kan glikoz konsantrasyonunu yapay olarak arttırdığı için kan-glikoz düzeyi çalışmalarında ve bunun etkileyebileceği araştırmalarda kullanılmamalıdır [20]. Keskin kokusu nedeniyle izofluran nefesini uzun süre tutabilecek hayvan türlerinde kullanılmamalıdır [15]. Koku; hayvanların nefesini tutmasına neden olur ve bunun sonucunda da bilinç kaybı süresi uzar [26]. İnhalasyon anestezipler ajanların kapalı sistemlerde verilme hızı 0,5-10 L/dakika arasında olmalıdır. Eğer O₂ ile beraber verilecekse akış hızındaki oranı en fazla %5-7 arasında olmalıdır [30]. Anesteziye girişi hızlandırmak için %70'e kadar

N₂O diğer inhalasyon anestezipler ajanlarla beraber kullanılabilir. İnhalasyon anesteziplerin ötenaziye sağlayan dozları damar içi uygulandığında genellikle 5 saniyeden daha kısa sürede bilinç kaybı, 10 saniyede de ölüm şekillenir. Periton içi uygulamalarında ise genellikle 1-3 dakikada bilinç kaybı, 5-20 dakika arasında ölüm şekillenir [27]. Uçucu bileşiklerin; damar içi enjeksiyon gerektirmemesi, küçük hayvanlara (<7 kg) kolay uygulanabilmeleri ve normal laboratuvar şartlarında yanıcı ve patlayıcı olmamaları gibi avantajları vardır. Ancak hayvanlarda anesteziye girişte endişeye yol açmaları, taşıyıcı gaz olarak O₂ kullanılması durumunda ötenazi süresinin uzaması, dokularda kalıntıya yol açmaları ve istismar için kullanılabilmesi gibi dezavantajları vardır. [20].

b) Karbonmonoksit; (CO); renksiz, kokusuz ve patlayıcı olmayan (<%10-12) bir gazdır [20]. Ötenazi amacıyla kullanımı bazı ülkelerde yasaklanmıştır. Konsantrasyonu %10-12 üzerinde olduğu durumlarda, patlayıcı ve personel için toksik etkili olduğundan güvenilirlik problemleri ortaya çıkar [27]. Kobaylara kapalı sistemde hacimce %8 oranında CO uygulandığında 2 dakika içinde kollaps ve 6 dakika içinde de ölüm şekillenir [19]. Rat ve farelerde ise % 4-6 konsantrasyondaki CO uygulaması sonrasında 40 saniye içinde kollaps ve bilinç kaybı, 2 dakika içinde solunumu ve 5-7 dakika içinde de kalbin çalışmasını baskılayarak ölüm şekillenir. Ağrısız bir yolla bilinç kaybı oluşturması, CO ile oluşan hipoksiye vücutta bir tepki şekillenmemesi gibi avantajları, laboratuvar hayvanları için tiksindirici, CO gazına maruz kalan ışık, fan gibi elektrikli aletlerde patlama riskinin olması gibi bazı dezavantajları vardır [20].

c) Nitrojen ve argon (İnert gazlar); yanıcı/patlayıcı olmayan, renksiz, kokusuz ve inert gazlardır. Tek başlarına ötenazi için kullanılmazlar. Anesteziye alınmış ya da sedatif ilaç uygulanmış tavşan ve ratların ötenazisinde kullanılır. Ancak sedatif ya da anestezipler ajanlar ötenazi süresini uzatırlar [20]. Gerekli şartlar yerine getirildiğinde nitrojen ratlarda 30 saniye içinde bilinç kaybı ve 60 saniye içinde de ölüm şekillendirmektedir. Bu yöntemin deney hayvanlarında kortikosteron konsantrasyonunu belirlemek amacıyla yapılan araştırmalarda kullanılabileceği önerilmektedir [20, 33]. İnert gazlar; yanıcı olmayıp, ucuz olmalarına rağmen, ratların

ötenazisinde tiksindirici bir kokuya sahip olduklarından ve anesteziklerle beraber kullanıldıklarından dolayı ölüm süresini uzatabilmektedirler. [20].

d) Karbondioksit; Laboratuvar hayvanlarının ötenazisinde yaygın olarak kullanılan CO₂ tek seferde çok sayıda laboratuvar hayvanının ötenazisini sağlar. Deney hayvanlarında hipoksi şekillenmeden bilinç kaybı oluşturmak için oksijen ya da hava içinde en az %70 oranında CO₂ verilmesi tavsiye edilmektedir. Fakat kobaylar için bu oranın %100 olması önerilmektedir [7]. Kapalı sistem haznesi %10–30 hacim/dakika gaz akışıyla kademeli olarak CO₂ ile doldurulmalıdır. Fare ve ratlarda %3-20 arasındaki CO₂ konsantrasyonu tiksintmeye, % 10-35 arasındaki CO₂ konsantrasyonu korku oluşumuna neden olmaktadır [18, 38]. Laboratuvar hayvanlarına kapalı sistemle %10–30 hacim/dakika gaz akışıyla CO₂ verildiğinde 1-3 dakika içinde bilinç kaybı, 5-10 dakika sonra da ölüm şekillenebilir [29].

Uçucu olmayan bileşikler

Deney hayvanlarının ötenazisinde kullanılan enjektabl ajanlar intravenöz yolla uygulandığında hızlı ve güvenli bir şekilde etki meydana getirirler [7]. Ancak intravenöz yolla uygulamanın pratik olmadığı veya mümkün olmadığı durumlarda, iritan özellikte olmayan ötenazi ajanları periton içi yolla verilebilir. Ayrıca anestezi altındaki deney hayvanlarına intrakardiyak yolla da verilebilir [20, 36]. Ötenazi için genellikle anestezi dozunun üç katı olacak şekilde doz hesaplanması yapılmalıdır [7].

a) Barbitürik asit ve türevleri; barbitüratlar önce sinir sistemini baskı altına alarak bilinç kaybı oluşturur, daha sonra solunum ve kalbin çalışmasını baskılayarak etki gösterirler [19]. Barbitüratlar periton içi yolla uygulandığında bağırsaklarda artefakt ve üreme hormonlarının seviyesinde değişikliğe yol açabilirler [1, 2]. Tüm barbitürik asit türevleri ötenazi amacıyla anestezi dozunun üç katı miktarında kullanılabilir [7]. Laboratuvar hayvanlarının ötenazisinde en yaygın kullanılan barbitürik asit türevi sodyum pentobarbital'in %18 (200 mg/ml) konsantrasyonu 200 mg/kg dozda intravenöz veya intraperitoneal yolla uygulanabilir. İntrakardiyak enjeksiyon, şiddetli ağrıya neden olduğu için sadece genel anestezi altındaki deney hayvanlarına uygulanabilir. Ayrıca 50 mg/kg konsantrasyonda %10'luk etanol ve steril su içinde sodyum pentobarbitalin

çözdürülerek kullanılması ötenazi sırasında deney hayvanlarında hemoliz oluşmasını engeller [33, 36]. Düşük seviyede huzursuzluğa neden olarak hızlı şekilde ölüm şekillendirmesi, diğer ötenazi ajanları ile karşılaştırıldığında daha ekonomik olması gibi avantajlarının yanında, yeşil reçeteye tabi olması, diğer farmasotik ve kimyasal maddelerden ayrı muhafaza edilmesi ve kaydının tutulması gibi dezavantajları vardır [20].

b) Pentobarbital kombinasyonu; ötenazi için pentobarbital lokal anestezik ya da çırpınma önleyici bileşikler ile kullanılmalıdır [20]. Pentobarbital ötenazi amacıyla nöromusküler bloke edici ajanlar ile birlikte kullanılmamalıdır. Karın boşluğu organlarının ve solunum yollarının histopatolojik çalışmalarında tercih edilen bir bileşiktir. Fakat ratlarda sperm motilitesini azalttığı için bu konuyla ilgili yapılacak çalışmalarda tercih edilmemelidir [33]. Pentobarbital kombinasyonu periton içi verilmesine takiben 5-10 dakika, damar içi verilmesine takiben 20-60 saniye arasında ölüm şekillenebilir [29, 36].

c) Potasyum klorid (KCl); halojenür bir metal tuzudur [33]. Anestezi altındaki deney hayvanların ötenazisi için intravenöz ya da intrakardiyak yolla uygulandığında kalp kası hücrelerinde depolarizasyona yol açarak kalbin çalışmasını baskılar [14, 33]. Ancak ötenazi için kullanılması Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmamıştır [20].

d) T-61; embudramide, mebezonyum iyod ve tetrakain hidroklorid karışımından oluşur. Etkisini hızlı bir şekilde gösterir fakat sadece intravenöz yolla ve çok yavaş bir şekilde uygulanmalıdır. Deney hayvanlarında damar içi enjeksiyon zor olduğundan ötenazi için T-61 çok tercih edilmemektedir. Diğer uygulama yollarıyla kesinlikle verilmemelidir [7, 8].

e) Dissosiyatif ajan kombinasyonları; ketamin gibi dissosiyatif ajanların yüksek dozları laboratuvar hayvanlarının ötenazisinde sıklıkla kullanılmaktadır [34]. Ötenazi amacıyla ketamin/ksilazin kombinasyonu anestezi oluşturan dozunun dört katı miktarında kullanılmalıdır [6]. Bilinci açık kemirgenlerde ketamin ve benzer dissosiyatif ajanlar, α -2-adrenerjik reseptör agonisti (ksilazin gibi) veya benzodiazepinler (diazepam gibi) ile kombinasyon halinde kullanılmalıdır [34].

f) Alkoller; sinir ve solunum sistemini bas-
kılı altına alarak anoksi ve anestezi oluşturarak etki
gösterirler [20]. Etanol; fiziksel yöntemlere ihtiyaç
duyulmadığında veya diğer ötenazi yöntemleri için
gerekli bileşiklerin bulunmadığı durumlarda bilinç
kayıbı şekillenmiş rodentlerin ötenazisinde uygula-
nabilir. %70'lik etanolün periton içi uygulanması
ötenazi için uygun bir yöntem olabileceği öneril-
miştir [7, 21]. Farelere %70'lik 0,5 ml etanol enjekte
edildiğinde 1-2 dakika içinde koma, 2-4 dakika
içinde de ölüm meydana gelebilir [21]. Farelerden
antikor üretimi gibi uygulamalarda etanolle ötenazi
kabul edilirken diğer uygulamalarda kullanıp kulla-
nılmaması konusunda görüş ayrılığı bulunmaktadır
[22]. Tribromoetanol, farelerin anestezisinde kullanı-
lan ilaç dışı kimyasal ajan enjektabl bir ajandır [35].
Ayrıca peritonitis şekillendirdiği için kullanımı tar-
tışmalıdır [23].

Fiziksel Yöntemler

Fiziksel yöntemler; servikal dislokasyon, dekapitasyon, maserasyon, mikrodalga ve beyin sarsıntısı uygulamalarını içerir [33].

Servikal dislokasyon; yıllardır küçük laboratuvar hayvanlarının ötenazisinde kullanılan bir yöntemdir. Fare, erişkin olmayan tavşan (<1 kg) ve 200 g'dan düşük vücut ağırlığına sahip sıçanların ötenazisinde uygulanır [6, 7, 14]. Servikal dislokasyon yönteminde omurilik kopararak beyin ile hayati organlar arasındaki bağlantı kaybolur [14]. Büyük yapılı rodentlerde ve yaşlı sıçanlarda uygulama öncesi sedasyona alınmaları tavsiye edilmektedir [8]. Yapılan araştırmalara göre sıçanlarda, servikal dislokasyon meydana geldikten sonra beyindeki elektriksel aktivitenin 13 saniye daha devam ettiği daha sonra kaybolduğu tespit edilmiştir. 200 g'dan fazla vücut ağırlığına sahip sıçan ve olgunlaşmış tavşanlarda boyun bölgesinde yoğun kas kitlesi bulunduğu için fiziksel olarak boyun omurunu kafatasından ayırmak oldukça zordur ve bu yöntem tavsiye edilmez [6, 20]. Ayrıca hamster ve kobaylarda boyun bölgesinin kısa ve kasların güçlü olması, boyun ile omuzlardaki deri kısmının gevşek olmasından dolayı servikal dislokasyon yönteminin gerçekleştirilmesi oldukça zordur [8]. Laboratuvar hayvanlarında servikal dislokasyon gerçekleştirildikten sonra 10-15 saniye arasında bilinç kaybı, bilinç kaybı şekillendikten sonra 10-15 saniye arasında ölüm şekillenir

[29]. Dokularda kimyasal madde kalıntısına yol açmaması ve hızlı ölüm şekillendirmesi gibi avantajları, yöntemi uygulayan personel için estetik olarak hoş gitmeyen bir durum olması, uygulanabilecek hayvan (fare, olgunlaşmamış tavşan ve 200 g'dan daha az vücut ağırlığına sahip sıçan) skalasının dar olması gibi dezavantajları vardır [20].

Dekapitasyon; keskin bir alet yardımıyla deney hayvanının boynu kesilerek baş ile gövde kısmının birbirinden ayrılması işlemidir. Baş ve gövde kısmı tam olarak birbirinden ayrıldığı için beyin dokusu yetersiz kanlanmadan dolayı tüm fonksiyonlarını kaybeder. Çeşitli türlerde dekapitasyon sonrası beyindeki elektriksel aktivite ortalama 13-14 saniye devam etmektedir. Ancak bu durum anestezinin kullanılıp kullanılmadığına bağlı olarak 3-40 saniye arasında değişebilmektedir [4]. Dekapitasyon işlemi için özel dizayn edilmiş giyotinler kullanılmaktadır [14, 34]. Dokularda kimyasal madde kalıntısına yol açmaması, ölümün hızlı ve kolay meydana gelmesi, anatomik olarak hasar görmemiş beyin dokusu elde edilebilmesi gibi avantajları yanında, yöntemi gerçekleştirmek için gerekli olan tutma işleminin hayvanlarda strese yol açabilmesi, dekapitasyon sonrası beyindeki elektriksel aktivitenin varlığının yorumlanmasının zor olması gibi dezavantajları vardır [20].

Mikrodalga; mikrodalga cihazları fare, sıçan ve küçük tavşanların (<300g) ötenazisinde kullanılmak üzere özel olarak (maksimum güç çıkışı 1,3-10 kW) tasarlanmıştır [7]. Cihaz deney hayvanının baş kısmına mikrodalga enerji göndererek ölüm şekillendirir [20, 31]. Bilinç kaybı ve ölüm şekillenmesi için gereken zaman cihazlar arasında farklılık göstermektedir [20]. Ötenazi için rutin olarak kullanılan bir yöntem olmayıp daha çok nörobiyologlar tarafından beyin dokusundaki kimyasalların *in vivo* olarak incelenmesinde tercih edilmektedir [2, 7].

Beyin sarsıntısı (Concussion); deneyimli personel tarafından tavşanların oksipital bölgedeki boynun üst kısmına yardımcı ekipman ile hızlı bir şekilde vurularak gerçekleştirilir. Ölümün gerçekleştiği süre dolaşımın durması ile teyit edilmelidir [8, 15]. Bu uygulamada 0,1 saniyeden daha kısa sürede bilinç kaybı, 5 saniye içinde de ölüm şekillenir [29]. Laboratuvar hayvanların ötenazisinde kullanılan yöntemler aşağıdaki tablo 1' de özetlemiştir [7, 15, 20, 29].

Yeni doğan ve fetüslerde ötenazi

Yeni doğan hayvanlar ve fetüslerin ötenazisinde özel durumlar vardır. Yeni doğan hayvanlar ve fetüsler hipoksiye karşı dayanıklı oldukları için ötenazide CO₂ uygulaması önerilmez. Enjektabl anestetik maddelerin (örneğin pentobarbital) yüksek dozları önerilmektedir. Servikal dislokasyon, yeni doğan hayvanların vücutlarının küçük olması nedeniyle ergin hayvanlarla karşılaştırıldığında uygulanabilirliği zordur. Fetüs, rahim (uterus) içinde bulunduğu süre boyunca bilinçli değildir. Eğer gebeliğin sonuna gelmiş hayvanlar öldürülecek ve fetüsün dokularını elde etmek için bilimsel gereksinime ihtiyaç yoksa anestetik maddelerin yüksek dozları anneye

verilerek ötenazi gerçekleştirilebilir. Bunun sonucunda fetüsler rahim içinde hipoksi şekillenmesinden dolayı ölürlere [29].

Deney hayvanlarının ötenazisinde kabul edilmeyen yöntemler

Sitriknin, nikotin, kafein, magnezyum sülfat, dezenfektanlar, tüm nöromusküler bloke edici ajanlar, toksinler, solventler, hidrojen siyanür, kloralhidrat, boğma, trikloretilen, metoksifloran, hipotermi, nitrojen (tek başına olduğu zaman), azot oksit, opioidler, α -kloraloz, üretan vb. fiziksel ve kimyasal yöntemlerin deney hayvanlarının ötenazisinde kullanılması uygun değildir [7, 8, 20].

Tablo 1. Rodentlerin ötenazisinde kullanılan bazı yöntemler ve özellikleri [7, 15, 20, 29]

Ajan	Etki oluşturma mekanizması	Etki şekli	Hız	Etki	Uygulama kolaylığı	Personel güvenliği	Estetik değeri	Derecelendirme (1-5)	Görüş
Halotan, enfloran, izofloran	Hipoksi	Serebral korteks, subkortikal yapılar ve hayati öneme sahip merkezlerin doğrudan baskılanması	++	++	++	+	++	5	Uygulanabilir
Sodyum pentobarbital	Hipoksi ve kalpte ritim bozukluğu	MSS' nin baskılanması	++	++	+	+	++	5	Uygulanabilir
Servikal Dislokasyon	Hipoksi	Beyin fonksiyonlarının doğrudan baskılanması ve kardiyak fibrilasyon	++	++	+	++	-	4	150-200 g'ın altındaki rodentler için uygulanabilir
T-61	Hipoksi	Serebral korteks, subkortikal yapılar ve solunumun baskılanması	++	++	-	+	++	4	Sadece intravenöz uygulanmalıdır
Karbondioksit	Solunum asidozu ve anestezi sonrası hipoksi, hayati öneme sahip merkezlerin baskılanması	Serebral korteks, subkortikal yapılar, hayati merkezlerin ve kalp kasının doğrudan baskılanması	+	++	++	++	++	4	%70 konsantrasyondan fazla olmalıdır
Potasyum klorid	Kardiyotoksik	Serebral korteks, subkortikal yapılar, hayati merkezlerin ve kalp kasının doğrudan baskılanması	+	+	-	+	++	4	Bilinçsiz hayvanlara intrakardiyak ya da intravenöz uygulanabilir
Mikrodalga ışınma	Beyindeki enzimlerin inaktivasyonu	Beyin sıcaklığının ani bir şekilde artması sonucu beyin enzimlerinin inaktivasyonu	++	++	-	++	+	3	Sadece deneyimli personel tarafından uygulanabilir. Rutin uygulama değildir
Dekapitasyon	Hayati öneme sahip merkezlerin hasarından dolayı gelişen hipoksi	Beynin doğrudan baskılanması	+	+	+	++	-	2	Diğer yöntemler tercih edilmelidir
Karbonmonoksit	Hipoksi	Hemoglobine bağlanarak O ₂ 'nin bağlanmasının engellenmesi	+	+	+	-	++	2	Personel için tehlikelidir

Hız: ++ çok hızlı, + hızlı, - yavaş. Etki: ++ çok etkili, + etkili, -etkili değil. Uygulama kolaylığı: ++ kolay uygulanabilir, + deneyim gereklidir, - uzmanlık gerektirir. Personel güvenliği: ++ tehlikeli değil, + az tehlikeli, - tehlikeli. Estetik değeri: ++ estetik, + çoğu insan için onaylanmış, - birkaç insan için kabul edilmez. Derecelendirme: 1 çok kötü 5 oldukça iyi.

Kaynaklar

- Arnold M, Langhans W, (2010). Effects of anesthesia and blood sampling techniques on plasma metabolites and corticosterone in the rat. *Physiol Behav.* 99(5), 592-598.
- Artwohl J, Brown P, Corning B, Stein S, (2006). Report of the ACLAM task force on rodent euthanasia. *J Lab Anim Sci.* 45(1), 98-105.
- Baumans V, (2005). Science-based assessment of animal welfare: Laboratory Animals. *Rev Sci Tech.* 24(2), 503-514.
- Brown MJ, Smiler K, (2001). Ethical Considerations and Regulatory Issues. Suckow AM, Stevens AK, Ronald P. eds. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster and Other Rodents.* Academic Press, Cambridge. p. 3-11
- Brunson DB, (1997). Pharmacology of inhalation anesthetics. *Anesthesia and analgesia in laboratory animals* 2, 83-93.
- Charbonneau R, Niel L, Olfert E, Von Keyserlingk M, Griffin G, (2010). 7-26. CCAC guidelines on Euthanasia of animals used in science. Canadian Council on Animal Care, Canada.
- Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth E-M, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C, (1996). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. *Lab Anim.* 30(4), 293-316.
- Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth E-M, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C, (1997). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. *Lab Anim.* 31(1), 1-32.
- Dolan K, (2007). Laboratory animal law: Legal control of the use of animals in research. 1-7. Blackwell Publishing, Oxford.
- Flecknell P, Roughan J, Hedenqvist P, (1999). Induction of anaesthesia with sevoflurane and isoflurane in the rabbit. *Lab Anim.* 33(1), 41-46.
- Fraser D, Weary DM, Pajor EA, Milligan BN, (1997). A scientific conception of animal welfare that reflects ethical concerns. *Anim Welf.* 6, 187-205.
- Melikoğlu Gölcü B, Aksoy A, (2017). Avrupa Birliği ve Türkiye’ de Deney Hayvanları Mevzuatına Genel Bir Bakış. *Türkiye Klinikleri J Lab Anim.* 1(1), 56-62.
- Guedes SR, Valentim AM, Antunes LM, (2017). Mice aversion to sevoflurane, isoflurane and carbon dioxide using an approach-avoidance task. *Appl Anim Behav Sci.* 189, 91-7.
- Hellebrekers LJ, Hedenqvist P, (2011). Laboratory Animal Analgesia, Anesthesia, and Euthanasia. Morton D, Hau J. eds. *Handbook of Laboratory Animal Science Essential Principles and Practices.* CRC Press, ABD, p. 485-534.
- Jiménez-Coello M, Acosta-Viana KY, Ortega-Pacheco A, Guzmán-Marín E, (2011). Medical and Bioethical Issues in Laboratory Animal. Kure J. eds. *Euthanasia-The” Good Death” Controversy in Humans and Animals.* In Tech, Croatia. p. 191-219.
- Voipio HM, Baneux P, Gomez de Segura IA, Hau J, Wolfensohn S, (2008). Guidelines for the veterinary care of laboratory animals: report of the FELASA/ECLAM/ESLAV Joint Working Group on Veterinary Care. *Lab Anim.* 42(1), 1-11.
- Keyvan E, (2010). Sığır karkaslarında post-mortem değişiklikler. *Vet Hekim Der Derg.* 81(2), 43-6.
- Kirkden RD, Niel L, Lee G, Makowska IJ, Pfaffinger MJ, Weary DM, (2008). The validity of using an approach-avoidance test to measure the strength of aversion to carbon dioxide in rats. *Appl Anim Behav Sci.* 114(1), 216-34.
- Leach M, Bowell V, Allan T, Morton D, (2002). Degrees of aversion shown by rats and mice to different concentrations of inhalational anaesthetics. *Vet Rec.* 150(26), 808-15.
- Leary SL, Underwood W, Anthony R, Gwaltney-Brant S, Poison A, Meyer R, (2013). AVMA guidelines for the euthanasia of animals. Illinois, Schaumburg.
- Lord R, (1991). Humane killing. *Nature,* 350(6318), 456.
- Lord R, (1989). Use of ethanol for euthanasia of mice. *Aust Vet J.* 66(8), 268.
- Meyer RE, Fish R, (2008). Pharmacology of injectable anesthetics, sedatives, and tranquilizers. In: Fish R, Danneman P, Brown M, Karas A. eds. *Anesthesia and analgesia of laboratory animals.* 2nd edition. San Diego. Academic Press. p. 27-83.
- Musthaq S, Daş YK, Aksoy A, (2018). Alternative Methods to Animal Experiments. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 38 (2), 161-170.
- Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA, (1993). Guide to the care and use of experimental animals. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA.eds. *Euthanasia,* Canadian Council on Animal Care, Ottawa. p. 222-239.
- Preckel B, Bolten J, (2005). Pharmacology of modern volatile anaesthetics. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 19(3), 331-48.
- Raub JA, Mathieu-Nolf M, Hampson NB, Thom SR, (2000). Carbon monoxide poisoning—a public health perspective. *Toxicology,* 145(1), 1-14.
- Reilly J, (2001). Euthanasia of animals used for scientific purposes. 2nd Edition, Adelaide, Anzccart, p. 6-60.
- Richardson C, Leach M, Roughan J, (2018). eModule-Humane Methods of Killing Laboratory Animals. Erişim adresi: <https://flairelearning.com/course/humane-methods-of-killing-laboratory-animals/ErişimTarihi: 23.03.2018>.
- Schmid RD, Hodgson DS, McMurphy RM, (2008). Comparison of anesthetic induction in cats by use of isoflurane in an anesthetic chamber with a conventional vapor or liquid injection technique. *J Am Vet Med Assoc.* 233(2), 262-266.
- Stavinoha W, (1983). Study of brain neurochemistry utilizing rapid inactivation of brain enzyme activity by heating with microwave irradiation. Blank CL, Stavinoha WB, Maruyama Y. eds. *Microwave Fixation of Labile Metabolite,* Pergamon Press, Oxford. p. 1-12.
- Stokes WS, (2002). Humane endpoints for laboratory animals used in regulatory testing. *ILAR J.* 43(1), 31-38.
- Gagae-Iurascu M, Craig S, (2011). Euthanasia and Necropsy. Suckow AM, Stevens AK, Ronald P. eds. *The Laboratory*

- Rabbit, Guinea Pig, Hamster and Other Rodents. Academic Press, Cambridge. p. 117-136.
34. Vaupel D, McCoun D, Cone EJ, (1984). Phencyclidine analogs and precursors: rotarod and lethal dose studies in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 230(1), 20-7.
35. Weiss J, Zimmermann F, (1999). Tribromoethanol (Avertin) as an anaesthetic in mice. *Lab Anim.* 33(2), 192-193.
36. Aksoy A, Nuhoğlu Z, (2018). Laboratuvar Hayvanlarında İlaç Uygulama. Yarsan E. eds. *Veteriner Hekimliğinde İlaç Uygulama Yöntemleri*. Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara. p. 183-204.
37. Wolfensohn S, (2010). Euthanasia and other fates for laboratory animals. Hubrecht RC, Kirkwood J. eds. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*. Wiley-Blackwell, ABD. p. 219-226.
38. Wong D, Makowska IJ, Weary DM, (2013). Rat aversion to isoflurane versus carbon dioxide. *Biol Lett.* 9(1), 20121000.
39. Zatroch KK, Knight CG, Reimer JN, Pang DS, (2017). Refinement of intraperitoneal injection of sodium pentobarbital for euthanasia in laboratory rats (*Rattus norvegicus*). *BMC Vet Res*, 13(1), 60.

Probiyotik Olarak Tanımlanan Yeni Mikroorganizmalar

Şeyma Delice Ürkmez, Ali Gücükoğlu

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi AD Samsun

Geliş Tarihi / Received: 04.01.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 13.05.2019

Özet: Tarih boyunca insanlar tarafından canlı mikroorganizmalar içeren bitkisel ve hayvansal orijinli fermente gıdalar tüketilmiştir. Geleneksel fermente gıdaların içerisinde "Probiyotik" olarak isimlendirilen doğal mikroorganizmalar, yeterli miktarda uygulandığında konakçıya yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanır. Her geçen gün doğal kaynaklardan izole edilen ya da mevcut bakteri soylarından türetilen yeni bakteriler keşfedilmekte ve dolayısıyla bu bakterilerin probiyotik olarak değerlendirmelerinin yapılması ve güvenilirliklerinin derinlemesine araştırılması gerekmektedir. Detaylı inceleme gerektiren mikroorganizmaların son örneklerini *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus subtilis natto*, *Clostridium butyricum*, *Bacteroides xylanisolvens*, *Akkermansia muciniphila*, Fructofilik laktik asit bakterileri (FLAB) ve *Faecalibacterium prausnitzii* oluşturmaktadır. Bu derlemede probiyotik özellikleri yeni ortaya çıkarılan bazı mikroorganizmalar hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Gıda, Probiyotik bakteri, Yeni mikroorganizma

Novel Microorganisms Accepted as Probiotics

Abstract: Throughout history, fermented foods from vegetable and animal origin including live microorganisms have been consumed by humans. In traditional fermented foods, natural microorganisms, called probiotics, are defined as live microorganisms that benefit the host when administered in sufficient amounts. Everyday, new bacteria, which are isolated from natural sources or derived from the current strains of bacteria, are discovered and therefore probiotic assessments and reliability of these bacteria should be investigated in depth. Recent samples of microorganisms requiring detailed examination are *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus subtilis natto*, *Clostridium butyricum*, *Bacteroides xylanisolvens*, *Akkermansia muciniphila*, Fructophilic lactic acid bacteria (FLAB) and *Faecalibacterium prausnitzii*. In this review, it is aimed to give information about some new microorganisms which have probiotic properties.

Key words: Food, Probiotic bacteria, New microorganism

Giriş

Antik çağlardan beri canlı mikroorganizmalar içeren gıdalar insan beslenmesinin önemli bir bölümünü oluşturmuş ve özellikle fermente gıdalar, meyveler, meyve suları, hayvansal ürünler gibi doğal mikrobiyal içeriği olan gıdalar tüketilmiştir. İnsanlar, bakterilerin varlığını bile bilmeden, onları birçok gıdanın üretimi ve saklanması için etkin olarak kullanmışlardır [47]. Geleneksel fermente gıdaların içerisinde "Probiyotik" olarak isimlendirilen doğal mikroorganizmalar bulunmaktadır. Ancak unutmamak gerekir ki canlı bakteri içeren her fermente gıda aynı zamanda probiyotik özellikte değildir. Fermente gıdalar farklı sayı ve türde mikroorganizma içerdiklerinden bunların mikrobiyolojik kompozisyonu tamamen bilinmemekte veya üretim prosesinde kontrol edilememektedir [30]. International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) bu nedenle, geleneksel

fermente gıdalar için "canlı ve aktif bakteriyel kültürler içeren" terimini önermektedir. Probiyotikler, yeterli miktarda uygulandığında konakçıya yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanır. Bu faydalar, araştırılan probiyotiklerin büyük çoğunluğunda; bağırsak geçişinin düzenlenmesi, patojenlerin rekabet dışı bırakılması ve spesifik kısa zincirli yağ asitleri üretimi gibi nispeten ortak mekanizmalar yoluyla sağlanmaktadır. Buna ek olarak, vitamin sentezi, enzimatik aktivite, bağırsak bariyer takviyesi ve kanserojenlerin nötrleştirilme mekanizmaları yer alır [10,30]. European Food Safety Authority (EFSA), biyolojik ajanların değerlendirilmesini basitleştirmek ve standardize etmek amacıyla mikroorganizmalar için genel risk değerlendirme yaklaşımı oluşturmaya yönelik Qualified Presumption of Safety (QPS) sistemini başlatmıştır. QPS yaklaşımı, düşük riskli mikroorganizmaların değerlendirilmesini basitleştirerek, yüksek risk potansiyeli olan ajanlara daha fazla odaklanmayı

sağlamaktadır [36]. QPS kavramı, yem ve gıda üretiminde kullanılan tüm mikroorganizmalar için bir güvenlik değerlendirmesi oluşturmayı amaçlamaktadır. Etken, QPS listesindeki bir taksonomik birime açıkça bağlanabiliyorsa, gerekli güvenlik değerlendirme aşamaları varsa, bu taksonomik birim için listede belirtilir. Güvenilirlik özellikleri tam olarak anlaşılabilen mikroorganizmalar için tür veya izolat seviyesi üzerinde ayrı bir taksonomik sınıflandırma, potansiyel virülens, antibiyotik direnç genlerini ve bunların yatay aktarım yeteneklerini belirlemek için kapsamlı genetik dizilim analizi de dahil olmak üzere karakterizasyon analizleri yapılmaktadır [3].

Probiyotik Olarak Tanımlanan Yeni Mikroorganizmalar

Leuconostoc mesenteroides

L. mesenteroides, Laktobasiller grubunda Gram pozitif, sporsuz, katalaz, oksidaz ve PYR (L-pyrroli-donyl-b-naphthyla-mide) negatif, alfa veya non hemolitik koklardır [5,34]. *Streptococcaceae* ailesine dahil olup glikopeptidlere doğal dirençlidir [29,31]. *L. mesenteroides*, fakültatif anaerob olmasına rağmen mikroaerofilik koşullarda heterolaktik fermentasyon kabiliyetindedir [17]. Aynı zamanda sitratı diasetil ve asetoine dönüştürürken, sakarozu dekstran ve levana dönüştürür. Dekstranlar; kan plazma uzatıcıları, antikoagülan tedavi için heparin ikameleri, çeşitli kozmetik ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır [33,35]. *L. mesenteroides*, birçok gıdada fermentasyon işlemlerinin başlamasından sorumlu ve hatta çeşitli ekmek ve fermente süt ürünlerinde starter kültürler olarak kullanılmakta, genenekselle endüstriyel peynirlerin florasında bulunabilmektedir [12,16,48]. EFSA *L. mesenteroides*'dan üretilen dekstran preparatının fırın ürünlerinde %5'e kadar kullanımının insan tüketimi için güvenli olduğunu bildirmiştir [2].

Bacillus subtilis natto

B. subtilis, toprakta, geniş getiren hayvanların ve insanların gastrointestinal kanalında bulunan Gram-pozitif, katalaz-pozitif, fakültatif anaerob mikroorganizmadır [38]. Japonya'da 1906 yılında keşfedilen *B. subtilis natto*, fermente edilmiş soya fasulyesi olan "natto" üretiminden sorumlu olup Japon diyetinde uzun süredir kullanılmaktadır. *B.*

subtilis, gastrointestinal ve üriner sistem hastalıklarının tedavisinde antibiyotiklerden önce yaygın olarak kullanılan immünostimülatör ajanıdır. Sindirim sistemi üzerinden; IgM, IgG ve IgA spesifik antikorların ve interferonları indükleyen CpG dinükleotidlerin salgılanmasını sağlayarak geniş spektrumlu bağışıklık aktivitesini uyarması nedeniyle alternatif bir ilaç olarak kullanılmıştır [13]. *B. subtilis natto*'ya güvenli kullanım öyküsü ve potansiyel vitamin prekürsörü özelliği nedeniyle EFSA tarafından QPS statüsü verilmiştir [20].

Clostridium butyricum

Gram pozitif, zorunlu anaerob, sporlu basil olan *Clostridium butyricum*, insan ve hayvan bağırsağının kommensal bir bakterisidir. *C. butyricum*, yüksek miktarlarda bütirik asit üretme kapasitesine sahiptir [27,42,45]. EFSA *C. butyricum* CBM 588'in, yeni bir probiyotik olarak kullanılmasına izin vermiştir [4]. *C. butyricum* için bildirilen faydalı etkilerin başında SCFA (Short Chain Fatty Acids) üretimi ve lipid metabolizmasındaki etkinliği gelmektedir [49]. Yapılan çalışmalarda etkenin, ülseratif kolit hastalarında kaşeksiyi önleme ve *Helicobacter pylori* için tedavi olan hastalarda oluşan yan etkilerin azaltılmasında olumlu etkileri saptanmıştır [50]. Oral yolla alındığında, *C. butyricum* sporları bağırsaklarda aktif hale geçerek bütirat ve asetat gibi çok miktarda kısa zincirli yağ asitleri üretir [44]. SCFA'lar bağırsak hücreleri için önemli bir enerji kaynağı oluşturur ve enterositler üzerinde proliferatif etkilere sahiptir. Ek olarak, SCFA'ların, kolonik inflamasyon üzerinde immün modülatör etkilere sahip olduğu belirtilmiştir. SCFA'lar epitel hücre kültürlerinde inflamatuvar sitokin sekresyonunu baskılayarak, bağırsak mukozasının mikroorganizmaların varlığına karşı toleransını kolaylaştırmakta ve patojenlerin çoğalmasını kontrol etmektedir [28].

Bacteroides xylanisolvens

Chassard ve ark. [11] insan gastrointestinal kanalında, 6 ksilanolitik, Gram-negatif anaerobik çubuk izole etmişlerdir. Sonraki 16S rRNA analiziyle, elde edilen suşların *Bacteroides* cinsine ait olduğunu ve etkene ksilanın ayrıştırma özelliğine göre *B. xylanisolvens* ismini vermişlerdir. *Bacteroides* spp., insan kolon florasının baskın türlerinden olup, bağırsak mikrobiyotasının yaklaşık %30'unu oluşturmak-

tadır [46]. *B. xylanisolvens* DSM 23964 izolatının biyokimyasal özellikleri katalaz (-), indol (-) ve nişasta hidrolizi (-)'dir. Filogenetik analiz ve DNA-DNA hibridizasyonu ile *B. xylanisolvens*'in alt varyantı olarak sınıflandırılmıştır. *B. xylanisolvens*'in probiyotik olarak sınıflandırılmasına sebep olan en temel özelliği mide-bağırsak kanalında canlılığını koruyabilmesidir. *B. xylanisolvens* DSM 23964, stimüle edilmiş mide sıvısında 3 saat sonunda %90 oranında ve benzer şekilde stimüle edilmiş intestinal sıvıda 4 saat sonunda %96 oranında canlılığını koruyabildiği saptanmıştır. Ancak in vitro ortamda epitelyal hücrelere bağlanamaması probiyotik özelliklerin değerlendirilmesinde önemli bir dezavantajdır [51]. 2015 yılında *B. xylanisolvens* DSM 23964'ün fermente edilen pastörize süt ürünlerine probiyotik amaçlı katılması onaylanmış olup, etkenin probiyotik olarak kullanımı, pastörize süt ürünlerinin mayalanmasında başlangıç kültürü olarak sınırlandırılmıştır [21].

Akkermansia muciniphila

A. muciniphila başlangıçta zorunlu bir anaerob olarak sınıflandırılmıştır, fakat *Bacteroides fragilis* ve *Bifidobacterium adolescentis* gibi diğer anaerobik bağırsak kolonileriyle birlikte *A. muciniphila*'nın küçük miktarlarda oksijeni tolere edebildiği görülmüştür [40]. Yapılan araştırmalarda memeli bağırsak örneklerinde Akkermansia cinsine ait türler saptanmış olup, etkenin zebra balığı ve birmanya pitonu gibi diğer omurgalılarda da benzer türleri tespit edilmiştir [15,43]. Bununla birlikte *A. muciniphila* insanlarda meme dokusunda tespit edilmiş ve etkenin anne sütü ile bebeklere geçişi belirlenmiştir [14]. *A. muciniphila*, insan bağırsak mikrobiyotasının %1-4'ünü oluşturmaktadır [18]. Akkermansia türlerinin patojenitesi ile ilgili genel endişeler vardır ancak *A. muciniphila*'nın herhangi bir spesifik hastalığa sebep olduğuna dair veriye rastlanılmamıştır [19]. *A. muciniphila*'nın 70 °C'de 30 dakika ısı uygulamasından sonra etkenin obez ve diyabetik farelerde yağ kitle gelişimini, insülin direncini ve dislipidemi azalttığı görülmüştür. Bazı membran proteinleri, termal işlem sırasında bile Toll benzeri reseptör 2 ile stabilite ve etkileşim göstermiştir. Bu protein bağırsak bariyeri üzerine olumlu etkiler sağlamıştır [41]. Nispeten yeni tanımlanan tür olan *A. muciniphila*, Akkermansia cinsinin ilk tanımlanan taksonomik üyesidir ve gıda endüstrisinde kullanım

koşullarına ilişkin veriler yeterince bulunmadığından EFSA tarafından yapılan QPS statüsüne göre herhangi bir değerlendirme yapılmamıştır [9].

Faecalibacterium prausnitzii

Fusobacterium prausnitzii, Faecalibacterium cinsine ve insan bağırsak mikrobiyotalarının komensal bakterisidir [37]. Gram pozitif, zorunlu anaerob olan *F. prausnitzii*, Clostridia sınıfına aittir. İnsanlarda toplam fekal bakteri florasının %3-5'ini oluşturur [8,26,37]. Mikrobiyota içerisinde *F. prausnitzii* sayısındaki değişiklikler Crohn hastalığı ve depresif bozukluklar gibi birkaç gastrointestinal hastalık ile ilişkilendirilmiştir [32,37]. Etken konakta antiinflamatuar etki yaratmakta, bu da bazı hastalıklara bağlı disbiyozisin dengelenmesinde kullanılabileceğini göstermektedir [32,37]. *F. prausnitzii* EFSA tarafından henüz QPS listesine dahil edilmemiştir [8].

Fruktofilik Laktik Asit Bakterileri

Fruktofilik laktik asit bakterileri (FLAB), Laktik asit bakterileri (LAB) içerisinde bir alt grup oluşturur. FLAB tercihen bir substrat olarak fruktoz kullanır, glikozu tam olarak fermente edemez ve ortamda bulunan piruvat, oksijen ve fruktoz varlığında gelişme ve çoğalmaları önemli ölçüde artar. Etken daha çok; çiçekler, meyveler, şarap ve kakao çekirdeği gibi fermente gıdalar ve böceklerin gastrointestinal sisteminde bulunur [23,24]. FLAB grubu bakterilerin sınıflandırılmasında, *Fructobacillus* spp. ve *Lactobacillus* spp. cinsleri yer almaktadır [22]. *Fructobacillus* beş türden oluşur: *F. fructosus*, *F. pseudoficulneus*, *F. ficulneus*, *F. durionis* ve *F. tropaeoli* [25]. *F. fructosus* ve *F. pseudoficulneus*, doğal kaynaklarda en sık tespit edilen türlerdir [1,24]. *Lactobacillus* cinsinden FLAB üyeleri *L. kunkeei*, *L. apinorum* ve *L. florum*'dur [39]. Yapılan çalışmalarda, gıdayla alınan ve ısı ile inaktif hale getirilmiş *L. kunkeei*'nin bağırsak peristaltliğini artırdığı ve immünooglobulin A üretimi gibi immunitede yararlı etkilere sahip olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, *B. xylanisolvens*'lerde olduğu gibi, *L. kunkeei*'nin, gıda endüstrisinde ısı ile işleme tabi tutulmuş formda kullanılabileceği düşünülmektedir. Gıda endüstrisinde çok yaygın olarak kullanılan LAB ile olan yakın filogenetik ilişkileri, EFSA tarafından QPS listesine dahil edilmesi olasılığını gündeme getirmiştir. Ancak etkeni genetik karakterizasyonunda laktik asit bakterilerinden tam olarak ayırmak ve fermente

gıdaların üretimi ile arasındaki ilişkiyi anlamak için daha fazla bilimsel veriye ihtiyaç vardır [6,7].

Sonuç

Dünyada hızla büyüyen gıda pazarı dikkate alındığında probiyotik olarak önerilen yeni bakteriler ve bunları içeren yeni gıdalar ilgi çekmektedir. Yeni probiyotik adaylar için, gıdalarda kullanımları ile ilgili yeterli deneyim olmadığından bu yeni türlerin piyasaya sürülmesi güvenilirlik endişelerini de beraberinde getirmektedir. Bu nedenle bazı ülke ve kuruluşlar probiyotiklerle ilgili çeşitli yasal düzenlemeler geliştirmişlerdir. Mevcut farklı düzenlemelerin en önemli ortak noktası bu yeni türlerin piyasaya sürülmesinden önce olası bir sağlık tehdidinin ortadan kaldırılmasıdır. Bu derlemede bahsi geçen *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus subtilis natto*, *Clostridium butyricum* ve *Bacteroides xylanisolvens*'e EFSA tarafından probiyotik onayı verilmiştir. Diğer adaylardan *A. muciniphila*, FLAB ve *F. prausnitzii* için ise eldeki veriler umut verici olarak nitelendirilmiştir ve söz konusu türler halen EFSA tarafından bilimsel risk değerlendirme aşamasındadır. Değerlendirilen potansiyel probiyotiklerin, gelecekte gıda endüstrisinde yeni gıdalara dahil edilebilecek bakteriler olabileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Alcantara-Hernandez RJ, Rodriguez-Alvarez JA, Valenzuela-Encinas C, Gutierrez-Miceli FA, Castanon-Gonzalez H, Marsch R, Ayora-Talavera T, Dendooven L, (2010). *The bacterial community in 'taberna' a traditional beverage of Southern Mexico*. Lett Appl Microbiol. 51, 558–563.
- Anonim, (2001). *European Commission. E. Commission: 2001/122/EC. Commission Decision of 30 January 2001 on Authorising the Placing on the Market of a Dextran Preparation Produced by Leuconostoc mesenteroides as a Novel Food Ingredient in Bakery Products under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council (Notified Under Document Number C(2001) 174)*. Erişim adresi; <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32001D0122&from=HR>, Erişim tarihi: 01.12.2018.
- Anonim, (2007). *Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) Approach for Assessment of Selected Microorganisms Referred to EFSA - Opinion of the Scientific Committee*. Erişim adresi: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2007.587>, Erişim tarihi: 30.11.2018
- Anonim, (2014). *European Commission. E. Commission: 2014/907/EU. Commission Implementing Decision of 11 December 2014 Authorising the Placing on the Market of Clostridium butyricum (CBM 588) as a Novel Food Ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council (Notified Under Document C(2014) 9345)*. Erişim adresi: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014D0907&from=EN>, Erişim tarihi: 01.12.2018.
- Arias AC, Murray BE, (2010). *Enterococcus species, Streptococcus bovis group, and Leuconostoc species*. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. eds. *Principles and practice of Infectious Diseases*. 7th ed. Churchill Livingstone Elsevier Inc, Philadelphia, USA. p.2643-2653.
- Asama T, Arima TH, Gomi T, Keishi T, Tani H, Kimura Y, Tatefuji T, Hashimoto K, (2015). *Lactobacillus kunkeei YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults*. J Appl Microbiol. 119, 818–826.
- Asama T, Kimura Y, Kono T, Tatefuji T, Hashimoto K, Benno Y, (2016). *Effects of heat-killed Lactobacillus kunkeei YB38 on human intestinal environment and bowel movement: a pilot study*. Benef Microbes. 7, 337–344.
- Breyner NM, Michon C, de Sousa CS, Vilas Boas PB, Chain F, Azevedo V, Langella P, Chatel JM, (2017). *Microbial Anti-Inflammatory Molecule (MAM) from Faecalibacterium prausnitzii shows a protective effect on DNBS and DSS-induced colitis model in mice through inhibition of NF-kappaB pathway*. Front Microbiol. 8, 114.
- Brodmann T, Endo A, Gueimonde M, Vinderola G, Kneifel W, De Vos WM, Salminen S, Gomez-Gallego C, (2017). *Safety of Novel Microbes for Human Consumption: Practical Examples of Assessment in the European Union*. Front Microbiol. 8, 1725.
- Cammarota G, Ianiro G, Bibbo S, Gasbarrini A, (2014). *Gut microbiota modulation: probiotics, antibiotics or fecal microbiota transplantation?* Intern Emerg Med. 9, 365–373.
- Chassard C, Delmas E, Lawson PA, Bernalier-Donadille A, (2008). *Bacteroides xylanisolvens sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from human faeces*. Int J Syst Evol Microbiol. 58(Pt 4), 1008–1013.
- Cibik R, Lepage E, Talliez P, (2000). *Molecular diversity of leuconostoc mesenteroides and leuconostoc citreum isolated from traditional french cheeses as revealed by RAPD fingerprinting, 16S rDNA sequencing and 16S rDNA fragment amplification*. Syst Appl Microbiol. 23, 267–278.
- Ciprandi G, Scordamaglia A, Venuti D, Caria M, Canonica GW, (1986). *In vitro effects of Bacillus subtilis on the immune response*. Chemioterapia. 5, 404–407.
- Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, (2012). *Maternal weight and excessive weight gain during pregnancy modify the immunomodulatory potential of breast milk*. Pediatr Res. 72, 77–85.
- Costello EK, Gordon JI, Secor SM, Knight R, (2010). *Postprandial remodeling of the gut microbiota in Burmese pythons*. ISME J. 4, 1375–1385.
- D'Angelo L, Cicotello J, Zago M, Guglielmotti D, Quiberoni A, Suarez V, (2017). *Leuconostoc strains isolated from dairy products: response against food stress conditions*. Food Microbiol. 66, 28–39.
- Demoss RD, Bard RC, Gunsalus IC, (1951). *The mechanism of heterolactic fermentation: a new route of ethanol formation*. J Bacteriol. 62, 499–511.
- Derrien M, Collado MC, Ben-Amor K, Salminen S, De Vos WM, (2008). *The mucin degrader Akkermansia muciniphila is an abundant resident of the human intestinal tract*. Appl Environ Microbiol. 74, 1646–1648.

19. Derrien M, van Passel MWJ, van de Bovenkamp JHB, Schipper RG, de Vos WM, Dekker J, (2010). *Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract*. Gut Microbes. 1, 254–268.
20. EFSA Panel on Biological Hazards, (2010). *Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed*. EFSA J. 8, 1–56.
21. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, (2015). *Scientific Opinion on the safety of 'heat-treated milk products fermented with Bacteroides xylanisolvens DSM 23964' as a novel food*. EFSA J. 13, 1–18.
22. Endo A, Futagawa-Endo Y, Dicks LM (2009). *Isolation and characterization of fructophilic lactic acid bacteria from fructose-rich niches*. Syst Appl Microbiol. 32, 593–600.
23. Endo A, Irisawa T, Futagawa-Endo Y, Takano K, du Toit M, Okada S, Dicks LM, (2012a). *Characterization and emended description of Lactobacillus kunkeei as a fructophilic lactic acid bacterium*. Int J Syst Evol Microbiol. 62, 500–504.
24. Endo A, (2012b). *Fructophilic lactic acid bacteria inhabit fructose-rich niches in nature*. Microb Ecol Health Dis. 23, 6–12.
25. Endo A, Tanizawa Y, Tanaka N, Maeno S, Kumar H, Shiwa Y, Okada S, Yoshikawa H, Dicks L, Nakagawa J, Arita M, (2015). *Comparative genomics of Fructobacillus spp. and Leuconostoc spp. reveals niche-specific evolution of Fructobacillus spp*. BMC Genomics. 16, 1117.
26. Foditsch C, Santos TM, Teixeira AG, Pereira RV, Dias JM, Gaeta N, Bicalho RC, (2014). *Isolation and characterization of Faecalibacterium prausnitzii from calves and piglets*. PLoS ONE. 9, e116465
27. Ghoddusi HB, Sherburn R, (2010). *Preliminary study on the isolation of Clostridium butyricum strains from natural sources in the UK and screening the isolates for presence of the type E botulinum toxin gene*. Int J Food Microbiol. 142, 202–206.
28. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ, (2008). *The role of butyrate on colonic function*. Aliment Pharmacol Ther. 27, 104–119.
29. Handweger S, Horowitz H, Coburn Kenneth, Kolokathis A, Wormser PG, (1990). *Infection due to Leuconostoc species; Six cases and Review*. Clin Infect Dis. 12, 602-610.
30. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME, (2014). *The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 11, 506–514.
31. Ishiyama K, Yamazaki H, Senda Y, Yamauchi H, Nakao S, (2011). *Leuconostoc bacteremia in tree patients with malignancies*. J Infect Chemother. 17, 412-418.
32. Jiang H, Ling Z, Zhang Y, Mao H, Ma Z, Yin Y, Wang W, Tang W, Tan Z, Shi J, Li L, Ruan B, (2015). *Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder*. Brain Behav Immun. 48, 186–194.
33. Kim D, Day DF, (1994). *A new process for the production of clinical dextran by mixed-culture fermentation of Lipomyces starkeyi and Leuconostoc mesenteroides*. Enzyme Microb Technol. 16, 844-848.
34. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr, eds., (1997). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Fifth edition. Philadelphia: Lippincott, p.577-650.
35. Leathers TD, Hayman GT, Cote GL, (1995). *Rapid Screening of Leuconostoc mesenteroides Mutants for Elevated Proportions of Alternan to Dextran*. Current Microbiol. 31, 19-22.
36. Leuschner RGK, Robinson TP, Hugas M, Cocconcelli PS, Richard- Forget F, Klein G, Licht TR, Nguyen-The C, Querol A, Richardson M, Suarez JE, Thrane U, Vlak JM, von Wright A, (2010). *Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA)*. Trends Food Sci Technol. 21, 425–435.
37. Miquel S, Martin R, Rossi O, Bermudez-Humaran LG, Chatel JM, Sokol H, Thomas M, Wells JM, Langella P, (2013). *Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health*. Curr Opin Microbiol. 16, 255–261.
38. Nakano MM, Zuber P, (1998). *Anaerobic growth of a "strict aerobe" (Bacillus subtilis)*. Annu Rev Microbiol. 52, 165–90.
39. Neveling DP, Endo A, Dicks LM, (2012). *Fructophilic Lactobacillus kunkeei and Lactobacillus brevis isolated from fresh flowers, bees and bee-hives*. Curr Microbiol. 65, 507–515.
40. Ouwerkerk JP, van der Ark KC, Davids M, Claassens NJ, Robert Finestra T, de Vos WM, Belzer C, (2016). *Adaptation of Akkermansia muciniphila to the oxic-anoxic interface of the mucus layer*. Appl Environ Microbiol. 82, 6983–6993.
41. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommie, C, Van Hul M, Geurts L, Chilloux J, Ottman N, Duparc T, Lichtenstein L, Myridakis A, Delzenne NM, Klievink J, Bhattacharjee A, van der Ark KC, Aalvink S, Martinez LO, Dumas ME, Maiter D, Loumaye A, Hermans MP, Thissen JP, Belzer C, de Vos WM, Cani PD, (2017). *A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice*. Nat Med. 23, 107–113.
42. Rainey FA, (2009). *Genus I. Clostridium Prazmowski 1880*. Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*: volume 3 The Firmicutes. 9th ed., Springer, New-York. p.739–740
43. Roeselers G, Mittge EK, Stephens WZ, Parichy DM, Cavanaugh CM, Guillemin K, Rawls JF, (2011). *Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish*. ISME J. 5, 1595–1608.
44. Sato R, Tanaka M, (1997). *Intestinal distribution and intraluminal localization of orally administered Clostridium butyricum in rats*. Microbiol Immunol. 41, 665–671.
45. Schlegel HG (1993). *General Microbiology*. Seventh edition. Cambridge: CU Press, p.193-233.
46. Sears CL, (2005). *A dynamic partnership: celebrating our gut flora*. Anaerobe. 11, 247–251.
47. Selhub EM, Logan AC, Bsted AC, (2014). *Fermented foods, microbiota, and mental health: ancient practice meets nutritional psychiatry*. J Physiol Anthropol. 33.
48. Server-Busson C, Foucaud C, Leveau JY, (1999). *Selection of Dairy Leuconostoc Isolates for Important Technological Properties*. J Dairy Res. 66, 245-56.
49. Shang H, Sun J, Chen YQ, (2016). *Clostridium butyricum CGMCC0313.1 modulates lipid profile, insulin resistance and colon homeostasis in obese mice*. PLoS ONE. 11, e0154373.
50. Shimbo I, Yamaguchi T, Odaka T, Nakajima K, Koide A, Koyama H, Saisho H, (2005). *Effect of Clostridium butyricum on fecal flora in Helicobacter pylori eradication therapy*. World J Gastroenterol. 11,7520–7524.
51. Ulsemer P, Toutounian K, Schmidt J, Karsten U, Goletz S, (2012). *Preliminary safety evaluation of a new Bacteroides xylanisolvens isolate*. Appl Environ Microbiol. 78, 528–535.

Antiviral İlaçlar

Ali Küçük, Yakup Yıldırım

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

Geliş Tarihi / Received: 09.04.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 14.05.2019

Özet: Tarih boyunca viral hastalıklar epidemiler veya pandemiler meydana getirerek, insanoğlunu ve onunla etkileşim halinde olan tüm canlıların yaşamını tehdit etmiştir. Milyonlarca canlının ölümüne veya itlafına yol açan bu salgınlar, korunma ve tedavi gereksinimlerini de beraberlerinde getirmiştir. Yirminci yüzyılın başlarında gelişmeye başlayan teknoloji ve sağlık imkanları, viral hastalıkların sağaltımı üzerinde araştırmalar ve çalışmalar yapılmasına olanak sağlamıştır. Yapılan bu derlemede, insan ve hayvan sağlığını tehdit eden viral enfeksiyonların tedavisinde kullanılmak amacıyla geliştirilen antiviral ajanlar hakkında bilgi verilmiştir.

Anahtar kelimeler: Antiviral ilaç, virüs

Antiviral Drug

Abstract: Throughout history, viral diseases have always threatened lives of all humans and living beings in contact with them causing epidemics and pandemics. These epidemics that caused death or destruction of millions of living beings also brought about the need for protection and treatment. Technological and health opportunities that started to develop at the beginning of the 20st century made it possible to convey studies and research on treatment of viral diseases. In this composition, information has been provided about antiviral agents developed to be used in treatment of viral infections threatening human and animal health.

Key words: Antiviral drug, virus

Giriş

1959 yılında, 5-Substituted 2'-Deoxyuridine (IDU)'nin tanımlanmasıyla birlikte, viral enfeksiyonların tedavi edilebileceği fikri ortaya atılmış oldu. Bu bilgiler ışığında yapılan denemeler sonucunda in vitro koşullarda, antiviral aktivite keşfedildi. 1962 yılına gelindiğinde ise ilk kez etkili bir herpes simplex virus (HSV) keratitis tedavisi gerçekleştirildi. Böylece IDU, herpetik göz enfeksiyonlarında topikal sağaltımda kullanılan ilk antiviral ajan haline geldi. Kaufmann ve Heidelberger'in 1964 yılında, 5-trifluoro- 2'-Deoxythymidine'nin antiviral etkinliğini ortaya koymasıyla beraber, HSV keratitisin topikal tedavisinde yüksek başarı sağlandı. Yine aynı tarihte, adenine arabinoside'nin HSV üzerindeki antiviral etkisi kanıtlanmış ve ilk kez herpesvirus enfeksiyonlarının sistemik sağaltımında kullanılmıştır. 1964 yılı içerisinde, influenza A virus inhibitörü olan amantadinenin, antiviral etkisinin invitro ve invivo ortamlarda kanıtlanmasına karşın etkenin ajana karşı hızla geliştirdiği direnç nedeniyle pratikte istenilen sonuca ulaşamamıştır.

1977 yılında, herpesviruslara karşı selektif ilk antiviral ajan olan 9-(2-hydro-xyethoxymethyl) guanine (asikloguanosin) sentezlendi, birkaç ay sonra asikloguanosine oranla daha geniş bir etki spektrumuna sahip olan (S)-9-(2,3-dihydroxypropyl) adenine (DHPA) geliştirildi. 1983 yılında, Human immunodeficiency virus (HIV)'un sebep olduğu, "Acquired Immunodeficiency Syndrome" (AIDS)'in tanımlanmasından günümüze kadar, bu hastalığın sağaltımında kullanılmak üzere pek çok antiretrovirus ajan geliştirilmiştir (reltegravir, dolutegravir, ritonavir, maraviroc vb.) ve geliştirilmeye devam etmektedir. Bunun yanı sıra, Hepatitis B virus (HBV) ve Hepatitis C virus (HCV) gibi büyük salgınlara yol açan enfeksiyonların tedavilerinde kullanılmak üzere antiviral ajan geliştirme çalışmaları sürdürülmektedir (Asunaprevir, bocaprevir, paritaprevir, elbasvir vb.) [18,19,32].

Günümüze kadar geçen sürede geliştirilen antiviral ilaçlar etki mekanizmalarına göre 12 ana başlık altında toplanabilir.

5-Substituted 2'-Deoxyuridine Analogları

Bu grup içerisinde üç farklı (İdoxuridine, Trifluridine, Brivudine) antiviral ajan bulunur. 1959 yılında idoxuridine'nin tanımlanması ile birlikte antiviral ajanların tarihi başlamış oldu. İlaç ilk olarak kanser tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda herpetik göz enfeksiyonlarının topikal sağaltımında da etkili olduğu görülmüştür. İdoxuridine'nin antiviral etkisinin anlaşılmasını takiben 1964 yılında Heidelberg ve Kaufmann tarafından Trifluridine üretilmiştir. Bu iki ajan günümüzde de Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1)'in neden olduğu epitelyal keratitisi olgularının sağaltımında merhem ve damla formunda kullanılmaktadır [10,47]. Brivudine ise Birmingham Üniversitesi Kimya Bölümü tarafından 1976 yılında üretilmiş olup HSV-1 ve Varicella-Zoster Virus (VZV)'e karşı seçici ve etkili bir ajan olarak kabul edilmektedir [20].

Bu ajanların antiviral mekanizmaları benzerdir. Viral timidin kinaz ve konakçı hücrelerin sahip olduğu diğer enzimler ile fosforile olurlar. Böylece, hem viral hem de hücre DNA polimeraz enzimini inhibe ederler. Ancak virus üzerinde göstermiş olduğu etkiyi konakçı hücreleri üzerinde de göstereceğinden ötürü parenteral uygulamaya uygun değildir. Brivudine'nin diğer ajanlardan daha selektif ve efektif olmasının sebebi HSV-1 ve VZV viral timidin kinaz enzimine spesifite göstermesidir [19,44,73].

Herpetik keratitisi tedavisinde brivudine, idoxuridine, trifluridine ve acyclovir etken madde içeren oftalmik preparatların sağaltımında neredeyse aynı derecede etkiye sahip olduğu görülmüştür. Uygulama sonrası 2 hafta içerisinde % 90'a yakın bir iyileşme söz konusudur. Fakat, HSV-1 ve VZV enfeksiyonlarının sistemik sağaltımında toksik etkisinden ötürü idoxuridine ve trifluridine yerine brivudinenin tercih edilmesi prognost açısından daha güvenlidir [6,76].

Nükleosit Analogları

Bu grup, içerisinde üç farklı (Telbivudine, Lamivudine, Vidarabine) antiviral ajan barındırmaktadır. Vidarabine'nin etki mekanizması, viral DNA polimerazın inhibisyonu üzerine kuruludur [70]. Bir diğer nükleosit analogu olan Telbivudine bir timidin analogudur ve viral reverse transkriptazın yarışmalı

inhibitörüdür. Viral reverse transkriptazın ve viral DNA polimerazın inhibisyonunu sağlayarak antiviral etki gösterir. Entecavir ise bir diğer nükleosit olan guanosinin analogudur. HBV'nin viral DNA polimeraz ve viral transkriptaz enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösterir [64].

1976 yılında nükleosit analogları içerisinde onaylanan ilk ajan olan vidarabine HSV-1, HSV-2, VZV ve hatta bazı AIDS hastalarının sağaltımında kullanılmıştır fakat toksik etkisinden ötürü yerini daha efektif ve güvenilir ajanlara bırakmıştır [29]. %3'lük merhem olarak kullanılırsa keratokonjunktivitis sicca sağaltımında etkili olmaktadır ve kedilerde idoxuridine göre daha kolay tolare edilebilmektedir [45]. Telbivudin 2006 yılında ABD'de, spesifik olarak Hepatitis B virus (HBV) enfeksiyonu tedavisi için geliştirilmiştir [64]. Oral yolla kullanıldığında biyoyararlanımı en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Ajan, klinik öncesi yapılan testlerde denekler üzerinde herhangi bir mutajenik ve karsinojenik etki bırakmamıştır. Gebelerde kullanılması durumunda, embriyoda veya fötüste toksik bir durum yaratmamaktadır. Entecavir ve Telbivudinin serumdaki HBV DNA seviyesini lamivudine göre çok daha aşağı seviyelere düşürdüğü gözlemlenmiştir [11,23,40]. Lamivudine, hepadnavirus DNA'sında zincir sentezini inhibe etmek üzere geliştirilmiş bir oral sitozin nükleosit analogudur [8]. Ajan, HBV viral replikasyonunu suprese ederek serum alanin aminotransferaz seviyesinin normal değerlere ulaşmasını sağlar. Bununla birlikte, karaciğer yangısını ve hepatosit parçalanmalarının da önüne geçer. Viral DNA replikasyonunu etkili bir biçimde inhibe eden ve hastalığın yayılmasını engelleyen lamivudin, HBV tedavisinde en yaygın kullanılan nükleosit analogudur [7, 12].

Asiklik Nükleosit Fosfonat Analogları

Sidofovir ve Adefovir önemli asiklik nükleosit fosfonat analogları içerisinde sayılabilir. Bu gruptaki ajanların etki mekanizması, viral DNA polimerazın fosfonoasetik asit ile hibridizasyonu ile inhibisyonu esasına dayanır [19].

Bir sitozin analogu olan sidofovir, sentezlendiği ilk yıllarda AIDS ve cytomegalovirus (CMV) etkenlerinin neden olduğu rinitis tedavileri için geliştirilmiş olsa da günümüzde herpesvirus, adenovirus, poliovirus ve papillomavirus enfeksiyonlarının

tedavilerinde kullanılır [57]. Viral DNA polimeraz enzimine duyduğu yüksek affinite sebebiyle oldukça güvenlidir. HSV-1 enfeksiyonlarında intravenöz veya intravitreal olarak kullanıldığı bilinmektedir [73]. Veteriner hekimliğinde, kedilerde deneysel olarak günde 2 kez uygulanan ve metilselüloz içeren sidofovirin, Feline Herpesvirus -1 (FeHV-1) virusunun saçılımını engellediği ve klinik semptomları kısmen de olsa hafiflettiği ortaya çıkmıştır. İn vitro ve in vivo etkileriyle bu anti viral ajanın FeHV-1 karşısında etkin olduğu kesinleşmiştir. Ancak, hayvanlar nazolakrimal sikatrizasyon yönünden gözetim altında tutulmalıdır [27].

2002 yılında geliştirilmiş olan adefovir dipivoxil adenozin monofosfatın nükleotit analogudur. Ortaya ilk çıktığı dönemde HIV tedavisinde kullanılsa da renal toksisitesi nedeniyle vazgeçilmiştir. HBV antijen negatif ve pozitif kronik hastalar için kullanılır. Adefovir dipivoxil alındıktan sonra esteraz ile adefovir formuna bürünür bu olayı takiben hücre içi fosforilasyon ile beraber adefovir difosfat meydana gelir. Adefovir difosfat deoxyadenozin trifosfatın analogudur ve DNA zincirinin uzamasını engeller [69]. Lamivudin direnci kaydedilmiş olan ve kan serumlarında HBV antijeni bulunan veya bulunmayan, kronik HBV enfeksiyonlu hastalarda yapılan ilk denemelerde adefovir dipivoxilin, serum HBV DNA varlığını büyük ölçüde azalttığı ve serum alanin aminotransferazi (ALT) normal seviyelere düşürdüğü gözlemlenmiştir [7].

Asiklik Guanozin Analogları

Asiklik guanozin analogları içerisinde 6 farklı (asiklovir, valasiklovir, gansiklovir, valgansiklovir, famsiklovir, pensiklovir) antiviral ajan sayılabilir. Bu ajanların etki mekanizmaları viral ve hücrel timidin kinaz enzimleri ile fosforilasyona dayanır. İlk fosforilasyonlarını viral timidin kinaz enzimi ile gerçekleştiren ajanlar devamında hücrel timidin kinaz ile fosforilasyon işlemlerini tamamlarlar. Fosforilasyon sonucu trifosfat forma dönüşen ajanlar viral DNA polimerazın uzamasını engeller [13,19,57].

Asiklovir, ilk olarak 1974 yılında İngiltere’de geliştirilen bir antiviral ilaçtır. HSV-1, HSV-2 ve varicella-zoster virus (VZV) enfeksiyonlarının tedavilerinde kullanılmaktadır [57]. Veteriner hekimliğinde kedilerin önemli üst solunum yolu enfeksiyon-

larından biri olan FeHV-1 enfeksiyonunun tedavisinde denenmiştir. Ancak, FeHV-1’in timidin kinaz fosforilasyon etkinliğinin, HSV-1’e göre oldukça düşük olması sebebiyle asiklovirin FeHV-1 üzerindeki etkisi zayıftır. Kedilere, %0.5’lik göz damlası şeklinde günde 5 kez uygulandığında 10 güne kadar klinik semptomlarda azalmalara rastlanmıştır [30,73]. Valasiklovir, asiklovirin biyoyararlılığını artırmak için geliştirilen bir ön ilaçtır. Gastrointestinal kanalda absorpsiyonunun hızlı olması enfeksiyonlara karşı asiklovire göre daha etkili olmasını sağlamıştır. Emilimden sonra hepatik hidrolaz enzimi ile asiklovire dönüştürülür [44,57].

Bu grup içerisinde yer alan bir diğer guanin analogu ise gansiklovirdir, etki mekanizması asiklovire çok yakın olan bu ajan immun sistemi baskılanmış CMV enfeksiyonu bulunan hastalarda kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Bunun yanı sıra, HSV-1’in neden olduğu konjunktivitis olgularında da etkili olduğu gözlemlenmiştir [5]. Valgansiklovir, oral yolla uygulandığında düşük biyoyararlılık gösteren gansiklovirin biyoyararlılığını artırmak için geliştirilmiş bir ön ilaç formudur ve AIDS hastalığı bulunan insanlarda CMV reinitisin tedavisinde kullanılmaktadır [15,46]. Bir nükleosit deoksiguanozin analogu olan pensiklovir, insanlarda HSV-1, HSV-2 ve VZV gibi enfeksiyonların tedavisi için geliştirilmiştir. İn vivo ve in vitro şartlar göz önünde tutulduğunda FeHV-1’e karşı da oldukça etkilidir [30,31].

Famsiklovir, pensiklovirden yüksek biyoyararlanım elde edebilmek için geliştirilmiş bir ön ilaçtır. Oral kullanıldığında plazmada ya da ince bağırsakta di-deasetilasyona uğrayarak 6-deoksipensiklovire (BRL 42359) dönüşen ajan, hepatik aldehit oksidaz enzimi ile oksitlenip pensiklovire dönüşür [28]. Pensiklovir, viral enfekte hücreye girer ve fosforilasyona uğrayarak aktif trifosfat formuna bürünür. İlk basamakta viral timidin kinaz ile katalize olurken takip eden basamaklarda katalize olmak için konakçı enzimlerini kullanır [34]. Yapılan in vitro çalışmalarda famsiklovirin ve BRL 42359’un tek başlarına FeHV-1 üzerinde herhangi bir etkilerinin olmadığı gözlemlenmiştir. Bu bilgi ışığında etkin bir sağaltım için antiviral ajanın oksidasyonunun tamamlanıp pensiklovir formuna dönüşmesi gereklidir. Ancak kedilerde, BRL 42359’un oksidasyonu için gerekli olan hepatik aldehit oksidaz aktivitesi %2 civarında seyretmektedir ve bu yüzde diğer pek

çok canlıya göre oldukça düşüktür. Hepatik aldehat oksidaz seviyesindeki doygunluktan kaynaklandığı düşünülen aktivasyondaki bu düşüklük, kedilerde famsiklovirin farmakokinetiğinin oldukça farklı olmasına yol açmaktadır [68].

Pirofosfat Analogu

Foscarnet viral antiviral ajanlar arasında en küçük boyutlu olanıdır ve mutlaka damar içi yolla uygulanmalıdır. İlk olarak insanlarda CMV enfeksiyonunun tedavisi için geliştirilse de sonraları, asiklovire direnç gösteren HSV ve VZV enfeksiyonları üzerinde de uygulanmıştır. Viral DNA polimeraz üzerinde bulunan pirofosfat bağlama bölgesindeki anyon pirofosfatı taklit ederek etki eder. Veteriner hekimliğinde de kullanılan ajan, kedilerde oral yolla uygulamada, biyoyararlılığı yaklaşık %8’lerde seyrettiği için yaygın olarak kullanılmamaktadır [1,73].

İntegraz İnhibitörleri

Retroviral ajanlar, konakçı hücrelerde çoğalıp saçılabilmek için proteaz, integraz ve reverz transkriptaz enzimlerine ihtiyaç duyarlar. Etkenin konakçı hücreye penetrasyonunu reverz transkriptaz ile viral DNA replikasyonu izler. Replikasyon sonucu viral integrazlar proviral DNA’nın 3’ ucunu çeşitli prosesler ile konakçı hücre genomuna entegre eder. İntegraz inhibitörlerinin etki mekanizması, enzimin katalitik bölgesinde bulunan Mg⁺² ye bağlanarak, virusun entegreasyon aşamasını inhibe etmek üzerine kuruludur [51,53]. İlk HIV inhibitörleri 2007 yılında geliştirilmiştir. Raltegravir, dolutegravir ve elvitegravir adı verilen bu ajanlar genellikle, “highly active antiretroviral therapy” (HAART) için kullanılmaktadır [22].

Raltegravir integraz inhibitörleri arasında ilk onaylanan ilaçtır. HIV-1 RNA seviyesi yüksek, CD4 hücre sayısı düşük olan hastalar üzerinde kullanılan ajanın oldukça etkili olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra raltegravir, nükleosit analoglarıyla ve rifonovir ile kombine edilebilir [19,22]. Elvitegravir onaylanmış ikinci integraz inhibitörüdür, tek başına etki gösterebileceği gibi, emtricitabine, tenofovir alafenamide, tenofovir disoproxil fumarate, cobicistatlar ile de kombine edilerek kullanılabilir [77]. Elvitegreavir, raltegravir ile benzer direnç mutasyonları paylaştıkları için, raltegravir dirençli HIV-1 enfeksiyonlarında kullanılmamalıdır [58]. Dolu-

tegravir, 2013 yılında raltegravir ve elvitegravire direnç gösteren retroviral ajanların sebep olduğu enfeksiyonların sağaltımında kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Tek başına etki gösterebileceği gibi, abacavir ve lamuvidine ile kombine edilerek de kullanılabilir [53].

Giriş İnhibitörler

Giriş inhibitörlerin etki mekanizması, virusların konakçı hücre membranına adsorbsiyonunu ve hücre içine penetrasyonunu engellemek üzere kurulmuştur. Bu grup içerisinde, retroviridial enfeksiyonlara karşı geliştirilen enfuvirtide, maraviroc; herpetik enfeksiyonlara karşı geliştirilen docosanol gibi ajanları barındırır [19].

HIV etkeninin zar proteinlerinden biri olan gp120 konakçı hücrenin CD4 lökosit reseptörüne bağlanır, bu bağlanma aşamasında gp120 üzerindeki özel yapılar konakçı hücre yüzeyinde bulunan CCR5 veya CXCR4 reseptörlerine adsorbe olur [59]. Adsorbsiyonu takiben gp41’de konformatif değişimler meydana gelir. Bu değişimler sonucu, N-Heptad repeat ve C-Heptad repeat bölümleri bir araya gelerek altılı sarmal demeti meydana getirir ve konakçı hücre membranı ile virus membranı arasında bir füzyon oluşturur [26]. Oluşan bu füzyon ile etken hücreye penetre olur [9].

Enfuvirtide, 2003 yılında onaylanan ilk giriş inhibitörüdür. Ajan, HIV’in gp41 yüzey proteinini inhibe ederek etkenin konakçı hücreye penetrasyonunu engeller [24]. Bunun yanısıra ajan düşük biyoyararlanıma sahiptir ve gastrointestinal sistem proteazlarına karşı duyarlıdır [35]. Bu nedenle in-vivo ortamda yarılanma ömrü yaklaşık 4 saattir ve günlük paranteral yolla uygulanması gerekir [54].

Maraviroc, 1996 yılında kemokin reseptörü olarak geliştirilmiş ilk antiviral ilaçtır. Ajan, konakçı hücre yüzeyinde bulunan CCR5 kemokin reseptörüyle HIV gp120 yüzey proteininin arasında bağlantı kurulmasını engelleyerek antiviral etki meydana getirir [55]. Hücre kültürleri üzerinde yapılan bazı deneylerde, proteaz inhibitörleri, nükleaz reverz transkriptaz inhibitörleri ve non-nükleaz reverse transkriptaz inhibitörleri maraviroc ile kombine edilip uygulandığında aralarında antagonizm gelişmediği gözlemlenmiştir. Bunun yanısıra, maraviroc’un bir diğer giriş inhibitörü olan enfuvirtide

ile kombinasyonu HIV-1' in sağaltımında sinerjistik bir etki göstermiştir [72].

Yirmi iki karbon uzunluğunda, doymuş bir primer alkol olan docosanol, HSV, VZV, RSV gibi zarlı viruslar üzerinde etkilidir [41,62]. Etki mekanizması, etkenin konakçı hücreye adsorbiyonunu engelleme ve viral replikasyonun inhibisyonu üzerine kuruludur [30,41]. Docosanol, trifluride ve idoxuridine gibi non selektif bir yapıya sahip olduğu için parenteral uygulamalarda toksik bir etki meydana getirmektedir. Bu nedenle, sadece topikal sağaltımlarda kullanılır [52].

Proteaz İnhibitörleri

Proteaz inhibitörleri, HIV ve hepatit C virus (HCV) enfeksiyonlarının tedavilerinde uygulanmak üzere geliştirilseler de, herpesvirus, picornavirus, flavivirus, filovirus kaynaklı hastalıkların sağaltımında da kullanılmaktadır [3].

Proteaz, HIV replikasyonunun son aşamasında önemli bir yer tutar. Enzim, viral gag ve gagpol precursor proteinlerinin işlenmesinde rol oynayarak olgun enfektif virus partiküllerinin oluşmasını sağlar [74]. Bu ajanların etki mekanizması, proteaz enziminin aktif bölümlerine bağlanarak viral poliproteinlerin oluşumunu ve yayılmasını engellemek üzerine kurulmuştur [3].

1995 yılında piyasaya sürülen saquinavir üretilen ilk proteaz inhibitörüdür. AIDS hastalarının sağaltımında kullanılmak üzere geliştirilmiştir [43]. Saquinavirin üretilmesini takiben ritonavir, indinavir ve nelfinavir piyasaya sürülmüştür. Birinci nesil HIV proteaz inhibitörleri olan bu ajanlar, düşük biyoyararlanımlarının yanı sıra hepatotoksik, nefrotoksik, gastrointestinal sistem bozuklukları gibi yan etkiler meydana getirdikleri için günümüzde yaygın olarak kullanılmamaktadır [3,75]. İkinci kuşak HIV proteaz inhibitörleri lopinavir, amprenavir, atazanavir, tipranavir, darunavir antiviral ilaçlarını içerir. Bu ajanlar, birinci kuşak proteaz inhibitörlerinin neden olduğu yan etkilerin azaltılması ve biyoyararlanımının artırılması için geliştirilmiştir [3].

HIV'in proteaz enziminde meydana gelen primer ve sekonder mutasyon direnci, proteaz inhibitörü uygulanan hastalarda direnç oluşumuna sebep olabilmektedir [75]. Direnç oluşumuna karşın, proteaz inhibitörleri, Amerika Birleşik Devletleri'nde

ve pek çok Avrupa ülkesinde Lopinavir/Ritonavir, Darunavir/Ritonavir, Saquinavir/Ritonavir gibi ajanlar kombinasyon olarak kullanılmaktadır [12].

HIV'de olduğu gibi HCV'nin yaşam siklusunda da proteaz önemli bir yer kaplar. NS4A ve NS3 proteaz enzimi, viral poliproteinlerin olgunlaşmasında önemli rol oynar [21]. Proteaz inhibisyonu amacıyla geliştirilmiş olan her ajan proteaz enziminin aktif bölümüne bağlanarak antiviral etki gösterir [66]. HCV NS3/4A proteaz inhibitörleri arasında, vaniprevir, boceprevir, asunaprevir, grazoprevir, paritaprevir, simeprevir ve telaprevir örnek olarak gösterilebilir [19]. Japonyada, HCV-1 ile enfekte olan hastalar üzerinde, asunaprevir+declatasvir ve vaniprevir+PegIFN α -2b+ribavirin gibi ilaç kombinasyonlarının denendiği bildirilmiştir [31]. 2015 yılında geliştirilen, grazoprevir+elbasvir kombinasyonu ise HCV-1 ve 4 enfeksiyonlarının her ikisinin tedavisinde de uygulanmıştır [49].

Nükleozit Reverz Transkriptaz İnhibitörleri (NRTİ)

Reverz transkriptaz, retroviral etkenlerin viral ssRNA genomundan dsDNA sentezlenme aşamasında rol oynayan en önemli enzimlerinden biridir [17]. NRTİ'ler, konakçı hücrede var olan kinaz ve fosforansferaz enzimleri ile fosforile olarak deoxynükleosit trifosfat (dNTP) analoguna dönüşür. Bu yapı, endojen dNTP'ler ile yarışmalı olarak viral reverz transkriptaz'a bağlanır ve zincir yapısını bozarak viral replikasyonu inhibe eder [14]. 1987 yılında onaylanan ilk NRTİ zidovudinedir. Retroviral enfeksiyonların tedavisinde viral reverz transkriptaz inhibisyonunun olumlu sonuç vermesi üzerine etki mekanizmaları zidovudine'ye benzer yeni ilaçlar geliştirilmiştir. Bunlar zalcitabine, emtricitabine, lamivudine, stavudine, abacavir, didanosine'dir [19].

Nükleozit reverz transkriptaz inhibitörlerine karşı ilaç direnci çok çabuk şekillendiği için bu ajanlar, HIV tedavilerinde virusun yaşam siklusunun başka bir aşamasını inhibe ederek antiviral etki gösteren ajanlarla kombine edilerek kullanılır [12]. Lamivudine+dolutegravir, emtricitabine+TDF, emtricitabine+TDF+elvitegravir+cobicistat bu kombinasyonlardan bazılarıdır [19,61].

Non-Nükleozit Reverz Transkriptaz İnhibitörleri (NNRTİ)

NNRTİ viral reverz transkriptazın, allosterik bölgesi olan katalitik bölgeyi hedef alarak antiviral etki gösteren nonkompetif bir inhibitör grubudur. İnhibitörlerin hedef alınan bölgeye bağlanmasını takiben etkenin katalitik etkinliği azalır, bunun sonucu viral replikasyon inhibe edilmiş olur [2,16].

1980' li yılların sonlarına doğru rilpivirinen, delavirdine, evirapine, efavirenz, etravirine gibi ajanlar geliştirilmiştir [19].

M2 (Matrix 2) Protein İnhibitörleri

İnfluenza A virus'un integral membran proteini olan M2 proton kanalı işlevi, etkenin konakçı hücreye girişi sırasında viral membranda; etken ile enfekte hücrede viral maturasyon aşamasında ise trans-golgi membranda pH düzeyini dengelemektir [39,56].

İnfluenza A virus enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen amantadine ve rimantadine, H⁺ iyonlarının M2 protein kanallarıyla viral yapıya aktarılması engelleyerek iyon konsantrasyonunda bir değişim meydana getirir. Bu değişim, influenza virus nükleik asidinin kapsitten ayrılmasını inhibe eder ve antiviral etki meydana gelir [37,42].

Amantidine ve ramantadine, özellikle enfeksiyonun ilk 48 saatinde kullanıldığında semptomlarda kayda değer bir azalma meydana getirmektedir. Fakat, ajana karşı gelişmiş olan dirençten ötürü kullanım sahası daralmıştır. Yapılan denemelerde, amantidine ve rimantadine'nin benzer etkilere sahip olduğu anlaşılmıştır, fakat nörolojik yan etkiler rimantadine'de amantidine'ye oranla daha düşüktür [60].

Nöroaminidaz inhibitörleri (NAI)

İnfluenza virusların hemaglutinin, nöroaminidaz ve M2 olmak üzere 3 adet yüzey proteini bulunmaktadır. Hemaglutinin, virusun hücre reseptörleri üzerindeki terminal sialik asitlere bağlanmasını sağlarken, M2 proteini viral replikasyon aşamasında pH dengesini sağlamakla görevlidir [48]. Nöroaminidaz ise, replikasyon sonrası oluşan yeni virus partiküllerinin hücre yüzeyinden salınımından sorumludur [4]. Nöroaminidaz inhibitörleri, bu protein üzerine etkiyerek oluşan yeni virus partiküllerinin saçılımını engellemek suretiyle antiviral etki gösterir [50].

1999 yılında geliştirilen ve ilk NAI olan zanamivir, nöroaminidazın epitoplara sialik asitten daha fazla affinite gösterir. İnhalasyon yolu ile kullanılan ajanın %15'i alt solunum yollarında kalır [36]. Zanamivir, influenza B ve H1N1 suşu üzerinde oseltamivire oranla daha yüksek aktivite gösterse de H3N2 suşunda oseltamivirden düşük bir etki meydana getirir [63]. Oseltamivir, zanamivirin yapısı örnek olarak geliştirilmiş ve aktif formuna karaciğerde dönüşmek üzere geliştirilmiş bir ön ilaçtır. İlaç hap veya şase şeklinde oral uygulandığında yüksek bir biyoyararlanım gösterir [38,50].

Antiviral Etki Gösteren Diğer Ajanlar

İnterferonlar

Viral enfeksiyonlara karşı hücrelerin temel savunma mekanizması olan interferonlar immunolojik ve antiviral fonksiyonları diğerlerinden farklı olan sitokinler olarak tanımlanabilir. İlk olarak 1957 yılında keşfedilmiştir ve hala üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Alfa, beta, gamma (α , β , γ) olmak üzere 3 tipi ve bu tiplerin pek çok alt tipi bulunmaktadır [73]. Viral replikasyonun baskılanmasında büyük bir rol oynayan interferon tip I, ağırlıklı olarak hematopoetik hücrelerden salgılanır ve vücudu antiviral aktivite için uyarır. Yapılan son çalışmalar, patojen ile ilişkili moleküler patternlerin (PAMPs) interferon üretimini tetiklediğini ortaya koymuştur. Viral bir enfeksiyon sırasında virusun RNA transkripsiyon aşaması PAMP reseptörleri tarafından algılanmaktadır. Enfeksiyonun ilk saatlerinde, hücrelerde interferon tip 1 ve tip 3'ünde aralarında olduğu bazı gen gruplarında aktivasyon şekillenmektedir. Aktive olan bu interferonlar, interferon stimule edici genleri (ISG) aktive eder. Şekillenen bu gen aktivasyonu, viral replikasyonun farklı adımlarını inhibe eden antiviral etkenlerin oluşumuna katılır [19,67].

HBV ve HCV enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan 3 farklı interferon preparatı geliştirilmiştir. Bunlar, Interferon Alfacon-1, Pegylated İnterferon α -2a (PegIFN α -2a) ve PegIFN α -2b dir. Ciddi yan etkilerinden ötürü Interferon Alfacon-1, 2013 yılında kullanımdan kaldırılmıştır. PegIFN α kökenli ajanlar, HBV sağaltımında kullanılırken, HCV sağaltımında yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bunun sebebi, HCV sağaltımında, interferon içermeyen ajanların, içerenlere oranla daha etkili

olmasıdır [33,73]. İnterferon tedavisi, insan sağlığı yanı sıra veteriner hekimliğinde de kullanılmaktadır. İn vitro ortamda 1×10^5 den 5×10^5 IU/ml'ye kadar uygulanan ve kedilerde son zamanlarda tespit edilen feline IFN ω 'nin sitotoksitite göstermeden FeHV-1 titresini düşürdüğü gözlemlenmiştir. Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda IFN ω , IFN α ya göre çok daha etkili bulunmuştur [65,71]. Bir diğer in vitro çalışmada, 10-62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ asiklovir 10-100 IU/ml rekombinant insan IFN α ile kombine edilmiş ve bu kombinasyon herhangi bir sitotoksik etki göstermediği gibi FeHV-1'in maksimal inhibisyonu için gerekli olan asiklovirin dozunu yaklaşık 8 kat düşürmüştür. Bu verilere göre interferonların nükleosid analogları ile birlikte kullanılmaları tavsiye edilmektedir [73].

Lizin; Çoğunlukla herpetik enfeksiyonların tedavisinde kullanılan aminoasit yapıda bir ajandır. Antiviral etkisi, herpevirusların replikasyonunda esansiyel olan argininin antagonisti olmasıdır, bu antagonizm viral protein sentezini inhibe eder [73].

Lambda- Carrageenan; Sülfat polisakarit içeren bir deniz yosunu ekstraktıdır, viral zar glikoproteinlerine bağlanarak etkenin konakçı hücreye adsorbsiyonunu engeller [25].

Sonuç

İlaç sanayisinde antiviral ilaçların geliştirilmesi diğer antimikrobiyal ilaçlara göre daha geride kalmıştır. Ancak günümüzde biyoteknolojinin ve moleküler genetiğin hızlı gelişmesinden dolayı spesifik olarak viral enfeksiyonların tedavisi amacıyla antiviral ilaçların geliştirilmesi hususunda önemli mesafeler alınmıştır. Bu ilaçların yan etkilerinin azaltılarak rutinde kullanıma sokulmaları viral kaynaklı enfeksiyonların profilaksi ve tedavisinde oldukça faydalı olacaktır.

Kaynaklar

1. Adalsteinsson JA, Pan M, Kaushik S, Ungar J, (2018). *Foscarnet-induced genital lesions: An overview with a case report*. Dermatol Reports.10, 12-13.
2. Adams J, Patel N, Mankaryous N, Tadros M, Miller CD, (2010). *Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Resistance and the Role of the Second-Generation Agents*. Ann Pharmacother. 44, 157-165.
3. Agbowuro AA, Huston WM, Gamble AB, Tyndall JDA, (2018). *Proteases and protease inhibitors in infectious diseases*. Med Res Rev. 38, 1295-1331.

4. Air GM, (2012). *İnfluenza neuraminidase*. Influenza Other Respir Virus. 6,245-256.
5. Al-Badr AA, Ajarim TDS, (2018). *Ganciclovir*. Brittin HG. Eds. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology vol 43*. Academic Press Inc, USA, 1-208.
6. Andrei G, Sienaert R, McGuigan C, De Clercq E, Balzarini J, Snoeck R, (2005). *Susceptibilities of several clinical varicella-zoster virus (VZV) isolates and drug-resistant VZV strains to bicyclic furano pyrimidinenucleosides*, Antimicrob Agents Chemother. 49, 1081-1086.
7. Angus P, Vaughan R, Xiong S, Yang H, Delaney W, Gibbs C, Brosgart C, Colledge D, Edwards R, Ayres A, Bartholomeusz A, Locarnini S, (2003). *Resistance to Adefovir Dipivoxil Therapy Associated With the Selection of a Novel Mutation in the HBV Polymerase*. Gastroenterology. 125, 292-297.
8. Arslan U, Ural O, Fındık D, (2008). *Lamivudin tedavisi alan kronik hepatit B olgularında inno-lipa HBV DR yöntemi ile saptanan YMDD motif değişiklikleri*, Mikrobiyol Bul. 42, 445-450.
9. Berkhout B, Eggink D, Sanders RW, (2012). *Is there a future for antiviral fusion inhibitors*.
10. Białek-Pietras M, Olejniczak AB, Paradowska E, Studzinska M, Jabłonska A, Lesnikowski ZJ, (2018). *Synthesis, susceptibility to enzymatic phosphorylation, cytotoxicity and in vitro antiviral activity of lipophilic pyrimidine nucleoside/carborane conjugates*. J Organomet Chem. 865, 166-172.
11. Chang T, Gish R, De Man R, (2006). *A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B*. N. Engl. J. Med. 354, 1001-1010.
12. Charpentier C, Camacho R, Ruelle J, Eberle J, Gurtler L, Pironti A, Sturmer M, Brun-Vezinet F, Kaiser R, Descamps D, Obermeier M, (2015). *HIV-2EU-supporting standardized HIV-2 drug-resistance interpretation in Europe: an update*. Clin Infect Dis. 61, 1346-1347.
13. Chou TY, Hong BY, (2014). *Ganciclovir ophthalmic gel %0.15 for the treatment of acute herpetic keratitis: background, effectiveness, tolerability, safety, and future applications*. Ther Clin Risk Manag. 10, 665-681.
14. Cihlar T, Ray AS, (2010). *Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine*. Antiviral Res. 85,39-58. Curr Opin Virol. 2, 50-59.
15. Curran M, Noble S, (2001). *Valganciclovir*. Drugs. 61, 1145-1150.
16. D'Cruz OJ, Uckun FM, (2006). *Dawn of non-nucleoside inhibitor-based anti-HIV microbicides*. J Antimicrob Chemother. 57,411-423.
17. Das K, Arnold E, (2013). *HIV-1 reverse transcriptase and antiviral drug resistance. Part 1*. Curr Opin Virol. 3,111-118.
18. De Clercq E, (2009). *Looking back in 2009 at the dawning of antiviral therapy now 50 years ago: An historical perspective*. Adv Virus Res. 73, 1-53.
19. De Clercq E, Li G, (2016). *Approved antiviral drugs over the last 50 years*. Clin Microbiol Rev. 29, 695-747.
20. De Clercq, (2004). *Discovery and development of BVDU (brivudin) as a therapeutic for the treatment of herpes zoster*. Biochem Pharmacol. 68, 2301-2315.

21. De Leuw P, C Stephen, (2018). Protease inhibitor therapy for hepatitis C virus-infection. *Expert Opin Pharmacother.* 19, 577–587.
22. De Miguel R, Montejano R, Stella-Ascaris N, Arribas JR, (2017). *A safety evaluation of raltegravir for the treatment of HIV.* *Expert Opin Drug Saf.* 17, 217-223.
23. Dienstag JL, Goldin RD, Heathcote EJ, Hann HWL, Woessner M, Stephenson SL, Gardner S, Gray DF, Schiff ER, (2003). *Histological Outcome During Long-term Lamivudine Therapy.* *Gastroenterology.* 124, 105-117.
24. Dingens AS, Arenz D, Overbaugh J, Bloom JD, (2018). *Massively parallel profiling of HIV-1 resistance to the fusion inhibitor enfuvirtide.* *BioRxiv* 472746, Erişim tarihi: 06.12.2018.
25. Diogo JV, Novo SG, Gonzalez MJ, Ciancia M, Bratanich AC, (2015). *Antiviral activity of lambda-carrageenan prepared from red seaweed (Gigartina skottsbergii) against BoHV-1 and SuHV-1.* *Res Vet Sci.* 98,142-144.
26. Este JA, Telenti A, (2007). *HIV entry inhibitors.* *Lancet,* 370, 81-88.
27. Fontenelle JP, Powell CC, Veir KJ, Radecki SV, Lappin RM, (2008). *Effect of topical ophthalmic application of cidofovir on experimentally induced primary ocular feline herpesvirus-1 infection in cats.* *Am J Vet Res.* 69, 289-293.
28. Groth DA, Contreras MT, Kado-Fong HK, Nguyen KQ, Thomasy SM, Maggs DJ, (2014). *In vitro cytotoxicity and antiviral efficacy against feline herpesvirus type 1 of famciclovir and its metabolites.* *Vet Ophthalmol.* 17, 268-274.
29. Hamann M, Hill R, Roggo S, (2007). *Marine natural products. Key advances to the practical application of this resource in drug development.* *Chimia.* 61, 313-321.
30. Hammer KDP, Dietz J, Lo TS, Johnson ME, (2018). *A systematic review on the efficacy of topical acyclovir, penciclovir, and docosanol for the treatment of herpes simplex labialis.* *EMJ Dermatol,* 6, 118-123.
31. Hayashi N, Nakamuta M, Takehara T, Kumada H, Takase A, Howe AY, Ludmerer SW, Mobashery N, (2016). *Vaniprevir plus peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naive Japanese patients with hepatitis C virus genotype 1 infection: a randomized phase III study.* *Gastroenterology.* 51, 390-403.
32. Hazuda DJ, Young SD, Guare JP, Anthony NJ, Gomez RP, Wai JS, Vacca JP, Handt L, Motzel SL, Klein HJ, Dornadula G, Danovich RM, Witmer MV, Wilson KA, Tussey L, Schleif WA, Gabryelski LS, Jin L, Miller MD, Casimiro DR, Emini EA, Shiver JW (2004). *Integrase inhibitors and cellular immunity suppress retroviral replication in rhesus macaques.* *Sci.* 305, 528-532.
33. Heim MH, (2013). *25 years of interferon-based treatment of chronic hepatitis C: An epoch coming to an end.* *Nat Rev Immunol.* 13, 535-542.
34. Hussein İTM, Menashy RV, Field HJ, (2008). *Penciclovir is a potent inhibitor of feline herpesvirus-1 with susceptibility determined at the level of virus-encoded thymidine kinase.* *Antiviral Res.* 3, 268-274.
35. Ikeda T, Tennyson R, Walker SN, Harris RS, McNaughton B (2019): *Evolved Proteins Inhibit Entry of Enfuvirtide-Resistant HIV-1,* *ACS Infect Dis* (Article ASAP), DOI: 10.1021/acscinfecdis.8b00362.
36. Ison MG, (2013). *Clinical use of approved influenza antivirals: therapy and prophylaxis.* *Influenza Other Respi Viruses.* 7, 7–13.
37. Jacob A, Sood R, Chanu KV, Bhatia S, Khandia R, Pateriya AK, Nagarajan S, Dimri U, Kulkarni DD, (2016). *Amantadine resistance among highly pathogenic avian influenza viruses (H5N1) isolated from India,* *Microb Pathog.* 91, 35-40.
38. Kamali A, Holodniy M, (2013). *Influenza treatment and prophylaxis with neuraminidase inhibitors: a review.* *Infect Drug Resist.* 6, 187-198.
39. Kozakov D, Chuang GY, Beglov D, Vajda S, (2010). *Where does amantadine bind to the influenza virus M2 proton channel ?.* *Trends Biochem Sci.* 35,471-475.
40. Lai CL, Gane E, Liaw YF, Hsu CW, Thongsawat S, Wang Y, Chen Y, Heathcote JE, Resenack J, Bzowej N, Naoumov NV, Di Bisceglie AM, Zeuzem S, Moon YM, Goodman Z, Chao G, Constance BF, Brown NA, (2007). *Telbivudine versus Lamivudine in Patients with Chronic Hepatitis B.* *New Eng J Med.* 357, 2576-2588.
41. Leung DT, Sacks SL, (2004). *Docosanol: a topical antiviral for herpes labialis.* *Expert Opin Pharmacother.* 5, 2567–2571.
42. Liang R, Li H, Swanson JM, Voth GA, (2014). *Multiscale simulation reveals a multifaceted mechanism of proton permeation through the influenza A M2 proton channel.* *Proc Natl Acad Sci USA.* 111, 9396–9401.
43. Lv Z, Chu Y, Wang Y, (2015). *HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity.* *HIV/AIDS (Auckl).* 7, 95-104.
44. Maes R, (2012). *Felid Herpesvirus Type 1 Infection in Cats. A Natural Host Model for Alphaherpesvirus Pathogenesis.* *Int Sch Res Net Vet Sci,* 1-14.
45. Maggs DJ, (2005). *Update on Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Feline Herpesvirus Type 1,* *Clin Tech Small Anim Pract.* 20, 94-101.
46. Maggs DJ, Clarke HE, (2004). *In vitro efficacy of ganciclovir, cidofovir, penciclovir, foscarnet, idoxuridine, and acyclovir against feline herpesvirus type-1.* *Am J Vet Res.* 65, 399-403.
47. Mahmoud S, Hasabelnaby S, Hammad SF, Sakr TM, (2018). *Antiviral Nucleoside and Nucleotide Analogs: A Review.* *J Adv Pharm Res.* 2, 73-88.
48. McKimm-Breschkin JL, (2013). *Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance.* *Influenza Other Respir Virus.* 7, 25-36.
49. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, Barnes E, (2015). *Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes.* *Hepatology.* 61, 77–87.
50. Moscana A, (2005). *Neuraminidase Inhibitors for Influenza.* *New Eng J Med.* 353, 1363-1373.
51. Mouscadet JF, Tchertanov L, (2009). *Raltegravir: molecular basis of its mechanism of action.* *Eur J Med Res.* 14, 5–16.

52. Nováková L, Pavlík, J. Chrenková L, Martinec O, Červený L, (2018). *Current antiviral drugs and their analysis in biological materials—Part I: Antivirals against respiratory and herpes viruses*. J Pharm Biomed Anal. 147, 400–416.
53. Patel P, Louie S, (2018). *Drug Interactions in HIV: Protease and Integrase Inhibitors*. Pai M, Kiser J, Gubbins P, Rodvold K eds. Drug Interactions in Infectious Diseases: Antimicrobial Drug Interactions Fourth edition. Humana Press, Cham. p.255-295.
54. Patel, IH, Zhang X, Nieforth K, Salgo M, Buss N, (2005). *Pharmacokinetics, pharmacodynamics and drug interaction potential of enfuvirtide*. Clin Pharmacokinet. 44, 175-186.
55. Perry CM, (2010). *A Review of its Use in the Management of CCR5-Tropic HIV-1 Infection*. Drugs. 70, 1189-1213.
56. Pielak RM, Schnell JR, Chou JJ, (2009). *Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel*. Proc Nat Acad Sci. 106, 7379-7384.
57. Poole CL, James SH, (2018). *Antiviral therapies for herpesviruses: Current agents and new direction*. Clin Thera. 40, 1282-1298.
58. Quashie PK, Sloan RD, Wainberg MA, (2012). *Novel therapeutic strategies targeting HIV integrase*. BMC Med. 10, 1-11.
59. Rad TM, Saghaie L, Fassihi A, (2019). *HIV-1 Entry Inhibitors: A Review of Experimental and Computational Studies*. Chem Biodiversity. 15, e1800159.
60. Razonable RR, (2011). *Antiviral Drugs for Viruses Other Than Human Immunodeficiency Virus*. Mayo Clin Proc. 86, 1009–1026.
61. Rokx C, Rijnders BJA, (2015). *Evidence gathered from randomized clinical trials and observational studies on the equivalence of emtricitabine and lamivudine*. Clin Infect Dis. 60, 1732–1733
62. Sacks SL, Thisted RA, Jones TM, Barbarash RA, Mikolich DJ, Ruoff GE, Jorizzo JL, Gunnill LB, Katz DH, Khalil MH, Morrow PR, Yakatan GJ, Pope LE, Berg JE, Docosanol 10% Cream Study Group, (2001). *Clinical efficacy of topical docosanol 10% cream for herpes simplex labialis: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial*. J Am Acad Dermatol. 45, 222-230.
63. Samson M, Pizzorno A, Abed Y, Boivin G, (2013). *Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors*. Antiviral Res. 98, 174–185.
64. Sancho-Ruiz A, Sheldon J, Soriano V, (2007). *Telbivudine: a new option for the treatment of chronic hepatitis B*. Expert Opin. Biol. Ther. 7, 751-761.
65. Sandmeyer LS, Keller CB, Bienzle D, (2005). *Effects of interferon- α on cytopathic changes and titers for feline herpesvirus-1 in primary cultures of feline corneal epithelial cells*. Am J Vet Res. 66, 210-216.
66. Sarrazin C, (2016). *The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice*. J Hepatol. 64, 486–504.
67. Schoggins JW, (2018). *Recent advances in antiviral interferon-stimulated gene biology*. F1000Research. 7: 309. Erişim tarihi: 28.03.2019.
68. Sebbag L, Thomasy SM, Woodward PA, Heather KK, Maggs DJ, (2016). *Pharmacokinetic modeling of penciclovir and BRL42359 in the plasma and tears of healthy cats to optimize dosage recommendations for oral administration of famciclovir*. Am J Vet Res. 77, 833-845.
69. Segovia CM, Chacra W, Gordon SC, (2012). *Adefovir dipivoxil in chronic hepatitis B: history and current uses*. Expert Opin Pharmacother. 13, 245-254.
70. Seley-Radtke KL, Yates MK, (2018). *The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold*. Antivir Res. 154, 66–86.
71. Siebeck N, Hurley JD, Garcia M, Greene CE, Köstlin RG, Moore AP, Dietrich UM, (2006). *Effects of human recombinant alpha-2b interferon and feline recombinant omega interferon on in vitro replication of feline herpesvirus-1*. Am J of Vet Res. 8, 1406-1411.
72. Tan Q, Zhu Y, Li J, Chen Z, Han GW, Kufareva I, Li T, Ma L, Fenalti G, Li J, Zhang W, Xie X, Yang H, Jiang H, Cherezov V, Liu H, Stevens RC, Zhao Q, Wu B, (2013). *Structure of the CCR5 Chemokine Receptor–HIV Entry Inhibitor Maraviroc Complex*. Sci. 341, 1387-1390.
73. Thomasy SM, Maggs DJ, (2016). *A review of antiviral drugs and other compounds with activity against feline herpesvirus type 1*. Vet Ophthalmol. 19, 119-130.
74. Tözsér J, (2010). *Comparative Studies on Retroviral Proteases: Substrate Specificity*. Viruses. 2, 147-165.
75. Wensing AM, Van Maarseveen NM, Nijhuis M, (2010). *Fifteen years of HIV protease inhibitors: raising the barrier to resistance*. Antiviral Res. 85, 59–74.
76. Wilhelmus KR, (2015). *Antiviral treatment and other therapeutic interventions for herpes simplex virus epithelial keratitis*. Cochrane Database Syst Rev, 8, CD002898.
77. Yamada H, Ikushima I, Nemato T, Ishikawa T, Ninomiya N, Irie S, (2017). *Effects of a nutritional protein-rich drink on the pharmacokinetics of elvitegravir, cobicistat, emtricitabine, tenofovir alafenamide, and tenofovir compared with a standard meal in healthy Japanese male subjects*. Clin Pharma Drug Develop. 7, 132-142.