ISSN 1016-3573

VETERİNER KONTROL MERKEZ
ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
Etlik - ANKARA

TÜRKAK
Test
TS EN ISO/IEC 17025
AB-0048-T

ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ

JOURNAL OF ETLİK VETERINARY MICROBIOLOGY
ANKARA – TURKEY

Cilt/Volume **29** ♦ **Sayı**/Number **1** ♦ **2018**

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi

Cilt/Volume **29 ♦ Sayı**/Number **1 ♦ 2018**

Journal of Etlik Veterinary Microbiology

Yılda iki kez yayımlanır / Published two times per year

ISSN 1016-3573

Sahibi

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Adına

Dr. Cevdet Yaralı

Enstitü Müdür V.

Yayın Kurulu / *Publication Board*

Sorumlu Yazı İşleri Müdürü / *Managing Editor*

Dr. A. Burak Güngör

Editör / *Editor in Chief*

Dr. Tahsin Onur Kevenk

Bilimsel Kurul / *Editorial Board*

Dr. Erhan Akçay

Dr. Asiye Dakman

Dr. Ali Erkurt

Dr. Filiz Şen

Adres / *Address*

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü

Ahmet Şefik Kolaylı Cad. No 21/21-A

06020 Etlik - Ankara / TÜRKİYE

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

Faks : +90 312 321 17 55

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

E-posta : etlikvetmikrobiyolderg@gmail.com

Hakem Listesi */ Referee List**

Doç.Dr. Ramazan ADANIR	M. Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji
Dr. Ayşe Zeynep AKKUTAY YOLDAR	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Enes ATMACA	OMÜ Veteriner Fakültesi Su Ürünleri Hastalıkları
Prof.Dr. Hamza AVCIOĞLU	Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji
Doç.Dr. Yunus Emre BEYHAN	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji
Doç.Dr. Cenk Soner BÖLÜKBAŞ	OMÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji
Doç.Dr. Şeyda CENGİZ	Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji
Dr. Nüvit COŞKUN	Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji
Doç. Dr. Özgür ÇADIRCI	OMÜ Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi
Doç.Dr. Alper ÇİFTÇİ	OMÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji
Dr. Güzin İPLİKÇİOĞLU ÇİL	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi
Dr. Fırat DOĞAN	Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji
Doç.Dr. Ahmet Onur GİRİŞGİN	Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji
Dr. Gülşen GONCAGÜL	Uludağ Üniversitesi Mennan Pasinli MYO
Dr. Tülin Güven GÖKMEN	Çukurova Üniversitesi Ceyhan Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji
Prof.Dr. Timur GÜLHAN	OMÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji
Dr. Ahmet Burak GÜNGÖR	Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Md.
Doç.Dr. Ali Tümay GÜRLER	OMÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji
Dr. İlke KARAYEL HACIOĞLU	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji
Dr. Erhan KEYVAN	M. Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi
Prof.Dr. Ergün KÖROĞLU	Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji
Doç.Dr. Kaan MÜŞTAK	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji
Doç.Dr. Ertan Emek ONUK	OMÜ Veteriner Fakültesi Su Ürünleri Hastalıkları
Doç.Dr. Serap SAVAŞAN	Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji
Doç.Dr. Armağan Erdem ÜTÜK	Çukurova Üniversitesi Ceyhan Veteriner Fakültesi Parazitoloji

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

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

Copyright © Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2018, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

Basım Tarihi / Publishing Date: Haziran / Jume 2018, Baskı adedi / Circulation: 500

Tasarım ve Baskı / Printing

Medisan Yayinevi Ltd.Şti.
Çankırı Cad. 45 / 347 Ulus - Ankara, Türkiye
Tel : +90 312 311 24 26 – 311 00 57 medisanyayinevi@gmail.com

İçindekiler / *Contents*

Araştırma Makalesi / Research Article

Pilot Çalışma: Manda Sütünde *Toxocara vitulorum* Larva Varlığının Araştırılması

A Pilot Study: Investigation of *Toxocara vitulorum* Larvae in Water Buffale Milks

Ali Tümay Gürler, Hande Gürler 1

Gökkuşağı Alabalıklarından İzole Edilen Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Hidrofobisite, Safra ve pH Töleranslarının Tespiti

Determination of Hydrophobicity, Bile and pH Tolerances of Potential Probiotics Isolated From Rainbow Trout *(Oncorhynchus mykiss,* Walbaum 1792)

Behire Işıl Didinen, Alper Çiftci, Esengül Morsümbül 5

Koyun Kırkımı Sırasında İnsanlara Bulaşabilecek Bakteriler ve Antibiyotik Dirençlilik Profillerinin Belirlenmesi

The Determination of Antibiotic Resistance Profiles and Bacteria Infected Humans During The Sheep Shearing

Mustafa Barış Akgül, Gülşah Akgül, Özge Yılmaz, Serpil Kahya Demirbilek, Nihat Şındak, Ali Günaydın 12

Türkiye'nin Adana Yöresindeki Koyunlarda *Toxoplasma gondii* ve *Neospora caninum* Seroprevalansının Araştırılması

A Research on the Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Sheep in Adana Province of Turkey

Funda Eşki, Pınar Demir, Cahit Babür, Armağan Erdem Ütük 19

Epidemiological Investigation of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever infection in Cattle in some provinces of Turkey

Türkiye'nin bazı İllerindeki Sığırlarda Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Enfeksiyonunun Epidemiyolojik Araştırılması

Murat Şevik..... 24

Broiler Sürülerinde *Ornithobacterium rhinotracheale* İnfeksiyonunun Seroprevalansının ELISA Yöntemi ile Araştırılması

Investigation of the seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in broiler hens by ELISA

Cenk Güllü, Göksel Erbaş..... 30

Isparta Bölgesinden Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğüne Gönderilen Numunelerin Parazitolojik Açıdan Değerlendirilmesi

The Parasitologic Evaluation of The Samples Sent from Isparta to Veterinerian Control Instution of Konya

Mehmet Acıöz..... 36

Anadolu Mandası Dışkılarından Enterekok Türlerinin İzolasyonu ve Antibiyotik Dirençliliklerinin Tespiti

Isolation of Enterococci Species From Anatolian Buffaloes and Determination of Antibiotic Resistances

Sezen Ak, Timur Gülhan.....40

Efficacy of Gaseous Ozone Against *Paenibacillus Larvae* Spores on Hive Materials

Ozon Gazının Kovan Materyalleri Üzerinde *Paenibacillus Larvae* Sporlarına Karşı Etkinliği

Emrah Torlak, Mehmet Kürşat Işık.....46

An Investigation of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) and Bovine Parainfluenza Type 3 Virus (BPI3V) Infections in Small-Scale Cattle Herds in Afyonkarahisar Province

Afyonkarahisar İlinde Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) ve Bovine Parainfluenza Type 3 Virus (BPI3V) Enfeksiyonlarının Küçük Ölçekli Sığır Sürülerinde Araştırılması

Sibel Gür.....51

Kanatlı Kökenli *Escherichia coli*'lerin Filogruplandırılması

Phylogrouping of *Escherichia coli* Strains Originated From Poultry

Mehmed Omerovic, H. Kaan Müştak.....57

Derleme / Review Article

Liyofilizasyon: Genel Proses Değerlendirmesi

Liyophilization: A General Process Evaulation

Mustafa Sencer Karagül, Buket Altuntaş.....63

Avcı Bakteriler

Predator Bacteria

Mustafa Önol, Hakan Yardımcı.....71

Felide Herpesvirus – 1 Enfeksiyonu

Felide Herpesvirus – 1 (FeHV-1) Infection

Ali Küçük, Yakup Yıldırım.....76

Kuduz Enfeksiyonunun Moleküler Evrimi, Çeşitliliği ve Coğrafik Dağılımı

Molecular Evolution, Diversity and Geographic Distribution of Rabies Infection

Yeşim Tatan, Tuba Çiğdem Oğuzoğlu.....82

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayım Koşulları

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Teşekkür bölümü, gerekli görülüyorsa kaynaklardan hemen önce belirtilmelidir.

Kaynaklar bölümünde, kaynaklar listesi alfabetik ve kronolojik olarak sıralanmalı ve numaralanmalıdır. Metin içerisindeki kaynak, yazar soyadı yazılıp sıra numarası ile; cümle sonunda ise sadece sıra numarası ile **köşeli parantez** içerisinde yazılmalıdır. Cümle sonunda birden çok kaynak belirtilecek ise kaynak numaraları küçükten büyüğe doğru sıralanmalıdır. Metin içerisinde ikiden çok yazarlı kaynak kullanımlarında ilk yazarın soyadı yazılmalı diğer yazarlar ise "ve ark." (İngilizce metinlerde "et al.") kısaltması ile belirtilmelidir. Dergi adlarının kısaltılmasında "Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation" son baskısı esas alınmalıdır. Kaynaklar listesinde yazar(lar)ın aynı yıla ait birden fazla yayını varsa, yayın tarihinin yanına "a" ve "b" şeklinde belirtilmelidir.

Kaynak yazımı ve sıralaması aşağıdaki gibi yapılmalıdır;

Süreli 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 Willey and Sons, p.103.

Editörlü Kitap:

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

Tezler:

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

Anonim:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

14. Dergiye gönderilen yazılar geliş tarihine göre yayımlanır.

15. Yayımlanmayan yazılar, yazarına iade edilmez.

Journal of Etlik Veterinary Microbiology Publication Conditions

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgements must be indicated before references if necessary.

References should be listed alphabetically and chronologically by numbers. In the body of text, reference must be shown by author's surname and list number or only by list number within **square parenthesis**. If there is more than one reference that refers to the same issue, these should be arranged by smallest to biggest reference list numbers at the end of sentence. If the reference is more than two authors, the surname of the first author should be written and other authors should be mentioned with the abbreviation of "et al.". For the abbreviation of journals, the latest edition of the "Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation" should be taken as basis. If the author(s) have more than one publication within the same year, besides the publication date, it should be mentioned as "a" and "b" in the list of references.

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

For articles:

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

For books:

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

For edited books:

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

For chapter in edited books:

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

For congress papers:

Çetindağ M, (1994). *Pronoprymna ventricosa, a new digenic 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*. PhD Thesis, Ankara University Institute of Health Sciences, Ankara.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15. Unpublished papers are not returned to their author.

Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi - Ankara

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

Yayının adı: .....

.....

Yazar/ların ad/ları: .....

.....

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

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

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

Yazışma Adresi: .....

.....

Copyright Release

Journal of Etlik Veterinary Microbiology Ankara - TURKEY

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

Title of paper: .....

.....

Authors names: .....

.....

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

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

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

To be signed by all author/s

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

Correspondence Address: .....

.....

Pilot Çalışma: Manda Sütünde *Toxocara vitulorum* Larva Varlığının Araştırılması

Ali Tümay Gürler[1], Hande Gürler[2]

[1]Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Samsun
[2]Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Samsun

Geliş Tarihi / Received: 08.03.2018, **Kabul Tarihi** / Accepted: 17.04.2018

Özet: *Toxocara vitulorum* buzağı ve malaklara primer galaktojen yolla bulaşan, erginleri incebağırsağa yerleşen, patojen bir nematoddur. Bu pilot çalışmada, manda sütünde parazitin larvaları aranmıştır. Araştırma süresince 40 mandaya ait süt örnekleri kullanılmıştır. Tüm süt örnekleri öncelikle mikroskobik olarak siewing-flotasyon yöntemi ile *Toxocara* sp. larvası bakımından muayene edilmiştir. Daha sonra larvaya rastlanmayan örneklerden rastgele 20 farklı mandaya ait süt örnekleri seçilmiş ve moleküler olarak incelenmiştir. Çalışma sonunda hiçbir süt örneğinde parazitin larvasına ya da DNA'sına rastlanmamıştır. Bu araştırma Türkiye'de manda sütünde *Toxocara vitulorum* larvası taranması yönünde ilk çalışma niteliğinde olmuştur.

Anahtar kelimeler: *Toxocara vitulorum*, larva, manda, süt

A Pilot Study: Investigation of *Toxocara vitulorum* Larvae in Water Buffale Milks

Abstract: *Toxocara vitulorum* is a patogen nematoda which infects calves and buffalo calves lactogenically and grows in the small intestine. In the study, infective larvae of the parasite were investigated in water buffalo milks. Forty water buffalo milks were collected and examined used sieving-flotation method. Then, 20 samples randomly selected were analysed molecularly to find DNA of *T. vitulorum* larvae. In the end of the study, there was no larvae or its' DNA in the milk samples. This is the first study on investigation of *T. vitulorum* larvae in water buffalo milk.

Key words: *Toxocara vitulorum*, larvae, water buffalo, milk

Giriş

Mandacılık, başta manda sütü ve kaymağı olmak üzere, manda eti ve manda boynuzu gibi çeşitli ürünler elde etmek için yapılan, ülkemizde değeri son yıllarda artan bir sektörüdür. TÜİK verilerine göre manda sayısı Türkiye'de son 10 yılda neredeyse iki katına çıkarak 2017 yılında 161.439'a ulaşmıştır [22]. Samsun ili ve çalışmanın yapıldığı Kızılırmak Deltası ise mandacılık faaliyetinin en çok yapıldığı yerlerdendir.

Mandalar çevre şartlarına sığırlara oranla daha dayanıklı hayvanlardır. Gebelik süreleri ise ineklerden uzun olmakla birlikte nehir ve bataklık mandalarında sırayla 305-320 ve 320-340 gün arasındadır [9]. İneklerden farklı olarak veteriner hekime ihtiyaç duymadan doğum yapan mandalar, malaklarının ilk bakımlarını da kendileri üstlenirler. Sonbahar-kış aylarında doğan malaklar annelerinden ayrılmazlar. Yetiştiriciler genellikle yeni doğum yapmış mandaları ilk ay sağmazlar ve malakların annelerini emmelerine izin verirler. İnek yetiştiriciliğinde farklı olan bu uygulama ile hem malaklara oldukça düşkün anne manda yavrusunda ayrılmamış olur, hem de malaklar kolostrumu ile tam olarak beslenmiş olurlar. Kolostrum malakların gelişimleri için oldukça önemli bir besin kaynağı olduğu için bu uygulama gereklidir. Ancak kolostrum anne mandadan yavrusuna geçen *Toxocara vitulorum* için de esas bulaş kaynağıdır [2,6]. Büyük ruminantların en önemli patojen nematodlarından birisi olan parazit ergin hayvanlarda hastalık oluşturmazken, buzağı ve malaklarda önemli patolojik bozukluklara sebep olabilmektedir. Genel olarak sığırlara oranla hastalıklara daha dayanıklı olan mandalar, farklı olarak askaridiosise daha duyarlıdırlar. Hastalığın hem prevalansı hem de patojenitesi mandalarda daha fazladır. Alınan larva sayısı ile doğru orantılı olarak patojenite de artmakta, fazla sayıda parazit malaklarda ölüme neden olabilmektedir [8,12,18,21].

Askaritlerin biyolojik döngüsü konağın yaşına ve enfektif formun alınışına göre farklılık gösterir.

Yazışma adresi / Correspondence: *Ali Tümay Gürler (ORCID: 0000-0001-8092-1245), OMÜ Veteriner Fakültesi, Atakum Kampüsü, 55139, Samsun E-posta: tgurler@omu.edu.tr*

Konak 6 aylıktan küçük ise alınan enfektif formların çoğu bağırsaklarda ergin hale geçerler. Bu durum konağın immun sisteminin gelişmesi ile ters orantılı olarak devam eder. İmmun sistemi gelişmiş olan hayvanlarda ise dışarıdan alınan enfektif formlar gelişme göstermeden kaslarda inhibisyona geçmektedir. Gebelik esnasında ise immun sistemin baskılanması ile birlikte bu larvalar tekrar aktive olurlar. Mandalarda kaslardaki larvaların 5 aydan fazla canlı kaldığı, bu sürenin iki doğum süresince devam edebildiği bilinmektedir. Mandalarda gebeliğin 8. ayından sonra inhibe larvalar aktive olmaya başlarlar. Bunlardan önemli bir kısmı meme bezlerine geçer ve malaklar tarafından alınmayı beklerler. Meme bezlerine larva akışı doğum sonrası yaklaşık bir ay devam eder. Bu sürenin uzayabileceği de bilinmektedir. Malaklar tarafından süt emme sırasında alınan enfektif L_3 viseral göç geçirmeden direkt olarak bağırsaklarda gelişir. Malaklarda da enfeksiyon genel olarak bu şekilde olmaktadır. Yapılan çalışmalarda, plasental yolla fötusa larva geçişmesiyle ya da enfekte yumurtanın oral alınmasıyla malakların enfekte olmadığı bildirilmektedir [2,6].

Canlı hayvanlarda parazitin tanısı dışkı bakısı ile kolaylıkla yapılabilmektedir [7,11]. Ancak parazitin yumurtası malaklarda en erken 3-4 haftalıktan sonra görülmeye başlar, yani ilk ay malaklarda parazitin varlığını dışkı bakısı ile tespit etmek oldukça zordur [6]. Erken tanı için farklı bir tanı yöntemi olarak anne mandanın sütü askarit larvası varlığı bakımından muayene edilebilir. Böylece malağa geçmesi muhtemel askarit larva varlığı erken dönemde tespit edilmiş olur. Dünyada manda sütünde askarit larvası aranmasına yönelik çeşitli çalışmalar bulunmakla birlikte [1,20], bu konu ile ilgili Türkiye'de bir araştırma yapılmamıştır. Mevcut iki araştırma ise inek sütünde yapılmıştır [2].

Bu çalışmada, Türkiye'de ilk olarak manda sütünde *T. vitulorum* larvasının varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

Bu araştırma Samsun iline bağlı Ondokuz Mayıs ve Bafra ilçelerinde, Eylül 2017-Ocak 2018 tarihleri arasında yapılmıştır. Araştırma materyalini PYO. VET.1901.17.010 nolu proje kapsamında toplanan ve 40 farklı mandadan elde edilen süt örekleri oluşturmuştur. Mandaların tümünün süt emen malakları olduğu, bu malakların yaşlarının 15 gün - 75 günlük arasında değiştiği hayvan sahiplerinden elde edilen bilgiler ışığında kaydedilmiştir. Süt örnekleri dört ayrı memeden olacak şekilde ayrı olarak alınmış, çalışma süresince 40 farklı mandadan toplamda 160 süt örneği toplanmıştır.

Öncelikli olarak tüm süt örnekleri mikroskobik olarak *T. vitulorum* larvası bakımından muayene edilmiştir. Bu amaçla her manda için ayrı olacak şekilde el yapımı elekler hazırlanmıştır. Her süt numunesi 40 µm por çaplı bu eleklerden geçirilmiş, elde edilen tortu flat tüp içine yıkanarak aktarılmış, daha sonra invört mikroskop altında larva varlığı bakımından incelenmiştir.

Moleküler analiz amacıyla ise, negatif bulunan örneklerden rastgele olacak şekilde, 20 farklı mandadan alınan süt örnekleri seçilmiştir. Rastgele seçilen flat tüpler 1500 devirde 5 dakika santrifüj edilmiş ve dipteki tortu 1,5 ml'lik ependorflara alınarak incelenmek üzere -20°C'de saklanmıştır.

Saklanan örneklerden genomik DNA ekstraksiyonu için ticari kit (İnvitrogen, PureLink Genomic DNA) kullanılmıştır. Parsiyal ITS1, 5.8S rRNA ve parsiyal ITS2 gen bölgelerinin amplifikasyonu NC5 (5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3') ve NC2 (5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3') primer çifti kullanılarak yapılmıştır. Mastermiks her bir reaksiyon için toplam 24 µl; 2 µl genomik DNA, 1xPCR buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 µM dNTP, 10 µM primer ve 1 U Taq polimeraz olacak şekilde ayarlanmıştır [8,15]. Amplifikasyon koşulları ilk denatürasyon 95°C 10 dk., 40 siklus denatürasyon 95°C 45 sn, bağlanma 55°C 45 sn, uzama 72°C 45 sn ve son uzama 72°C 5 dk şeklinde programlanmıştır. Elektroforez ile PCR ürünleri, görüntülenmek için, agaroz ile hazırlanan jele eklenmiş, elektrik alanda belirli bir süre boyunca boyutlarına ve moleküler ağırlıklarına göre ayrılmıştır. PCR ürünlerini görüntülemek için % 2'lik agaroz jel kullanılmıştır.

Bulgular

İncelemesi yapılan süt örneklerinin hiçbirinde *T. vitulorum* larvasına rastlanmamıştır. Larva negatif örneklerden rastgele seçilerek incelenen süt örneklerinin moleküler analizi sonucunda da parazitin DNA'sı bulunamamıştır.

Tartışma ve Sonuç

Toxocara vitulorum malakların en patojen parazitlerinden birisi olarak kabul edilmekle birlikte, büyük ruminantlarda askaridiosis ile ilgili fazla sayıda çalışma bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde toxocariasis enfeksiyonuna genellikle dışkı bakı yöntemlerinin kullanıldığı [4,5,17,19], bunun yanında yeni doğum yapmış mandalarda sütte parazitin larvasının arandığı çalışmalar da olduğu görülür [1,20). Dünya genelinde enfeksiyon oranı malaklarda dışkı bakısına göre %25,5-34 arasında bildirilmiştir [1,12,17]. Türkiye'den sığırlarda *T. vitulorum*'un bulunduğu, yayılışının %0,5-28,9 arasında değiştiği bilinmektedir [2,4,5,6,13]. Mandalarda da parazitin var olduğu bilinmekle birlikte [14,16], malaklarda, mandalarda ya da manda sütünde parazitin varlığına ilişkin bir çalışma olmadığı görülür. Türkiye'de manda parazitlerine yönelik yapılan tek çalışmada 100 mandanın sindirim sistemi incelenmiş, ancak *T. vitulorum*'a rastlanmadığı kaydedilmiştir [10]. Yapılan bu çalışma Türkiye'de mandalarda sütte *T. vitulorum*'un varlığına yönelik olarak yapılan ilk araştırma niteliğindedir.

Malaklar için esas enfeksiyon kaynağı anne sütündeki *T. vitulorum* larvasıdır. Sütte larva yoğunluğu doğum öncesi 8. günden itibaren başlar, doğum sonrası azalarak devam eder. Sütte larva bulunması esas olarak ilk ay olmakla birlikte, devam eden süreçte de larvaya rastlandığı kaydedilmiştir [6]. Türkiye'de sütte *T. vitulorum* larvası aranmasına yönelik yapılan çalışmalarda, Adanır (2004) incelediği 450 inek süt örneğinden yalnız 1 (%0,2)'inde, Akyol (1991) da incelediği 144 inek sütünün 1'inde larva bulunduğu kaydetmiştir [2,3]. Bizim yaptığımız çalışmada ise incelemesi yapılan 40 manda sütünün hiçbirinde *T. vitulorum* larvası'na rastlanmamıştır. Pozitif örnek bulunmamasında, örnek sayısının azlığı ve süt örneği alınan dişi mandaların doğum sonrası erken dönemde olmaması göz önünde bulundurulmalıdır.

Sonuç olarak, Türkiye mandacılık faaliyetleri açısından uygun bir coğrafyaya sahiptir ve mandacılığa/manda ürünlerinin tüketimine olan ilgi artmaktadır. Ancak manda hastalıklarına yönelik yapılan araştırmalar oldukça yetersizdir. Her ne kadar hiçbir manda sütünde *T. vitulorum* larvası'na tesadüf edilmese de, yapılan bu çalışma ülkemiz için ilk araştırma niteliğinde olması bakımından önem arz etmektedir. Malak yetiştiriciliğinde önemli bir problem olan askaridiosis ile ilgili olarak Türkiye'de benzer ama daha kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır. Her ne kadar bu pilot araştırmada manda sütünde parazitin larvasına rastlanmamış olsa da, malaklarda, mandalarda ve manda sütünde parazitin ne oranlarda var olduğu tespit edilmelidir. Dünyada malaklarda önemli bir problem olduğu bilinen toxocariasis ile ilgili olarak manda yetiştiricileri arasında farkındalık oluşturulmalı ve mandacılıkta düzenli olarak askaridiosisin tanısı, tedavisi ve korunması ile ilgili bir prosedür geliştirilmelidir.

Kaynaklar

1. Abdel-Rahman MAM, El-Ashmawy WR, (2013). Toxocara vitulorum in faeces, serum and milk of buffaloes in Giza Governorate. Int J Live Res. 3, 89-99.
2. Adanır R, (2004). Ankara yöresi sığırlarında Toxocara vitulorum prevalansının saptanması. Doktora Tezi, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
3. Akyol V, (1991). Bursa yöresi sığırlarında Toxocara (Neoascaris) vitulorum'un epidemiyolojisi. Doktora Tezi, Uludağ Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
4. Arslan MÖ, Sarı B, Taşçı GT, Aktaş MS, (2008). Erzurum yöresinde buzağılarda Toxocara vitulourm yaygınlığı. Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 14, 37-40.
5. Avcıoğlu H, Balakaya İ, (2011). Prevalence of Toxocara vitulorum in calves in Erzurum, Turkey. Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 17, 345-347.
6. Aydenizöz M, (2012). Ascaridiosis. Turk Klin J Vet Sci. 3, 103-108.
7. Borgsteede FHM, Holzhauer M, Herder FL, Veldhuis-Wolterbeek EG, Hegeman C, (2012). Toxocara vitulorum in suckling calves in the Netherlands. Vet Parasitol. 92, 254-256.
8. Chelladurai JJ, Bader C, Snobl T, Magstadt D, Cooper V, Brewer MT, (2015). Toxocara vitulorum inefection in a cohort of beef calves in Iowa. Vet Parasitol. 214, 96-99.
9. Çelik HA, Özenç E (2015). Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji. Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A, Köker A. eds. Medipres, s:609.
10. Çetindağ M, Doğanay A, (1996). Samsun yöresi mandalarında sindirim sistemi helmintleri. Etlik Vet Kont Derg. 8, 128-133.
11. Davilla G, Irsik M, Greiner EC, (2010). Toxocara vitulorum in beef calves in North Central Florida. Vet Parasitol. 168, 261-263.
12. Dorny P, Devleesschauwer B, Stoliaroff V, Sothy M, Chea R, Chea B, Sourloing H, Samuth S, Kong S, Nguong K, Sorn S, Holl D, Vercruysse J, (2015). Prevalence and associated risk factors of Toxocara vitulorum infections in

buffalo and cattle calves in three provinces of central cambodia. Korean J Parasitol. 53, 197-200.

13. Kozan E, (2014). Bartın yöresi sığırlarında dışkı bakısı ile tespit edilen helmintler. T Parazitol Derg. 38, 17-21.
14. Merdivenci A, (1971). Neoascaris vitulorum'un evrimi üzerine, Türk Vet Hek Dern Derg. 41, 20-26.
15. Newton LA, Chilton NB, Beveridge I, Hoste H, Nansen P, Gasser RB, (1998). Genetic markers for strongylid nematodes of livestock defined by PCR-based restriction analysis of spacer rDNA. Acta Trop. 69, 1–15.
16. Oytun HŞ, (1961). Genel parazitoloji ve helmintoloji ders kitabı. Üçüncü Baskı. Ankara: Ege Matbaası, p.365.
17. Rast L, Lee S, Nampanya S, Toribio JA, Khounsy S, Windsor PA, (2013). Prevalence and clinical impact of Toxocara vitulorum in cattle and buffalo calves in northern Lao PDR. Trop Anim Health Prod. 45, 539-546.
18. Raut S, Sahu RK, Mahalik A, (2016). Toxocara infestation in a suckling buffalo calf: A case report. Sch J Agric Vet Sci. 3, 123-125.
19. Rizk MA, Osman SA, Al-Gaabary MH, El-Khodery SA, (2018). Comparative clinical and parasitological efficacy of moxidectin pour-on, ivermectin, and piperazine citrate on Toxocara vitulorum infection in buffalo calves (Bubalus bubalis): a randomized clinical trial. Turk J Vet Anim Sci. 42, 29-33.
20. Roberts JA, Fernando ST, Sivanathan S, (1990). Toxocara vitulorum in the milk of buffalo (Bubalis bubalis) cows. Res Vet Sci. 49, 289-291.
21. Van Der Steen L, Pardon B, Sarre C, Valgaeren B, Van Hende D, Vlaminck L, Deprez P, (2014). Intestinal obstruction by Toxocara vitulorum in a calf. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift. 83, 299-305.
22. www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/HAYGEM.pdf

Gökkuşağı Alabalıklarından İzole Edilen Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Hidrofobisite, Safra ve pH Töleranslarının Tespiti

Behire Işıl Didinen[1], Alper Çiftci[2], Esengül Morsümbül[1]

[1]Süleyman Demirel Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği. Anabilim Dalı, Isparta,Türkiye; [2]Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 11.09.2017, **Kabul Tarihi** / Accepted: 11.12.2017

Özet: Bu çalışmada, gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarından izole edilen bakterilerin, *Lactococcus garvieae*'ye karşı in vitro antagonsitik etkileri, hidrofobisiteleri, safra tuzlarına ve düşük pH şartlarına töleransları araştırıldı. Bu amaçla sağlıklı 20 adet gökkuşağı alabalığının (250 g) bağırsaklarından bakterilerilerin izolasyonu yapıldı. İzole edilen 157 adet bakterinin Agar Kuyu Difüzyon yöntemi kullanılarak *L. garvieae'*ya karşı antagonistik aktiviteleri belirlendi. Dört izolat *L. garviea*'ye karşı in vitro antagonistik etki gösterdi. Antagonistik suşların fenotipik özelliklerinin saptanmasında geleneksel testler, API 20 NE ve API 20 STREP test kitleri; moleküler identifiksyon için, *L. garvieae* spesifik PCR ve 16S rRNA gen sekans analizi kullanıldı. Çalışmanın sonucunda, aday probiyotik suşlar, *Aeromonas sobria* (TUB/2013/L63), *Bacillus* sp. (TUB/2013/L97) ve *L.garvieae* (TUB/2013/L32) hidrofobik (bağırsak epitel hücrelerine tutunma kabiliyetinde), safra tuzlarına ve düşük pH şartlarına(balığın sindirim sisteminde hayatta kalma özelliğinde) töleranslı bulundu.

Anahtar kelimeler: *Aeromonas*, *Bacillus, Lactococcus garvieae*, *Oncorhyncus mykiss*, Probiyotik, hidrofobisite, safra ve pH töleransı

Determination of Hydrophobicity, Bile and pH Tolerances of Potential Probiotics Isolated From Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)

Abstract: In this study, bacterial isolates from the intestines of rainbow trout were investigated for in vitro antagonistic effects against *Lactococcus garvieae*, hydrophobicity, bile salts and low pH conditions. For this purpose, bacteria were isolated from the intestines of 20 healthy rainbow trout (250g). Antagonistic activities of 157 bacterial isolates against *L. garvieae* by Agar Well Diffusion method. Four isolates showed antagonistic effect against *L. garviea* in vitro. Phenotypic characteristics of antagonistic strains were determined by conventional tests, API 20 NE and API 20 STREP test kits. For molecular identification, *L. garvieae* specific PCR and 16S rRNA gene sequence analysis were used. As a result of the study, candidate probiotic strains, *Aeromonas sobria* (TUB / 2013 / L63), *Bacillus* sp. (TUB / 2013 / L97) and *L. garvieae* (TUB / 2013 / L32) were found hydrophobic (ability to bind to intestinal epithelial cells), bile salts and low pH conditions (ability of the fish to survive in the digestive system).

Key words: Fish, Probiotic, Hydrophobicity, Bile and pH Tolerances

Giriş

Hemorojik septisemi ile karakterize sistemik bir enfeksiyon olan Laktokokkozis özellikle su sıcaklığının 16°C'nin üzerine çıktığı yaz aylarında etkili olmakta ve gökkuşağı alabalıklarında her boyda (porsiyonluk ve anaçlar dahil) yüksek mortaliteye neden olması sebebiyle balık işletmelerinde büyük ekonomik kayıplar yaratmaktadır [15]. Laktokokkozis ülkemizde ise ilk defa 2001 yılında Ege bölgesindeki gökkuşağı alabalığı işletmelerinde görülmüş ve o tarihten itibaren ülkemizde görülme sıklığı artmıştır [2,11,19]. Su ürünleri yetiştiriciliğinde *Lactococcus garvieae* salgınları antibiyotiklerle tedavi edilmektedir. Bununla birlikte, tedaviler sıklıkla başarısız olmakta ve antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımı antibiyotik direncinin artmasına sebep olmaktadır [24].

Akuakültürde hastalıkların görülme sıklığını azaltmak için, antibiyotik tedavilerine alternatif olarak probiyotiklerin kullanımına ilişkin çalışmalar artmıştır [5]. Potansiyel probiyotik suşlar farklı etki mekanizmaları ve özellikler göstermektediler. Bu etki mekanizmaları ve özellikler arasında pH'yı düşürmek suretiyle patojenlere antagonistik etki gösterme, antibakteriyel maddeler üretme, besinler ve tutunma bölgeleri için rekabet, vitamin ve enzim üretmeleri, kolonizasyon ya da tutunma yetenekleri ve bağışıklık sistemini güçlendirme yer almaktadır [1,12].

Yazışma adresi / Correspondence: *Alper ÇİFTCİ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye E-posta: aciftci@omu.edu.tr*

Probiyotik suşlar, sucul hayvanların kendi mikrofloralarından ya da bulundukları ortamdan izole edilmektedir. Etkili probiyotik bakterilerin keşfedilmesi için, aday probiyotik bakteriler sıklıkla ön eleme işleminden geçirilirler [25]. Bu işlem, öncelikle *in vitro* antagonizm, tutunma ve bağırsak mukusunda gelişme özelliklerinin belirlenmesi ile başlamaktadır [14,26].

Bu çalışmada, gökkuşağı alabalıklarının bağırsak mikroflorasından izole edilen bakterilerin *in vitro* şartlar altında *L. garvieae*'ya karşı antogonistik etkileri, tür düzeyinde teşhisleri, balıkların mide bağırsak kanalında hayatta kalabilme yetenekleri (safra tuzları ve düşük pH şartlarına tolerans) ve bağırsak epitel hücrelerine tutunma özellikleri (hidrofobisite) belirlenmiştir.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada kullanılan 20 adet sağlıklı gökkuşağı alabalığı (ort.250 g) Isparta ili sınırları içerisindeki iki işletmeden temin edildi.

Aday probiyotik bakterilerin fenotipik karakterizasyonları

Tüm antagonistik özellik gösteren suşların ilk olarak koloni morfolojileri belirlendi. Daha sonra gram boyama, hareket, sitokrom oksidaz, katalaz üretimi ve O/F testleri yapıldı. Suşların diğer fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde API 20 Strep ve API 20 NE hızlı teşhis kitleri (bioMe´rieux) kullanıldı.

Aday probiyotik bakterilerin moleküler analizi

L. garvieae spesifik PCR: İzolatların DNA ekstraksiyonları prensibi spin kolon ile filtrasyon sistemine dayanan ticari DNA ekstraksiyon kiti (Thermo Scientific, GeneJET Genomic DNA Purifikasyon Kiti) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı. *L. garvieae*'nın moleküler identifikasyonu tür spesifik pLG-1 (5'-CATAACAATGAGAATCGC-3') ve pLG-2 (5'-GCACCCTCGCGGGTTG-3') oligonukleotid primer setinin kullanıldığı PCR metodu ile gerçekleştirildi [27]. Bu amaçla PCR amplifikasyonunda DEPC'li su, 1xPCR solüsyonu, 1.5mM $MgCl_2$, herbir dNTP'den 0.2 mM, 1.0 U Taq polimeraz (Fermentas), 1µM her bir primer ve 5 µl hedef DNA içeren 25 µl'lik PCR karışımı oluşturuldu. Oluşturulan bu karışım Thermo PxE termal çevirici (Thermo Scientific) içerisinde 94°C'de 3 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 1 dk denatürasyon, 55°C'de 1 dk primer bağlanması, 72°C'de 1.5 dk uzama olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 10 dk sonuzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. PCR amplifikasyonu sonrası oluşan ürünler etidium bromid (2mg/ml) içeren % 1,5'luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Sonuçta *L. garvieae* spesifik 1100 bp'lik amplifikasyon ürününün görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi. PCR çalışmasında pozitif kontrol olarak *L. garvieae* ATCC 43921 suşu, negatif kontrol olarak ta distile su kullanıldı.

16S rRNA sekans analizi: *L. garvieae* spesifik PCR ile identifiye edilemeyen izolatların 16S rRNA gen bölgesinin sekans analizi Macrogen (Seoul, Kore) firmasının 16S rRNA tam sekanslama servisi tarafından Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer kullanılarak gerçekleştirildi. Özetle, izolatlara ait 16S rRNA gen bölgesi 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) ve 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) üniversal primerlerinin kullanılarak PCR ile amplifiye edildi. PCR ürünü saflaştırıldıktan sonra 785F (GGATTAGATACCCTGGTA) ve 907R (CCGTCAATTCMTTTRAGTTT) primerleri kullanılarak sekans analizi gerçekleştirildi. Elde edilen sekans dizgileri Genbank kütüphanesinde bulunan referans sekanslar ile Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) kullanılarak karşılaştırıldı.

Potansiyel Probiyotik Bakterilerin İzolasyonu ve *L. garvieae*'ya Karşı *in vitro* Antagonistik Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmada *L. garvieae*'ya karşı antagonistik etki gösteren aday probiyotik bakterilerin seçimi yapıldı. Bu amaçla antagonistik etki gösterebilecek aday probiyotik bakterilerilerin izolasyonu sağlıklı 20 adet gökkuşağı alabalıkların (ort. 250g) bağırsaklarından yapıldı. Bunun için bağırsaklar steril şartlar altında kesilip Steril Peptonlu Su ile homojenize edildikten sonra seri dilüsyonları(10^{-1}-10^{-8}) hazırlandı ve Triptik Soy Agar (TSA)'a ekimler yapılarak, 22°C'de 48 saat inkübe edildi [6]. Balıkların bağırsak mikroflorasından izole edilen bakterilerin *L. garvieae'*ya karşı antagonistik etkilerinin araştırılmasında Agar Kuyu Difüzyon yöntemi kullanıldı [13].

Hidrofobisite Testi

Aday probiyotik bakterilerin hidrofobisitelerini belirlemek için %0.03 Kongo Kırmızısı (Sigma-Aldrich) karıştırılmış TSA hazırlandı. Kongo kırmızısı TSA'nın sterilizasyonundan sonra eklendi. Aday probiyotik bakteriler Kongo kırmızısı ilave edilen TSA'ya ekildi ve 25°C' de 24 saat inkübe edildi. Kırmızı koloniler pozitif (hidrofobik) ve beyaz veya renksiz koloniler ise negatif (non-hidrofobik) olarak değerlendirildi [23].

Safra tuzlarına ve düşük pH şartlarına tolerans Testleri

Aday probiyotik bakterilerin PBS içerisindeki süspansiyonları 10^7 kob/ml olarak hazırlandı. Gökkuşağı alabalıklarından safra kesesinin patlatılmasıyla safra örnekleri toplandı ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı. Bakteriyel süspansiyon, %0, 0.6, 1 ve 1.5 safra içeren PBS içerisine inoküle edildi. Örnekler 22°C'de 1.5 saat inkübe edildikten sonra steril PBS içinde seyreltilerek, TSA'da bakteri sayımı yapıldı. Aday probiyotik bakterilerin farklı pH şartlarına töleransının belirlenmesi için farklı pH değerlerine (pH 2-7) sahip PBS içerisinde 10^7 kob/ml olarak hazırlanan süspansiyonları 22°C'de 1.5 saat inkübe edildikten sonra steril PBS içinde seyreltilerek TSA'da bakteri sayımı yapıldı [4,20].

İstatistiksel hesaplamalar

Elde edilen veriler (bakterilerin safra ve pH toleransları) SPSS 17.0 paket programında Anova testi ile değerlendirildi (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Parametrelerin önem dereceleri karşılaştırılırken Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanıldı ve önem düzeyi P=0,05 olarak seçildi.

Bulgular

Aday Probiyotik Bakterilerin Fenotipik Karakterizasyonları

L. garvieae' ya karşı inhibitör aktivite gösteren bakterilerin geleneksel metotlarla, API 20 Strep ve API 20 NE hızlı teşhis kitleriyle belirlenen belirlenen fenotipik özellikleri Tablo 1 ve Tablo 2'te verilmiştir.

Aday Probiyotik Bakterilerin Moleküler Analizi

L. garvieae spesifik PCR analizi sonucu TUB/2013/L32 ve TUB/2013/L95 no'lu izolatların *L. garvieae* spesifik 1100 bp amplifikasyon ürünü verdiği, TUB/2013/L63 ve TUB/2013/L97 no'lu izolatların ise herhangi bir amplifikasyon ürünü vermediği saptandı (Şekil 4.3.). Dolayısıyla TUB/2013/L32 ve TUB/2013/L95 no'lu izolatlar *L. garvieae* olarak identifiye edildi. TUB/2013/L63 ve TUB/2013/L97no'lu izolatlar için sonraki aşamada gerçekleştirilen 16S rRNA gen bölgesi sekans analizi sonucu sırasıyla 1481 ve 590 bp uzunluğunda sekans dizileri elde edildi ve bu diziler GenBank'a (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) KT456272 ve KT456273 erişim numaraları ile kaydedildi. Elde edilen morfolojik, biyokimyasal ve sekans verilerine dayanılarak TUB/2013/L63 no'lu izolat *A. sobria*, TUB/2013/L97no'lu izolat ise *Bacillus* sp. olarak identifiye edildi.

Tablo 1. *L. garvieae*'ya karşı inhibitör aktivite gösteren Gram Pozitif Kokların geleneksel metotlarla ve API 20 STREP ile belirlenen fenotipik özellikleri

	TUB/2013/L32	**TUB/2013/L95**
Gram boyama	Pozitif kok	Pozitif kok
Hareket	-	-
Oksidaz	-	-
Katalaz	-	-
O/F Testi	F	F
VP	+	+
Hippurat hidrolizi	-	-
Eskulin hidrolizi	+	+
Piyrrolidonil arylamidaz	+	+
α-Galaktosidaz	-	-
β-Glukuronidaz	-	-
β-Galaktosidaz	-	-
Alkalin fosfataz	-	-
Lösin arilamidaz	+	+
Arjinin dihidrolaz	+	+
Asit üretimi:		
Riboz	+	+
L-Arabinoz	-	-
Mannitol	-	-
Sorbitol	-	-
Laktoz	-	-
Trehaloz	+	+
İnülin	-	-
Rafinoz	-	-
Nişasta	+	+
Glikojen	-	-

Tablo 2. *L. garvieae*'ya karşı inhibitör aktivite gösteren diğer izolatların geleneksel metotlarla ve API 20 NE ile belirlenen fenotipik özellikleri

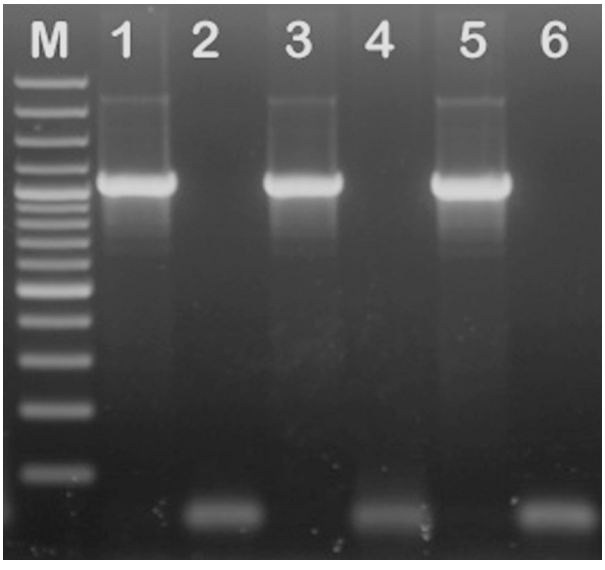
	TUB/2013/L63	TUB/2013/L97
Gram boyama	**Negatif basil**	**Pozitif basil**
Hareket	+	-
Oksidaz	+	-
Katalaz	+	+
O/F Testi	F	Glikozu kullanmıyor
Nitrate indirgeme	+	-
İndol üretimi	+	-
Glikoz asidifikasyon	+	-
Arjinin dihidrolaz	+	+
Üre hidrolizi	-	-
Eskülin hidrolizi	+	+
Jelatin hidrolizi	+	-
β- galaktosidaz	+	+
Glikoz asimilasyonu	+	-
Arabinoz asimilasyonu	+	-
Mannoz asimilasyonu	+	-
Mannitol asimilasyonu	+	-
N-Acetyl Glusomine	+	-
Maltose Glusomine asimilasyonu	+	-
Gluconate Glusomine similasyonu	+	+
Caprate Glusomine asimilasyonu	-	-
Adipate Glusomine asimilasyonu	-	-
Malate Glusomine asimilasyonu	+	-
Citrate Glusomine asimilasyonu	+	-
Phenyl acetate Glusomine asimilasyonu	-	-

Potansiyel Probiyotik Bakterilerin *L. garvieae*'ya Karşı *in vitro* Antagonistik Etkisinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarından izole edilen 157 suştan 4'ünün *L. garvieae*'ya karşı *in vitro* antagonistik etki gösterdikleri saptandı (Tablo 3).

Potansiyel Probiyotik Bakteri Suşlarının Hidrofobisite, pH ve Safra Töleransları

L. garvieae (TUB/2013/L95) hariç, diğer antagonistik suşların hidrofobik özellikte, başka bir deyişle non spesifik olarak konakçının bağırsak epiteline tutunma kabiliyetlerinin oldukları belirlenmiştir. Antagonistik suşların tamamı, düşük pH şartlarına ve safra tuzlarına dirençli bulunmuşlardır (Tablo 4 ve Tablo 5) ($p>0.05$).



Şekil 1. *L. garvieae* spesifik PCR (1100 bp). M; Moleküler Belirteç (100 bp Plus DNA Ladder), 1; *L. garvieae* ATCC 43921, 2; Negatif Kontrol (Distile su), 3; TUB/2013/L32, 4; TUB/2013/L63, 5; TUB/2013/L95, 6; TUB/2013/L97

Tablo 3. *L. garvieae'*ya karşı inhibitör aktivite gösteren bakteriyel izolatlar

İzolatlar	İnhibisyon zonu (mm)
TUB/2013/L32	16
TUB/2013/L95	8
TUB/2013/L97	8
TUB/2013/L63	8

Tablo 4. Farklı pH şartlarında aday probiyotik suşların toleransı (log kob/ml, SD*)

pH	*L. garvieae* TUB/2013/L32	*L. garvieae* TUB/2013/L95	*Bacillus* sp. TUB/2013/L97	*A.sobria* TUB/2013/L63
7	7,59±0,65	7,58±0,26	7,39±0,45	7,63±0,56
3	7,76±0,47	7,8±0,40	7,65±0,28	7,79±0,49
2	7,82±0,34	7,86±0,65	7,14±0,67	7,61±0,59

* Bakteri sayıları TSA'da belirlendi. Veriler ortalama (standart sapmalar) olarak verilmiştir.

Tablo 5. Farklı safra konsantrasyonlarına aday probiyotik suşlarının toleransı (log kob/ml, SD*)

% Safra	*L. garvieae* TUB/2013/L32	*L. garvieae* TUB/2013/L95	*Bacillus sp.* TUB/2013/L97	*A.sobria* TUB/2013/L63
0	6,90±0,54	6,97±0,56	5,73±0,84	6,52±0,58
0.6	6,54±0,50	7,03±0,48	6,55±0,40	7,20±0,95
1	6,14±0,31	7,02±0,52	7,05±0,73	7,05±0,44
1.5	6,55±0,66	7,27±0,47	5,76±0,23	7,24±0,84

* Bakteri sayıları TSA'da belirlendi. Veriler ortalama (standart sapmalar) olarak verilmiştir.

Tartışma

Patojen oldukları bilinen *Vibrio* spp., *A. sobria* ve *A. hydrophila* gibi bakterilerin apatojen suşları balık ve karides kültüründe probiyotik bakteri olarak kullanılmaktadır [7,14,17]. Sazan balıklarının (*Cyprinus* sp.) sindirim sisiteminden izole edilen *A. sobria* GC2 suşunun *A.salmonicida*, *L.garvieae*, *S.iniae*, *V.anguillarum*, *V.ordalii* ve *Y.ruckeri*'ye karşı antagonistik etkileri saptanmıştır [7]. Bir çalışmada, ergin gökkuşağı alabalıklarının yetiştiricilik sularından izole edilen *Vibrio* sp. A3 ve A8 suşları ile *Aeromonas* sp. A1, A5 ve G1 suşlarının *L. garvieae*'ya karşı antagonistik etkisi olduğu rapor edilmiştir [9]. Benzer şekilde, bu çalışmada gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarından izole edilen *A. sobria* (TUB/2013/L63) suşunun *L. garvieae*'ya karşı antagonistik etki gösterdiği saptanmıştır.

Çalışmamızda potansiyel probiyotik *L. garvieae* suşlarının, patojen *L. garvieae*'ye karşı antagonistik etkisi saptanmıştır. Benzer şekilde, daha önce yapılan çalışmalarda, gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarından [10] ve yetiştiricilik suyundan [9] izole edilen *L. garvieae* suşlarının, patojen *L. garvieae*'yi inhibe edici özellik gösterdikleri belirtilmektedir.

Brunt ve ark. [7] gökkuşağı alabalıklarının sindirim sisteminden izole ettikleri *Bacillus* sp.'nin *L. garvieae* ve *Streptococcus iniae*'ye karşı etki antagonistik gösterdiklerini bildirmişlerdir. Benzer şekilde, çalışmamızda *Bacillus* sp. (TUB/2013/L97)'nin *L. garvieae*'ya karşı antagonistik etkisi saptanmıştır.

Bağırsak epitel hücrelerine tutunma kabiliyeti (konakçıya kolonizasyon), potansiyel probiyotik suşlar için önemli bir özelliktir. Pozitif hidrofobisite sonuçları bakterilerin bağırsak epitel hücrelerine tutunma kabiliyetlerinin olduğunu göstermektedir [3,21]. Bu çalışmada da, izole edilen *L.garvieae* (TUB/2013/L95) suşunun hidrofobisite göstermediği; diğer üç suşun (*L. garvieae* TUB/2013/L32, *Bacillus* sp. TUB/2013/L97 ve *A.Sobria* TUB/2013/L63) hidrofobik özellikte oldukları saptanmıştır. Benzer şekilde, gökkuşağı alabalıklarının yetiştiricilik sularından izole edilen *L. garvieae* ve *Aeomonas* spp. [9], hint sazanlarının (*Labeo rohita*) bağırsaklarından izole edilen *Bacillus infantis*'in [8] hidrofobik özellikte oldukları bildirilmiştir.

Yüksek ölçüde hidrofobik özelliğe sahip suşlar asite ve safraya dirençli olmaları nedeniyle mide bağırsak boşluğu boyunca daha çok hayatta kalma kabiliyetine sahiptirler ve potansiyel olarak balığın bağırsak yüzeyine kolonize olabilmektedirler [18]. Probiyotik suş seçiminde kullanılan safra konsantrasyonları için araştırıcılar arasında bir fikir birliği sağlanamamıştır. Bazı araştırmacılar %10 safra konsatrasyonuna kadar toleransın tespit edilmesini önerirken [18], diğer bir kısmı %1'e kadar toleransın tespitinin yeterli olduğu görüşünü bildirmişlerdir [20]. Öyle ki, Balcázar ve ark. [4], salmonid balıklarda bağırsaktaki fizyolojik safra konsantrasyonunun %0.4-1.3 arasında hesapladığını bildirmişlerdir. Bu nedenle, çalışmamızda aday probiyotik bakterilerin % 0.6, 1 ve 1.5 safra konsatrasyonlarına toleransları araştırılmış ve antagonistik etki gösteren suşların tamamının safra tuzlarına tolerenslı oldukları saptanmıştır. Dharmaraj ve Rajendren [8], hint sazanlarının (*Labeo rohita*) bağırsaklarından izole etikleri *Bacillus infantis*'in %2.5 safra konsatrasyonunda 3 saat sonra %63.33'ünün hayatta kalabildiğini belirtmişlerdir. Benzer şeklide, Sansawat ve Thirabunyanon [22], tatlı su karideslerinin (*Macrobrachium rosenbergii*) mide-bağırsak kanallarından izole ettikleri *B.subtilis* P33 ve72 suşlarının % 0.3 safra konsatrasyonunda 24 saat süreyle hayatta kalabildiklerini belirtmişlerdir. Ayrıca, Didinen ve ark. [10], gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarından izole ettikleri *L. garvieae* 1-3 suşunun %2.5-10 safra konsatrasyonlarına tölerans gösterdiğini bildirmişlerdir.

Gökkuşağı alabalıklarının mide pH'larının 2.5-3.5 olduğu bildirilmiştir [16]. Bu nedenle aday probiyotik suşların bu aralıklardaki pH değerlerine toleranslı olması mideden geçişleri esnasında hayatta kalmalarını sağlayacağı düşünülmüştür. Bu

çalışmada aday probiyotik suşların tamamının 2-3 pH şartlarında hayatta kalabildikleri saptandı. Dharmaraj ve Rajendren [8] de, hint sazanlarının (*Labeo rohita*) bağırsaklarından izole etikleri *B.infantis*'in 2 pH'da hayatta kalabildiğini bildirmişlerdir. Sansawat ve Thirabunyanon [22], tatlı su karideslerinin (*Macrobrachium rosenbergii*) mide-bağırsak boşluklarından izole edilen *B.subtilis* P33 and 72 suşlarının pH 2.5'da 3 saat süreyle hayatta kalabildiklerini belirtmişlerdir. Didinen ve ark. [10] aday probiyotik *L. garvieae* 1-3 suşunun 2.5 pH şartlarında hayatta kalabildiğini belirtmişlerdir.

Sonuç olarak, bu çalışmada gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarından izole edilen *L.garvieae* (TUB/2013/L32), *L. garvieae* (TUB/2013/L95), *Bacillus* sp. (TUB/2013/L97) ve *A.sobria* (TUB/2013/L63) suşlarının *L. garvieae*'ya karşı inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır. Antagonistik suşlar arasında *L.garvieae* (TUB/2013/L95) hidrofobisite göstermemiştir. Diğer şuşlar in vitro şartlarda probiyotik (hidrofobik, yüksek safra ve düşük pH şartlarına dirençli olma) özellik göstermişlerdir. Gelecekteki çalışmalarda bu aday probiyotiklerin gökkuşağı alabalıklarında patojeniteleri belirlendikten sonra, balıkların yemlerine ilave edilerek *L. garvieae*'ye karşı hastalık direnci üzerindeki etkileri araştırılacaktır.

KAYNAKLAR

1. Aguirre-Guzmán G, Lara-Flores M, Sánchez-Martínez JG, Campa-Córdova AI, Luna-González A, (2012). The use of probiotics in aquatic organisms: A review. Afr J Microbiol Res. 6(23), 4845–4857.
2. Altun S, Diler O, Adiloglu AK, (2004). Genotyping of Lactococcus garvieae strains from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) by 16S rDNA sequencing. Bull Europ Assoc Fish Pathol. 24(2), 119–125.
3. An Y, Friedman RJ, (2000). Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications, Totowa, New Jersey, Humana Press.
4. Balcázar JL, Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Cunningham D, Vendrell D, Muzquiz JL, (2006). The role of probiotics in aquaculture. Vet Microbiol. 114, 173–186.
5. Balcázar JL, Vendrell D, De Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Gironés O, Múzquiz JL, (2007). In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. Vet Microbiol.122, 373–380.
6. Balcázar JL, Vendrell D, De Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Mu´zquiz JL, Girone´s O, (2008). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture 278,188–191.
7. Brunt J, Newaj-Fyzul A, Austin B, (2007). The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). J Fish Dis. 30, 573–579.
8. Dharmaraj R, Rajendren V, (2014). Probiotic assessment of Bacillus infantis isolated from gastrointestinal tract of Labeo rohita. Int J Sci Res Pub. 4(7), 1–6.
9. Didinen BI, Metin S, Onuk EE, Takmaz H, Ersoy AT, (2014). Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from Rainbow Trout Oncorhynchus mykiss (Walbaum) rearing units against bacterial pathogens. Isr J Aquacult. 66, 1–8.
10. Didinen BI, Onuk EE, Metin S, Cayli O, (2018). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum 1792), with inhibitory activity against Vagococcus salmoninarum and Lactococcus garvieae. Aquaculture Nut. 24 (1), 400–407.
11. Diler Ö, Altun S, Adiloğlu AK, Kubilay A, Işıklı BI, (2002). First occurrence of Streptococcosis affecting farmed Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) in Turkey. Bull Eur Ass Fish Pathol. 22(1), 21–26.
12. Ganguly S, Paul I, Mukhopadhayay SK, (2010). Application and effectiveness of immunostimulants, probiotics, and prebiotics in Aquaculture, A Review. Isr J Aquacult. 62(3), 130–138.
13. Hjelm M, Bergh O, Riaza A, Nielsen J, Melcheiorsen J, Jensen S, Duncan H, Ahrens P, Birkbeck H, Gram L, (2004). Selection and identification of autochthonous candidate probiotic bacteria from Turbot larvae (Scophthalmus maximus) rearing units system. Appl Microbiol. 27, 360–371.
14. Irianto A, Austin B, (2002). Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). J Fish Dis. 25, 333–342.
15. Kusuda R, Salati F, (1999). Enterococcus seriolicida and Streptococcus iniae. In "Fish Diseases and Disorders" Vol, 3, Viral, Bacterial and Fungal Infections (Woo and Bruno, Eds.), CABI Publishing, pp. 303–312.
16. Lavelle EC, Haris JE, (1997). The processing of an orally administered protein antigen in the digestive tract of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Compar Biochem Physiol A. 117, 263–275.
17. Mujeeb RKM, Jesmi Y, Thomas AP, Mohamed HAA, (2010). Probiotic effect of Bacillus NL110 and Vibrio NE17 on the survival, growth performance and immune response of Macrobrachium rosenbergii (de Man). Aquacult Res. 41, 120–134.
18. Nikoskelainen S, Salminen S, Bylund G, Ouwehand A, (2001). Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. Appl Environ Microbiol. 67, 2430–2435.
19. Öztürk T, Didinen BI, Doğan G, Özer A, Bircan R, (2013). Lactococcosis in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum, 1792) in the Middle Black Sea Region in Turkey and antimicrobial susceptibility of the aetiological agent, Lactococcus garvieae. Etlik Vet Mikrobiyol Derg. 24, 7–12.

20. Perez-Sanchez T, Balcazar JL, Garcia Y, Halaihel N, Vendrell D, De Blas I, Merrifield DL, Ruiz-Zarzuela I, (2011). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum) with inhibitory activity against Lactococcus garvieae. J Fish Dis. 34, 499–507.

21. Rinkinen M, (2004). Methods for assessing the adhesion of probiotic and canine gut-derived lactic acid producing bacteria to the canine intestinal mucosa in vitro and measuring mucosal secretory IgA, Academic dissertation. PhD Thesis, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland.

22. Sansawat A, Thirabunyanon M, (2009). Anti-Aeromonas hydrophila activity and characterisation of novel probiotic strains of Bacillus subtilis isolated from the gastrointestinal tract of giant freshwater prawns. Maejo Int J Sci Technol. 3(1), 77–87.

23. Sharma KK, Soni SS, Meharchandani S, (2006). Congo red dye agar test as an indicator test for detection of invasive bovine Escherichia coli. Vet Arhiv. 76, 363–366.

24. Vendrell D, Balca´zar JL, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Girone´s O, Mu´zquiz L, (2006). Lactococcus garvieae in fish: a review. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 29, 177–198.

25. Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W, (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol Mol Biol Rev. 64, 655–671.

26. Vine NG, Leukes WD, Kaiser H, Daya S, Baxter J, Hecht T, (2004). Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. J Fish Dis. 27, 319–326.

27. Zlotkin A, Eldar A, Ghittino C, Bercovier H, (1998). Identification of Lactococcus garvieae by PCR. J Clin Microbiol. 36, 983–985.

Etlik Vet Mikrobiyol Derg, 2018; **29 (1):** 12-18 **Araştırma Makalesi** / Research Article

Koyun Kırkımı Sırasında İnsanlara Bulaşabilecek Bakteriler ve Antibiyotik Dirençlilik Profillerinin Belirlenmesi

Mustafa Barış Akgül[1], Gülşah Akgül[2], Özge Yılmaz[3], Serpil Kahya Demirbilek[3], Nihat Şındak[1], Ali Günaydın[1]

[1]Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi ABD, Siirt, Türkiye
[2] Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları ABD, Siirt, Türkiye
[3] Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD, Bursa, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 16.10.2017, **Kabul Tarihi** / Accepted: 01.02.2018

Özet: Bu çalışmada, koyun kırkımı sırasında insanlara bulaşabilecek bakteriler ve bu bakterilerin antibiyotik dirençlilik profilleri araştırıldı. Koyun kırkımı, koyunlarda yılın belirli dönemlerinde yapılması gereken rutin işlemdir. Kırkım sırasında kırkımı yapan personele birçok etken bulaşabilmektedir. Kırkım yapan kişinin vücudunda yara vb. açıklıklar varsa bu etkenler daha kolaylıkla bulaşma fırsatı bulmakta ve eğer bu etkenlerin antibiyotik dirençlilikleri de mevcut ise tedavisi güç hastalıklara yol açabilmektedirler. Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS), daha önceden apatojen olarak kabul edilmelerine rağmen, yapılan çalışmalarla dirençlilik profilleri ve patojenitelerinin zarar verici boyutta olduğunun farkına varılmış etkenlerdir. Çalışmada, kırkım personelinin elleri, yüzü ve kırkım yapılan makastan svap örnekleri alınarak, kültürleri ve Kirby-Bauer disk diffuzyon yöntemine göre antibiyogramları yapıldı. Başlıca KNS ve bazı streptokok cinsi bakteriler izole ve identifiye edildi. İzole edilen 54 adet bakteri izolatında test edilen 26 antibiyotikten 20 tanesine karşı direnç tespit edildi, çoklu direnç yönünden ise 54 izolattan 5'i en az 4, 1'i en çok 9 adet antibiyotiğe karşı dirençli bulundu. Sonuç olarak, koyun kırkımı sırasında insanlara bulaşabilecek bakteriler içinde bulunan, zoonoz ve dirençlilik profilleri belirlenmiş olan bu bakterilerin, insan sağlığını tehdit edebileceği görüldü ve hayvanlara yapılacak tüm müdahalelerin kurallı ve kontrollü biçimde yapılmasının gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik dirençliliği, koyun kırkımı, Stafilokok, insan sağlığı

The Determination of Antibiotic Resistance Profiles and Bacteria Infected Humans During The Sheep Shearing

Abstract: In this study, bacteria infected the humans during the sheep shearing and their antibiotic resistance was investigated. Shearing season is routine process must be done in sheep at times of year. During shearing, several microorganisms can infect the operator. If the operator has wound, bacteria can more easily infect this person. Also, if these bacteria have resistance to the antibiotics, they can lead to diseases that are difficult to treat. Coagulase negative *Staphylococci* (CNS) are in despite of accepted as non-pathogenic previously, studies about CNS realized that, they are pathogenic and resistant to antibiotic. In this study, swap samples taken from shearing person's hand, face and scissors were cultured and Kirby-Bauer disc diffusion antibiotic susceptibility tests were also performed. Mainly CNS and some *Streptococcus* genus bacteria were isolated and identified and also resistance profiles of these bacteria were investigated. Identified 54 bacteria were resistant to 20 of 26 antibiotics. If multi-resistance can be evaluated, 5 isolate were found resistant to minimum 4 antibiotics, one isolate was found resistant to 9 antibiotics. As a result, it has been seen that these bacteria which have zoonotic and resistance potentials that can be transmitted to humans during sheep shearing, can threaten human health. It was concluded that all the interventions to be done to animals were to be done in a regular and controlled manner.

Key words: Antibiotic resistance, sheep shearing, *Staphylococcus*, human health

Giriş

İnsanoğlunun en eski üretim faaliyetlerinden olan hayvancılık içerisinde önemli bir yer tutan koyun yetiştiriciliği, ülkelerin; coğrafi durumları, iklimleri, geleneksel üretim aktiviteleri, kültürel yapı ve endüstrilerine, yetiştirilen ırkların verim yönüne ve miktarına göre farklılıklar göstermektedir [36]. İlk insan topluluklarından bugüne kadar koyunlar sürekli insanın yanı başında bulunmuştur. Binlerce yıldan beri sütü, eti, yapağısı, derisi, gübresi ve postu ile insanların en önemli gereksinimlerini karşılayan koyunlar, 21. yüzyıl insanlarının hayatında da büyük rol oynamakta olan hayvanlardır [22].

Yazışma adresi / Correspondence: *Serpil Kahya Demirbilek, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD, Bursa, Türkiye, E-posta: serpilkahya@uludag.edu.tr*

Koyunculukta kırkım işlemi, dünyada yaygın olarak yılda 1 defa yapılmakla birlikte çok sıcak iklime sahip bölgelerde sıcaklık stresini azaltmak için yılda 2 defa yapılır. Çoğu ülkede yapağı kalitesini arttırmak amacıyla ilkbahar ve sonbahar aylarında yılda 2 defa bu işlem gerçekleştirilmektedir. Ekstrem şartlarda bu işlem sıcaklık stresi ve yapağı kalitesi göz önünde bulundurularak yılda 3 hatta 4 defa gerçekleştirilebilmektedir [2, 7].

Zoonoz hastalıklar hayvanlardan insanlara bulaşan hastalıklar olarak tanımlanırlar [32]. Halk sağlığını tehdit eden zoonozlar, önem verilmesi gereken hastalıklardır [30]. Zoonoz hastalıklar etiyolojilerine göre bakteriyel, viral, riketsiyal, helmintik, protozoal, artrapodik ve fungal zoonozlar olmak üzere 7 sınıfa ayrılmaktadırlar [12].

Sağlıklı insan vücudunda, kişiye zarar vermeden denge içinde yaşayan mikroorganizma toplulukları, normal mikrobiyal florayı oluşturur. Normal insan derisi bölgelere göre farklı oranda aerobik mikroorganizma barındırır. Normal flora, kalıcı ve geçici flora olmak üzere iki gruba ayrılır. Kalıcı flora, belirli bölgelerde ve belirli yaşlarda genellikle değişmeyen, kısa süreli ortamdan kaldırılırsa bile yeniden oluşabilen, genellikle sabit kabul edilen, süreklilik gösteren mikroorganizma topluluğudur. Geçici flora ise; çoğu hastalık oluşturmayan, bazen patojen olabilen ve belirli vücut bölgelerinde birkaç saatten birkaç haftaya kadar değişebilen sürelerde kalan mikroorganizma topluluğudur. Kalıcı flora üyeleri ortadan kaldırıldığında, geçici flora mikroorganizmaları kolonize olur, çoğalır ve hastalık yapıcı özellik kazanabilirler.

Geçici olarak yerleşen mikroorganizmalar kontamine araç ve gereçlerden insan eline bulaşarak derinin yüzey kısmına yerleşirler. *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*, Gram-negatif basiller geçici mikroorganizmalardandır. *Propionibacterium*'lar, *Corynebacterium*'lar gibi koagülaz-negatif stafilokoklar ise derinin üst tabakasında yerleşen ve daimi florayı oluşturan kalıcı mikroorganizmalardır [11].

Stafilokoklar insan ve hayvanların deri ve muköz membranlarında daimi ya da geçici flora olarak da bulunabilen, aynı zamanda bazı türleri patojen olan bakterilerdir. Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) ve koagülaz pozitif stafilokoklar (KPS) olarak ikiye ayrılırlar, ama ikisi de ciddi hayvan ve insan enfeksiyonlarına neden olan ve aynı zamanda antibiyotik direnci de bulunabilen bakterilerdir [16]. Streptokoklar da, stafilokoklar kadar önemli olan, yine hem normal florada bulunabilen, hem de fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilen bakterilerdir [6].

Bu çalışmanın amacı; koyunlarda kırkım işlemi öncesi ve sonrasında; kırkım makasında, personelin el ve burun bölgesinde bulunan bakteriyel floranın saptanmasıdır. Örnek alınan bölgelerin, kırkım işlemi sonunda hangi bakterilerle kontamine olduğu, bu kontamine bakterilerin zoonotik özellikleri ve dirençlilik profillerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmanın hayvan materyalini Siirt Üniversitesi Keçi Araştırma ve Uygulama Merkezi (KEÇİMER)'nde 1-1.5 yaş arasında, aynı bakım ve beslenme koşulları altında barındırılan, toplam 10 adet Romanov ırkı koyun oluşturdu. Kırkım yapacak personel, işlem öncesinde el yıkama işlemi gerçekleştirmedi, herhangi bir hayvanla teması olmadı ve gün içerisinde başka kırkım yapmadı. Kırkım makası daha önceden herhangi bir kırkım işleminde kullanılmamış olup yeni alındı ve kırkım öncesinde herhangi bir hayvana temas ettirilmedi. Kırkım esnasında makas değiştirilmedi.

Örneklerin alınması

Her bir numune için ayrı ayrı steril svap kullanılarak sırasıyla makasın keskin kenarlarının tamamına, kırkımı yapacak personelin sağ el içi, parmaklarına, burun bölgesi ve ön iç kısmına sürülerek kırkım öncesinde ilk örnekler alındı. Her kırkım işlemi tamamlandıktan sonra aynı şekilde örneklemeler gerçekleştirildi. Kırkım öncesi 3 örnek, kırkım işlemi sırasında 30 örnek ve toplamda 33 örnek alındı. Alınan örnekler Stuart-transport medium (BD, Heildelberg, Germany) ile soğuk zincir altında 20 saat içerisinde Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na gönderildi.

Kültür

Laboratuvarda, %5 koyun kanlı agara (BD, Heildelberg, Germany) ekim yapılarak 37°C'de 20 saat aerobik atmosferde inkübe edildi. 20 saat sonunda çok yoğun olarak ürediği görülen örneklerdeki koloniler

tek tek incelenerek, farklı morfolojiye sahip koloniler, kanlı agarda tekrar tek koloni pasajı yapılarak 20 saat 37°C'de inkübe edildi. Bu pasaj sonrası tekrar karışık üreme gösteren kolonilere tek koloni pasaj işlemi bir kez daha uygulandı.

Elde edilen saf kolonilerden 1-2 koloni alınarak 1 ml Tryptic Soy Broth ve %10 gliserol içeren mikro tüplerinde, aynı örnekten en az 2 tane olmak üzere inokule edildi ve -20°C'de saklandı. Kolonilerin tür düzeyinde identifikasyonu, API STAPH ve API STREP (BioMerieux, France) tanımlama sistemi ile üretici firma kılavuzuna göre yapıldı.

Antibiyotiplendirme

Koagulaz negatif stafilokok izolatlarının antibiyotik direnç profilleri, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'a göre Müller-Hinton agar (Difco) kullanılarak Kirby-Bauer Disk Difuzyon yöntemiyle belirlendi [9]. Test edilen 26 antibiyotik ve konsantrasyonları: Penicillin (P, 10 units, Oxoid CT0043B), Oxacillin (OX, 1 µg, Oxoid CT0159B), Ampicillin (AMP, 10 µg, Oxoid CT0003B), Amoxicillin-Clavulanic acid (30 µg), Kanamycin (K, 30 µg, CT0026B) Gentamicin (CN, 10 µg, Oxoid CT0024B), Streptomycin (S, 10 µg, Oxoid CT0047B), Tobramycin (10 µg), Tetracycline (TE, 10 µg, Oxoid CT0053B), Oxytetracycline (OT, 30 µg, Oxoid CT0041B), Doxycycline (DO, 30 µg, Oxoid CT0018B), Enrofloxacin (ENR, 5 µg, Oxoid CT0639B), Ofloxacin (OFX, 5 µg, Oxoid CT0446B), Ciprofloxacin (CIP, 5 µg, Oxoid CT0425B), Erythromycin (E, 15 µg, Oxoid CT0020B), Azithromycin (AZM, 15 µg, Oxoid CT0906B), Clindamycin (DA, 2 µg, CT0064B), Sulfamethoxazole-Trimethoprim (SXT, 25 µg, Oxoid CT0052B), Chloramphenicol (C, 30 µg, Oxoid CT0013B), Rifampicin (RD, 5 µg, CT0207B), Quinupristin/dalfopristin (QD, 15 µg, CT1644B), Mupirocin (MUP, 200 µg, CT0523B), Novobiocin (NV, 5 µg, CT0037B), Vancomycin (VA, 30 µg, CT0058B). Kontrol amaçlı olarak CLSI'da belirtilen *E. coli* (ATCC 25922) ve *S. aureus* (ATCC 25923) standart suşları kullanıldı [9].

Bulgular

Kültür

Toplam 54 adet bakteri izole ve identifiye edilmiş ve farklı vücut bölgelerine göre dağılımları tablo 1'de sunulmuştur. İzole edilen bakterilerin çoğunu KNS oluşturmuş, bunlar dışında iki farklı bakteri *Streptococcus porcinus* ve *Streptococcus sanguinus* identifiye edilmiştir.

Tablo 1. Kırkım öncesi ve sonrasında farklı vücut bölgelerinden izole edilen bakteriler

Kırkım öncesi	İzole edilen bakteriler	1. kırkım	2. kırkım	3. kırkım	4. kırkım	5. kırkım	6. kırkım	7. kırkım	8. kırkım	9. kırkım	10. kırkım
Makas üzerinde izole edilen bakteriler											
Üreme yok											
	Staphylococcus kloosii	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	Staphylococcus sciuri	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
	Staphylococcus warneri	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
	Staphylococcus xylosus	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
El Üzerinden İzole Edilen Bakteriler											
Streptococcus acidominus	*Streptococcus acidominimus*	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Staphylococcus kloosii	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
	Streptococcus porcinus	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
	Streptococcus sanguinus	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Kırkım öncesi	İzole edilen bakteriler	1. kırkım	2. kırkım	3. kırkım	4. kırkım	5. kırkım	6. kırkım	7. kırkım	8. kırkım	9. kırkım	10. kırkım
	Staphylococcus sciuri	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	Staphylococcus warneri	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
	Burun Bölgesinden İzole Edilen Bakteriler										
Staphylococcus capitis	*Staphylococcus capitis*	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	Staphylococcus kloosii	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	Staphylococcus sciuri	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+

Tablo 2. İzole edilen bakterilerin antibiyotik dirençlilik profilleri ve oranları

	S. sciuri (n: 12)	S. capitis (n: 5)	S. kloosii (n: 10)	S. porcinus (n: 4)	S. sanguinus (n: 2)	S warneri (n: 14)	S. xylosus (n: 7)	Ortalama (n: 54)
	Sayı (%)	*Sayı (%)*	*Sayı (%)*	*Sayı (%)*	*Sayı (%)*	*Sayı (%)*	*Sayı (%)*	Sayı (%)
Oxacillin	*3 (25)*	*2 (40)*	*4 (40)*	*1 (25)*	-	*6 (43)*	*3 (43)*	31
Penisilin G	*4 (33)*	*3 (60)*	*5 (50)*	*2 (50)*	*1 (50)*	*7 (50)*	*3 (43)*	48
Ampicilline	*3 (25)*	*2 (40)*	*4 (40)*	*1 (25)*	-	*5 (36)*	*2 (29)*	28
Metisillin	*2 (17)*	*2 (40)*	*3 (30)*	-	-	*3 (21)*	*4 (57)*	24
Amox-clau asit	*4 (33)*	-	*1 (10)*	-	-	*1 (7)*	-	7
Kanamisin	*1 (8)*	-	-	-	-	-	-	1
Gentamycine	-	-	-	-	-	-	-	-
Streptomycine	*2 (17)*	*1 (20)*	-	-	-	-	-	5
Tobramycin	-	-	-	-	-	-	-	-
Clindamycine	*1 (8)*	*1 (20)*	*1 (10)*	-	-	-	*1 (14)*	3
Tetrasiklin	*8 (67)*	*3 (60)*	-	*3 (75)*	*1 (50)*	*2 (14)*	*4 (57)*	49
Oxytetracycline	*9 (75)*	*3 (60)*	*1 (10)*	*3 (75)*	-	*2 (14)*	*5 (71)*	54
Doksisilin	*6 (50)*	*2 (40)*	*1 (10)*	*2 (50)*	-	*1 (7)*	*7 (10)*	30
Enrofloxasine	-	-	-	-	-	-	-	-
Oflaksasin	-	-	-	-	-	-	-	1
Ciprofloksasin	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritromycin	*2 (17)*	*1 (20)*	-	*1 (25)*	-	-	-	7
Azitromycin	*2 (17)*	*1 (20)*	-	-	-	-	-	7
Sulfa-trimeth	*2 (17)*	-	-	-	-	-	-	2
Cefoksitin	*3 (25)*	*1 (20)*	-	-	-	-	*1 (14)*	8
Cloramfenikol	-	-	-	-	-	-	-	-
Rifampisin	*2 (17)*	-	-	-	-	-	-	2
Mupirosin -	*1 (8)*	-	-	-	-	-	-	1
Quinupristin/dalfopristin	*2 (17)*	-	-	-	-	-	-	2
Vankomisin	-	-	-	-	-	-	-	-
Novobiocin	7 (58)	2 (40)	5 (50)	2 (50)	1 (50)	5 (36)	-	41

Antibiyotiplendirme

Bakteri izolatların tümünde test edilen 26 antibiyotikten Gentamicine, Tobramicin, Enrofloxacin, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Vancomycin haricinde 20'sine karşı direnç bulundu. En yüksek direnç oranının Oxytetracycline (%54), Tetracycline (%49), Penicillin G (%48) ve Novobiocin'e (%41) karşı olduğu, test edilen diğer antibiyotiklerde bulunan direnç oranlarının ise azalan sırayla OX (%31), DO (%30), AMP (%28), M (%24), FOX (%8), E, AZM ve AMC (%7), S (%5), DA (%3), SXT, QD, RD (%2), OFX, MUP, K (%1) olduğu saptandı. Çoklu direnç (MDR) yönünden 54 izolattan 5'i en az 4 (AMP/E/N/P), 1'i en çok 9 adet antibiyotiğe karşı dirençli bulundu (Tablo 2).

Tartışma ve sonuç

Bu çalışmada; koyun yetiştiriciliğinin yoğun olduğu Siirt ilinde sağlıklı görünen bir koyun sürüsünün kırkım işlemleri sırasında; kırkım yapan personele, hangi tür etkenlerin bulaşabileceği ve bu etkenlerin antibiyotik direnç profilleri belirlenmesi amaçlanmıştır.

Türkiye'de küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinde yılda 1-2 kez yapılan kırkımdan sonra herhangi bir sağlık kontrolü yapılmamaktadır. Dünya'da zoonoz hastalıkların sayısının gittikçe arttığı ve aynı zamanda bu hastalık etkenlerinin antimikrobiyal direncinde de büyük bir artış olduğu bilinmektedir. Çalışmamız sonucunda üreyen etkenlerin çoğunluğunu; özellikle, normal florada olarak düşündüğümüz etkenleri bir tarafa ayırdığımızda (burundan çalışma öncesi alınan örnekte üreyen *Staphylococcus capitis*, el üzerinde ilk örneklemede üreyen *Staphylococcus acidominus* vb.) KNS'ler oluşturmuştur. Önceki yıllarda apatojen olarak kabul edilen ancak sonradan üzerlerinde yapılan çok fazla çalışmayla KPS'ler kadar zararlı olabilecekleri ortaya çıkarılan KNS'ler, zoonoz ve fırsatçı patojen olabilme özelliklerine sahip aynı zamanda birçok antibiyotiğe dirençli bakterilerdir [5, 16, 23, 28].

Örneğin; *Staphylococcus kloosii*, linezolid dirençliliğine sahiptir ve sepsis oluşturabilme özelliğine sahiptir [31]. *Staphylococcus sciuri*, hayvan izolatı olmasına rağmen insanlarda enfeksiyon oluşturabilir ve insanlarda oluşturabildiği bu enfeksiyonlara pek çok çalışmada rastlanmıştır [10, 24, 26, 27, 34]. *Staphylococcus sciuri;* insanlarda endokardit, peritonit, septik şok, deri enfeksiyonları gibi birçok enfeksiyondan sorumludur [17, 18, 33, 37]. Ahoya ve ark. *Staphylococcus sciuri* enfeksiyonun kan enfeksiyonları içindeki oranı ve dirençlilik profili üzerinde yaptıkları çalışmada, izole edilen KNS'ler içerisinde *Staphylococcus sciuri*'nin büyük bir orana ve dirençliliğe sahip olduğunu bulmuşlardır [1].

S. warneri'nin sığırlarda ve insanlarda abort için bir neden olduğu öne sürülmüştür [4]. Aynı zamanda vertebral diskit [3], menenjit [20], ortopedik enfeksiyonlar [8], ventriküler şant enfeksiyonları ve endokardit [35] ile ilişkilidir. Ayrıca bir köpekte meningoensefalit vakasının nedeni olarak öne sürülmüştür [14]. Çalışmada identifiye edilen *S. warneri* izolatlarından biri 9 antibiyotiğe karşı dirençli izolat olarak bulunmuştur. Benzer şekilde *Staphylococcus xylosus'*da birçok endokardit, üriner sistem enfeksiyonları vb. enfeksiyonlardan izole edilmiştir [19, 28]. Aynı zamanda *S. xylosus* izolatlarının çoğu, nalidiksik asit, novobiocin ve penisilline karşı dirençli bulunmuşlardır [38]. Ayrıca; bazı *S. xylosus* izolatları elastaz gibi virulens genlerine sahiptir ve bu gen insan IgA ve IgG'sine bağlanma özelliğine de sahiptir [5]. İdentifiye edilen diğer bir KNS olan *Streptococcus sanguinus*, fırsat bulduğunda (diş temizleme ve ameliyatları) kan dolaşımına giriş yapabilir ve özellikle subakut bakteriyel endokarditin en sık nedeni olan kalp kapaklarını, özellikle de mitral ve aort kapaklarını kolonize edebilir [29].

Son kırkıma doğru aynı bölgeden alınan örneklerdeki bakterilerin, çok fazla artmayıp, bazı etkenlerin ilk örneklerde üreyip, sonra izole edilememesi aslında, örnek alımının tüm çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmalarda da çok önemli olduğunu göstermektedir. Yine ilk örneklerde üreyip, sonradan üremeyen bakteriler, laboratuvar çalışmaları sırasında da, çok dikkatli olunması gerektiğini gösteren bir sonuçtur. Petrilerde ilk ekimde çok etken bir arada ve yoğun olarak ürediğinden, farklı kolonilerin ayırt edilmesinde zorluk çekilebilmektedir. Bu sorunun mikrobiyolojide en anlamlı çözümü, alınan örneklerin laboratuvara ulaştıktan sonra ilk başta steril fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde çözündürülmesi, sonra bu FTS'lerdeki etkenlerin sulandırılarak, sona doğru olan sulandırmalardan ekimlerin yapılmasıydı. Sonuçlar göstermektedir ki, normal floranın bulunduğu bölgelerden örnek alınarak ya-

pılan çalışmalarda, yoğun üreme beklendiğinden bir sulandırma prosedürü kullanılması gerekmektedir.

Yapılan antibiyogram testi sonuçlarına göre, çoklu direnç (MDR) yönünden 54 izolattan 5'i en az 4 (AMP/E/N/P), 1'i en çok 9 adet antibiyotiğe karşı dirençli bulunmuştur (Tablo 2). Daha önce KNS'ler üzerinde yapılan çalışmalara baktığımızda, Güran ve ark. [14] KNS izolatlarının en az 2 antibiyotiğe dirençli bulmuşlar, hatta insanlarda fırsatçı patojen olan S. saprophyticus izolatlarında çoklu antibiyotik direnci tespit etmişlerdir. Khordshed ve ark. [23] KNS üzerinde yaptıkları çalışmada benzer şekilde yüksek dirençlilik tespit etmişlerdir. Tüm bu artan dirençlilik profilleri, toksinleri nedeniyle zaten zararlı etkenler olan stafilokokların tedavisinin de zorlaşmasına yol açmaktadır. Özellikle hastane enfeksiyonlarında önemli bir yere sahip olan stafilokoklar, dirençlilik profillerinin de genişlemesi nedeniyle önemlerini artırmaya devam etmektedirler.

Çalışmada, burun bölgesinden alınan 30 örnekten 15 (%50)'inde stafilokok spp. üremiş ve bu izolatların %52'si Penisillin G'ye karşı dirençli bulunmuştur. Gülbandılar [15], 3048 burun kültüründen izole ettikleri 217 S. aureus'un %91.4'ünü Penisillin G'ye karşı dirençli bulmuştur. Yağmur ve ark. [39] ise 203 sağlık çalışanının 43 (%21.2) tanesinde S. aureus burun taşıyıcılığı saptamışlar, ve bu izolatların da sadece 2'sinde (%4.7) metisillin direnci bulmuşlardır. Bu sonuçlar özellikle metisillin direnci ve patojen etken saptanan kişilerin belirlenip tedavi edilmesi ve gerekirse işyerlerinde daha uygun başka bir bölümde çalıştırılması açısından önemlidir.

Stafilokokların, burunda taşınan en önemli etkenlerden biri olduğu, gelişmekte olan ülkelerde içerdikleri 14 farklı enterotoksinlerden dolayı besin zehirlenmelerinin en önemli nedenlerinden biri oldukları ve günümüzde neredeyse tüm stafilokokların sadece enterotoksinler değil birçok toksijenik yapıya sahip yapıları oldukları bilinmektedir [13]. Kahya ve ark. [21], 145 farklı KNS, KPS stafilokok izolatı üzerindeki yaptıkları çalışmada 145 izolatın hepsinde 1 yada daha fazla toksin geni tespit etmişlerdir. Bu sonuçlarla, günümüzde artık bilinmektedir ki, sadece KPS değil KNS'larda toksinler içermekte ve genişlemiş/genişleyen antibiyotik direncine sahip bulunmaktadırlar.

Hayvan tüy, deri gibi yüzeyleri üzerinde bulunan birçok etken, eski zamanlarda apatojen olarak değerlendirilirken, günümüzde artan antibiyotik dirençliliği vb. genetik çalışmalarla, bu apatojen görünen etkenlerin ciddi bir enfeksiyon kaynağı olduğu gösterilmiştir. Çalışmanın sonucunda; sağlıklı görünümlü hayvanlardan yapılsa da, hayvanlar üzerinde yapılan tüm işlem ve çalışmalarda, mutlaka gerekli önlemlerin alınması gerektiği ortaya çıkmıştır.

Kaynaklar

1. Ahoyo TA, Yehouenou Pazou E, Baba-Moussa L, Attolou Gbohou A, Boco M, Dramane KL, Aminou T, (2013). Staphylococcus sciuri outbreak at tertiary hospital in Benin. J Med Microb Diagn. 2, 126.
2. Aladaş A, (2013). Koyunlarda kırkım öncesi C vitamini ve humik asit uygulamasının kırkım stresini azaltmasındaki etkisinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon.
3. Announ N, Mattei J, Jaoua S, Fenollar F, Sati H, Chagnaud C, Roudier J, Guis S, (2004). Staphylococcus warneri'nin neden olduğu multifokal diskit. Eklem Kemik Omurgası. 71, 240-242.
4. Barigye R, Schaan L, Gibbs PS, Schamber E, Dyer NW, (2007). Sığır kürtajının olası bir nedeni olarak Staphylococcus warneri'nin tanısal kanıtı. J Vet Diagn Invest. 19, 694-696.
5. Bedidi-Madani N, Greenland T, Yves R, (1998). Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk. Vet Mic. 59, 139-145.
6. Bergey's manual of systematic bacteriology, (1984); Ørskov F. In N.R. Krieg. and Holt J.G. (eds): vol 1., Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A. 420-423.
7. Cam MA, Kuran M, (2004). Shearing Pregnant Ewes to Improve Lamb Birth Weight Increases Milk Yield of Ewes and Lamb Weaning Weight. Anim Sci. 17, 1669-1673.
8. Campoccia D, Montanaro L, Visa L, Corazzari T, Poggio C, Pegreffi F, Maso A, Pirini V, Ravaioli S, Cangini I, Speziale P, Arciola CR, (2010). Ortopedik enfeksiyonlardan 26 Staphylococcus warneri izolatının karakterizasyonu. Int J Artif Organs. 33, 575-581.
9. CLSI: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement, CLSI document M100-S20, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2010
10. Couto I, Sanches IS, Sa-Leao E., Lencastre H, (2000). Molecular characterization of Staphylococcus sciuri strains isolated from humans. J Clin Microbiol. 38, 1136-1143.
11. Demirbaş F, (2013). Piyasadan ve eczanelerden alınan çeşitli el dezenfektanlarının mikrobiyolojik etkilerinin karşılaştırılması. Bitirme Tezi, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

12. Doğruer Y, (2000). Veteriner Halk Sağlığı ve zoonozlar. Veteriner Halk Sağlığı, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, Konya.
13. Erdoğan H, Araslan H, (2011). Otel personelinin burun ve boğaz kültüründe Staphylococcus aureus taşıyıcılığının araştırılması ve risk faktörlerinin irdelenmesi. Klimik dergisi. 24, 90-93.
14. Espino L, Bérmudez R, Fidalgo LE, González A, Miño N, Quiroga MI, (2006). Köpekte Staphylococcus warneri ile ilişkili meningoensefalit. J Küçük Animasyon Uygulaması. 47, 598-602.
15. Gülbandılar A, (2009). Kütahya yöresinde burun mukozasındaki Staphylococcus aureus taşıyıcılığının ve antibiyotik duyarlılığının araştırılması. Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 18, 1-5.
16. Güran HŞ, Kahya S, (2015). Species diversity and Pheno-and Genotypic antibiotic resistance patterns of Staphylococci isolated from retail ground meats. J Food Scien. 80, 1291-1298.
17. Hedin G, Widerstrom M, (1998). Endocarditis due to Staphylococcus sciuri. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 17, 673-675.
18. Horii T, Suzuki Y, Kimura T, Kanno T, Maekawa M, (2001). Intravenous catheter-related septic shock caused by Staphylococccus sciuri and Escherichia vulneris. Scand J Infect Dis. 33, 930-932.
19. Hricak V, J Kovacik, P Marksc, D West, V Kromery, (1999). Aetiology and outcome in 53 cases of native valve staphylococcal endocarditis. Postgrad Med J. 75, 540-543.
20. Incani RN, Hernández M, Cortez J, González ME, Salazar YD, (2010). Strongyloides stercoralis hiperinfeksiyon ve lenfoma' lı bir hastada stafilokok warneri menenjit: Bir vakanın ilk raporu. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 52, 169-170.
21. Kahya S, Güran HŞ, Yılmaz Ö, (2016). PCR and ELISA for Staphylococcal enterotoxins and of some exotoxins from Staphylococcus spp. strains by PCR. Medycyna Weterynaryjna. 72, 28-33.
22. Kaymakçı M, (2010). İleri koyun yetiştiriciliği kitabı. Genişletilmiş 3. Baskı. İzmir, p.359.
23. Khorshed A, Özbal Y, (2012). Kan kültürlerinden izole edilen koagülaz negatif stafilokokların tiplendirilmesi ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması. Sağlık Bil Derg. 21, 153-163.
24. Kloos WE, Ballard DN, Webster JA, Hubner RJ, Tomasz A, Couto I, Sloan GL, Dehart HP, Fiedler F, Schubert K, Lencastre H. de, Santos Sanches I, Health HE, Leblanc PA, Ljungh A, (1997). Ribotype delineationand description of Staphylococcus sciuri subspecies and their potential as reservoirs of metisillin resistance and staphylolytic enzyme genes. Int J Syst Bacteriol. 47, 313-323.
25. Koyuncu M, Taşkın T, (2013). Organik Küçükbaş Hayvan Yetiştiriciliği "Fırsatlar ve zorluklar". Türkiye II. Organik Hayvancılık Kongresi. 24-26 Ekim 2013, Bursa, p.153-164.
26. Marsou R, Bes M, Boudouma M, Brun Y, Meugnier H, Freney J, Vandenesch F, Etienne J, (1999). Distrubition of Staphylococcus sciuri subspecies among human clinical specimens, and profile of antibiotic resistance. Res Microbiol. 150, 531-541.
27. Nagase N, Sasaki A, Yamashita K, Shimizu A, Wakita Y, Kitai S, Kawano J, (2002). Isolation and species distrubition of staphylococci from aniaml and human skin. J Vet Med Sci. 64, 245-250.
28. Orret FA, Shurland SM, (1998). Significance of coagulase-negative staphylococci in urinary tract infections in a developing country. Connecticut Medicine. 62, 199-203.
29. Paik S, Senty L, Das Sankar, Jody C.N, Cindy LM, Todd K, (2005). Identification of Virulence Determinants for Endocarditis in Streptococcus sanguinis by Signature-Tagged Mutagenesis. Infect Immun. 73, 6064-6074.
30. Pappaioanou M, (2003). Veterinary medicine protecting and promoting lhe public's health and wellbeinq. Preven Vet Med. 1-11.
31. Peer MA, RA Nasir, DK Kakru, BA Fomda, G Bashir, IA Sheikh. Sepsis due to linezolid resistant Staphylococcus cohnii and Staphylococcus kloosii: first reports of linezolid resistance in coagulase negative staphylococci from India. Indian J Med Microbiol, 29, 60-62.
32. Slifko TR, Smith HV, Rose JB, (2000). Emerging parasite zoonoses associated with water and food. Int J Parasitol, 30, 1379-93.
33. Stepanovic S, I. Dakic, S. Djukic, B. Bozuk, M. Svabic-Vlahovic, (2002). Surgical wound infection associated with Staphylococcus sciuri. Scand J Infect Dis. 34, 685-686.
34. Stephanie N, Angeles Argudin M, Fessler AT, Hauschild T, Schwarz S, Butaye P, (2014). The ecological importance of the Staphylococcus sciuri species group as a reservoir for resistance and virulence genes. Vet Mic. 171, 342-356.
35. Stöllberger C, Wechsler-Fördös A, Geppert F, Gulz W, Brownstone E, Nicolakis M, Finsterer J, (2006). Bir immun yeterlilik hastasında lumbar disk protezi yerleştirildikten sonra stafilokok warneri endokarditi. J Infect. 52, 15-18.
36. Tuncer SS, (2008). Norduz ve Karakaş koyunlarında kıl folikülü ile yapağı özellikleri arasındaki ilişkiler. Doktora tezi, YYÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni ABD, Van.
37. Wallet F, Stuit L, Boulanger E, Roussel-Delvallez M, Dequiedt P, Courcol RJ, (2000). Peritonitis due to Staphylococcus sciuri in a patient on continuous ambulatory peritoneal disease. Scand J Infect Dis. 32, 687-698.
38. Vela J, Hildebrandt K, Metcalfe A, Remp el H, Bittman S, Topp E, Diarra M, (2012). Characterization of Staphylococcus xylosus isolated from broiler chicken barn bioaerosol. Poult Sci. 91, 3003–3012.
39. Yağmur G, İnci M, (2014). Sağlık çalışanlarında Staphylococcus aureus burun taşıyıcılığı ve antibiyotik duyarlılığının araştırılması. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 12, 31-37.

Türkiye'nin Adana Yöresindeki Koyunlarda *Toxoplasma gondii* ve *Neospora caninum* Seroprevalansının Araştırılması*

Funda Eşki[1], Pınar Demir[2], Cahit Babür[3], Armağan Erdem Ütük[4]

[1]Çukurova Üniversitesi, Ceyhan Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye.
[2]Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvancılık Ekonomisi ve İşletmeciliği Anabilim Dalı, Kars, Türkiye.
[3]Refik Saydam Hıfzıssıhha Mrk. Bşk, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Parazitoloji Lab, Ankara, Türkiye.
[4]Çukurova Üniversitesi, Ceyhan Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye.

Geliş Tarihi / Received: 23.04.2018, **Kabul Tarihi** / Accepted: 29.05.2018

Özet: *Toxoplasma gondii* ve *Neospora caninum* evcil ruminantlarda ekonomik kayıplara neden olan hücre içi parazitik protozoonlardır. *T.gondii* koyunların, *N.caninum* ise sığırların önemli abort etkenleri arasında yer alır. *T.gondii*'nin zoonotik özelliği aynı zamanda onun ciddi bir halk sağlığı problemi olmasına neden olur. Bu çalışmanın amacı Adana yöresi koyunlarında *T.gondii* ve *N.caninum* seroprevalansını belirlemektir. Bu amaçla Adana'nın tüm ilçelerinden farklı ırk, yaş ve cinsiyette toplam 234 koyundan kan örneği alınmış, *T.gondii* yaygınlığı Sabin Feldman Dye (SFD), *N.caninum* yaygınlığı ise c-ELISA testi ile araştırılmıştır. Seroprevalans oranları *N.caninum* için %12.4 (29/234), *T.gondii* için %78.6 (184/234) ve miks enfeksiyon ise %11.53 (27/234) olarak belirlenmiştir. Rakım, ırk, yaş ve cinsiyet gibi değişkenler ile *T.gondii* ve *N.caninum* seroprevalansı arasındaki ilişki istatistiksel olarak ki-kare (X^2) testi ile incelenmiştir. *Neospora caninum* seroprevalansı ile rakım, ırk, cinsiyet ve yaş değişkenleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur. *Toxoplasma gondii* seroprevalansı ile cinsiyet ve yaş değişkenleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) iken, rakım ve ırk değişkenleri arasındaki ilişki önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. Bu çalışma ile ilk kez hem Adana yöresindeki koyunlarda anti-*N.caninum* antikorlarının varlığı belirlenmiş, hem de Türkiye'de koyunlarda *T.gondii* ve *N.caninum* birlikte değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Toxoplasma gondii, Neospora caninum*, Koyun, c-ELISA, SFDT, Adana.

A Research on the Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Sheep in Adana Province of Turkey

Abstract: *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* are intracellular parasitic protozoa that cause economic losses in domestic ruminants. *T.gondii* primarily causes abortion in sheep and *N.caninum* in cattle. Due to the zoonotic nature of *T.gondii*, it becomes a serious public health problem. The aim of this study was to determine the seroprevalence of *T.gondii* and *N.caninum* in sheep in Adana province. For this aim, 234 blood samples were collected from sheep in different breed, age and sex in 15 different counties of Adana. Obtained sera were examined with Sabin Feldman Dye (SFD) and c-ELISA tests for the seroprevalences of *T.gondii* and *N. caninum,* respectively. Seroprevalances were determined as 12.4% (29/234) for *N. caninum*, 78.6% (184/234) for *T.gondii* and 11.53% (27/234) for both parasites. Correlation between the seropositivities of both parasites and the variants (altitude, breed, age and sex) was investigated with chi-square (X^2) test. There was no statistical correlation between seropositivity and altitude, breed, sex and age for *N.caninum* ($p>0.05$). The relationship between seroprevalence of *T.gondii* and sex and age variables was statistically insignificant ($p>0.05$), while the relationship between altitude and race variables was significant ($p<0.05$). With this study, not only the presence of anti-*N.caninum* antibodies were determined in sheep in Adana province, but also two parasites were examined together in sheep for the first time in Turkey.

Key words: *Toxoplasma gondii, Neospora caninum*, Sheep, c-ELISA, SFDT, Adana.

Giriş

Toxoplasma gondii ve *Neospora caninum* Toxoplasmatidae ailesinde yer alan zorunlu hücre içi parazitik protozoonlardır. Her iki etken de ara konak pozisyonunda olan evcil ve yabani memelilerde parazitlenerek ciddi ekonomik kayıplara neden olur. *T.gondii* ve *N. caninum*'un son konakları sırasıyla Felidae ve Canidae ailesindeki türlerdir. Bu canlılar aynı zamanda her iki etkene ara konaklık da yapar [8, 9].

[*]Bu çalışma 25-27 Ekim 2017 tarihleri arasında Adana'da düzenlenen II. International Mediterranean Science and Engineering Congress'de sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Yazışma adresi / Correspondence: *Funda Eşki, Çukurova Üniversitesi, Ceyhan Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye. E-posta: fundaeksi01@gmail.com*

Genel kanı *T.gondii*'nin koyunlarda, *N. caninum*'un ise sığırlarda primer parazitik abort etkenleri olduğu yönündedir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar *N. caninum*'un koyun ve keçilerde de aborta neden olabileceğini göstermiştir [8, 9]. *T.gondii*'nin zoonotik özelliği, kadınlarda aborta, enfekte çocuklarda serebral ve oküler bozukluklara sebep olması yönüyle ayrı bir önem arz eder. *N.caninum* ise zoonotik öneme sahip olmayıp, oluşturduğu enfeksiyon hayvanlarla sınırlıdır [10]. Her iki hastalığın ara konaklardaki yaygınlığının belirlenmesinde serolojik (ELISA, IHA, LAT, IFAT, Sabin Felman Dye Test) ve moleküler yöntemler (PCR ve modifikasyonları) kullanılır [4, 8, 9].

Ülkemizde koyunlarda *T.gondii*'nin yaygınlığı konusunda çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen *N.caninum* ile ilgili yeterli yayın bulunmamaktadır [6, 11, 24].

Bu çalışmanın amacı Sabin Felman Dye Testi (SFDT) ve c-ELISA yöntemleri ile Adana yöresi koyunlarında *T.gondii* ve *N.caninum* seroprevalansını belirlemektir.

Materyal ve Metot

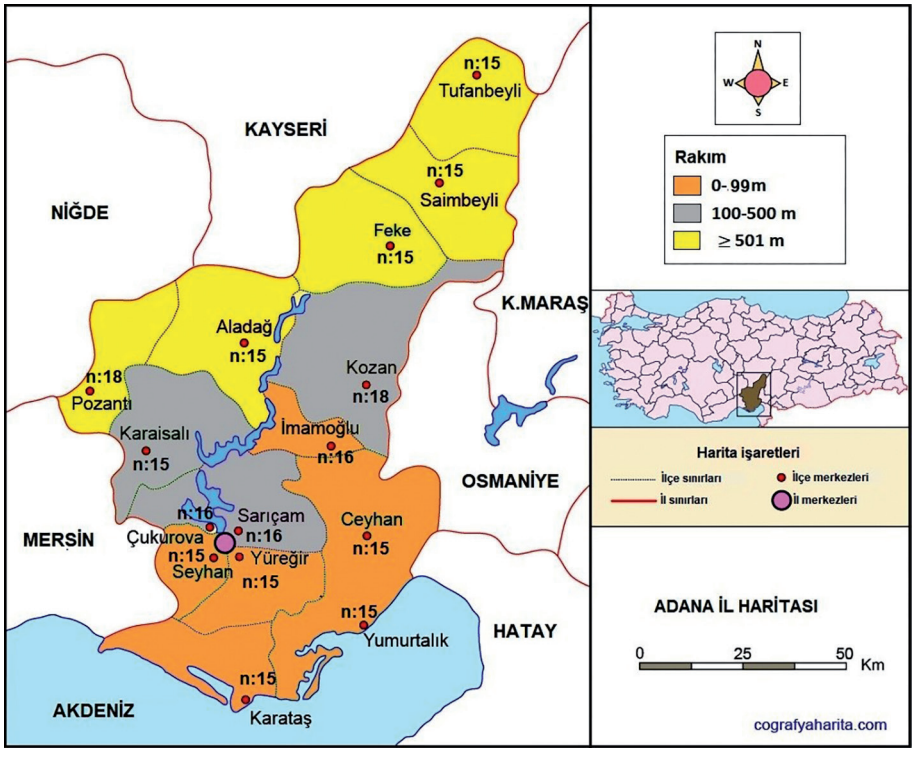
Adana'nın her ilçesinden minimum 15 olmak üzere farklı ırk, yaş ve cinsiyetten toplam 234 koyundan kan örneği alındı (Şekil 1). Serumlar ayrıldıktan sonra kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi. *Toxoplasma gondii* ve *Neospora caninum* seroprevalansını belirlemek amacıyla Sabin Feldman Dye (SFD) ve c-ELISA testleri (VMRD, USA) kullanıldı. Sabin Feldman Dye testi Ankara Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Parazitoloji Laboratuvarında yapıldı. SFDT'de 1/16 ve üzeri titreler, c-ELISA testinde ise yüzde inhibisyon değeri ≥30 olan serumlar pozitif olarak kabul edildi [3, 23]. Rakım, ırk, yaş ve cinsiyet gibi değişkenler ile *T.gondii* ve *N.caninum* seroprevalansı arasındaki ilişki istatistiksel olarak ki-kare (X^2) testi ile incelendi. $P<0.05$ olarak belirlenen analiz sonuçları önemli kabul edildi. Çalışma için gerekli izin Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Yerel Etik Kurulu'ndan alındı (18.07.2016 tarih ve 3-2072 sayı).

Bulgular

Seroprevalans oranları *N.caninum* için %12.4 (29/234), *T.gondii* için %78.6 (184/234) ve miks enfeksiyon için ise %11.53 (27/234) olarak belirlendi. *Neospora caninum* seroprevalansı ile rakım, ırk, cinsiyet ve yaş değişkenleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) bulundu. *T.gondii* seroprevalansı ile cinsiyet ve yaş değişkenleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) iken, rakım ve ırk değişkenleri arasındaki ilişki önemli ($p<0.05$) bulundu. Yapılan çalışmada *T.gondii* seroprevalansı 0-99 m'de %74.7, 100-500 m'de %70.8 iken bu oran 500 m ve üstü yerlerde %89.7 olarak; Akkaraman ırkında %85, diğer ırklarda (merinos, kangal, melez, sakız) %79.7 iken İvesi ırkında %64.9 olarak tespit edildi (Tablo 1).

Tablo 1. Adana yöresindeki koyunlara ait epidemiyolojik veriler ($p<0.05$).

Epidemiyolojik veriler		Hayvan sayısı (n)	T.gondii			N. caninum		
			n	%	P	n	%	P
Rakım (m)	0-99	91	68	74.7	0.011*	11	12.1	0.103
	100-500	65	46	70.8		4	6.2	
	≥501	78	70	89.7		14	17.9	
Irk	Akkaraman	113	96	85	0.010*	11	9.7	0.351
	Ivesi	57	37	64.9		7	12.3	
	Diğer	64	51	79.7		11	17.2	
Yaş	<3	108	87	80.6	0.506	14	13	0.807
	>3	126	97	77		15	11.9	
Cinsiyet	Dişi	181	139	76.8	0.205	25	13.8	0.223
	Erkek	53	45	84.9		4	7.5	



Şekil 1. Adana ilinde örnek toplanan ilçeler, rakım ve örnek sayıları (n) [2].

Tartışma

Koyunlarda *T.gondii*'nin dünyadaki seroprevalansının %3-84.5, Türkiye'de ise %2.8-98.9 arasında olduğu belirtilmektedir [1, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 13-18, 20, 24]. Etkenin seroprevalansını belirlemek amacıyla MAT, IFAT, IHA, LAT, ELISA ve SFDT gibi spesifite ve sensitiviteleri birbirinden farklı olan serolojik testler kullanılmaktadır. Bu testlerden SFDT'nin CF, IFAT, IHA, ELISA ve LAT'dan daha duyarlı olduğu ve epidemiyolojik çalışmalarda tercih edilmesi gerektiği bildirilmiştir [4]. Bu çalışmada SFDT ile hastalığın Adana yöresi koyunlarındaki yaygınlığı %78.6 (184/234) olarak belirlenmiştir.

T.gondii ile karşılaştırıldığında koyun neosporosis'inin yaygınlığı konusunda dünyada ve ülkemizde az sayıda çalışma bulunmaktadır [9, 11, 24].

Koyunlarda anti-*N.caninum* antikorlarını belirlemek amacıyla i-ELISA, c-ELISA ve IFAT gibi serolojik testler kullanılmıştır [9]. IFAT neosporosis'in tanısında referans test olarak kabul edilmektedir ancak testin uygulama güçlüğü ve tür spesifik konjugat gerektirmesi nedeni ile büyük ölçekli epidemiyolojik çalışmalarda c-ELISA daha pratik bir tarama yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır [5]. Koyun neosporozisinin seroprevalansının dünya genelinde %0.45-63 arasında, ülkemizde ise %0-2.7 arasında olduğu bildirilmiştir [9, 11, 24]. Bu çalışmada c-ELISA testi ile koyunlarda *N.caninum* seroprevalansı %12.4 (29/234) olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda Adana yöresi koyunlarında *T.gondii* seroprevalansının dünyada ve Türkiye'de yapılan çalışmalarda elde edilen alt ve üst sınırlar içerisinde olduğu [3, 4, 6, 7, 8, 10, 13-17, 20, 24], *N.caninum* seroprevalansının ise dünya genelindeki sınırlar içerisinde ancak Türkiye'de yapılan diğer çalışmalardan daha yüksek olduğu görülmüştür. Nitekim *N.caninum* seroprevalansı Kars'ta %2.13 (8/376), Karaman'da %0.8 (1/120), Konya'da %2.7 (12/450) ve Zonguldak'ta %0 (0/40) olarak belirlenmiştir [9, 11, 24].

Dünyada koyunlarda hem *T.gondii* hem de *N. caninum*'un seroprevalansının birlikte araştırıldığı çalışmalarda miks enfeksiyon oranları %2.75-9.03 olarak tespit edilmiştir [12, 19, 21, 22]. Bu çalışmada ise miks enfeksiyon oranı %11.53 olarak belirlenmiştir.

Ülkemizde koyun toxoplasmosisinin yaygınlığı konusunda yapılan çalışmaların çoğunda ırk, yaş, cinsiyet, lokalizasyon ve rakım gibi epidemiyolojik

faktörlerin hastalığın yaygınlığı üzerine etkisi konusunda istatistiksel bir değerlendirmeye rastlanmamıştır [3, 4, 7, 13, 14, 20]. Çakmak ve Karatepe [6] Nevşehir yöresinde koyunlar üzerinde yaptıkları çalışmada seropozitiflik ile yaş ve cinsiyet arasındaki ilişkinin önemsiz, çalışma merkezlerinin ise önemli olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada da yaş ve cinsiyet değişkenleri arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak önemli olmadığı, farklı rakımlardaki ilçeler arasındaki ilişkinin ise önemli olduğu belirlenmiş ve her üç parametre konusunda iki çalışmanın sonuçlarının örtüştüğü görülmüştür. İlave olarak ırk ve seroprevalans arasındaki ilişki de değerlendirilmiş ve *T.gondii* seroprevalansının ivesi ırkı koyunlarda diğer ırklardan daha düşük olduğu görülmüştür (Tablo 1).

Türkiye'de koyunlarda *N.caninum* seroprevalansı konusunda yapılan çalışma sayısı oldukça sınırlıdır [11, 24]. Kars yöresi koyunları üzerine yapılan bir çalışmada *N.caninum* seroprevalansı ile ırk ve lokalizasyon arasındaki ilişki önemli, yaş ise önemsiz bulunmuştur [16]. Dünyada yapılan çalışmalarda ise bazı sürülerde dişilerde erkeklerden, bazılarında ise erkeklerde dişilerden yüksek olduğu ancak her iki durumda da istatistiksel olarak önemlilik bulunmadığı, yaşın hastalığın prevalansı üzerinde etkisi olmadığı belirtilmiştir [9]. Bu çalışmada ise seroprevalans ile rakım ırk cinsiyet ve yaş değişkenleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

Bu çalışma ile Adana yöresi koyunlarında *T.gondii* ve *N.caninum* gibi iki önemli paraziter abort etkeni birlikte araştırılmış ve Türkiye'de koyunlarda *N.caninum* seroprevalansı konusunda oldukça az sayıda olan literatürlere bir yenisi eklenmiştir. Çalışma sonucunda koyunlarda önemli paraziter abort etkenlerinden biri olan *T.gondii* enfeksiyonunun Adana yöresindeki koyunlarda yaygın olduğu tespit edilmiştir. *N. caninum*'un ise Adana yöresindeki koyunların sığır neosporozisi için rezervuar olabileceği, *N.caninum* seropozitif koyun sürülerinde abortların şekillenebileceği akılda bulundurulmalıdır. Ayrıca her iki hastalığın koyun sürülerinde birlikte görülebileceği ve çiğ ya da az pişmiş koyun eti tüketiminin bölgede halk sağlığı açısından ciddi problem olabileceği ortaya çıkmıştır.

Kaynaklar

1. Altıntaş K, Güngör C, Zeybek H, Yaralı C, (1997). *Prevalence of Toxoplasma gondii in sheep of Ankara region with Sabin-feldman test.* Acta Parasitol Turcica. 21, 63-65.
2. Anonim, (2017). *Adana ili haritası.* Erişim adresi: http://cografyaharita.com/haritalarim/4l_adana_ili_haritasi.png, Erişim tarihi: 21.12.2017.
3. Babür C, Karaer Z, Çakmak A, Yaralı C, Zeybek H, (1996). *Ankara yöresinde Sabin-Feldman (SF) indirekt floresan antikor (IFA) latex aglütinasyon (LA) testleri ile koyun Toxoplasmosis'inin prevalansı.* FÜ Sağlık Bil Derg. 10, 273-277.
4. Babür C, İnci A, Karaer Z, (1997). *Çankırı yöresinde koyun ve keçilerde Toxoplasma gondii seropozitifliğinin Sabin Feldman boya testi ile saptanması.* T Parazitol Derg. 21(4), 409-412.
5. Björkman C, Uggla A, (1999). *Serological diagnosis of Neospora caninum infection.* Int J Parasitol. 29, 1497-1507.
6. Çakmak DÖ, Karatepe B, (2017). *Seroprevalence of Toxoplasma gondii in Sheep from Nevşehir Province in Turkey.* Turkiye Parazitol Derg. 41, 148-151.
7. Çiçek H, Babür C, Eser M, (2011). *Afyonkarahisar ilinde pırlak ırkı koyunlarda Toxoplasma gondii'nin seroprevalansı.* Turkiye Parazitol Derg. 35, 137-139.
8. Dubey JP, (2010). *Toxoplasmosis of Animals and Humans.* Second edition. CRC Press, Taylor & Francis Group. p. 119.
9. Dubey JP, Hemphill A, Calero-Bernal R, Schares G, (2017). *Neosporosis in sheep.* Dubey JP, Hemphill A, Calero-Bernal R, Schares G, eds. *Neosporosis in Animals.* CRC Press, Taylor & Francis Group. p. 317-327.
10. Dumanlı N, Aktaş M, (2010). *Toxoplasmatidae (Toxoplasma. Neospora)*. Dumanlı N, Karaer Z, eds. *Veteriner Protozooloji*. 1. Baskı. Medisan Yayınevi, Ankara. p. 119-135.
11. Gökçe G, Mor N, Kırmızıgül A, Bozukluhan K, Erkılıç E, (2015). *The first report of seropositivity for Neospora caninum in sheep from Turkey.* Isr J Vet Med. 70, 40-44.
12. Guimarães A, Raimundo JM, Moraes L, Silva AT, Santos HA, Pires MS, Machado, Baldani RZ, Baldani CD, (2015). *Occurrences of anti-Toxoplasma gondii and anti-Neospora caninum antibodies in sheep from four districts of Tocantins state, Brazilian Legal Amazon Region.* Pesqui Vet Bras. 35(2), 110-114.
13. İnci A, Aydin N, Babür C, Çam Y, Akdoğan C, Kuzan S, (1999). *Seroepidemiological studies on toxoplasmosis and brucellosis in cattle and sheep around Kayseri.* Pendik Vet Microbiyol Derg. 30, 41-46.
14. Karatepe M, Babur C, Karatepe B, (2001). *Seroprevalence of Toxoplasma gondii detected by the Sabin-Feldman Dye Test in sheep in the region of Gümüşhacıköy (Amasya).* Türkiye Parazitol Derg. 25, 110-112,
15. Karatepe B, Babür C, Karatepe M, Cakmak A, Nalbantoglu S, (2004). *Seroprevalence of toxoplasmosis in sheep and*

goats in the Nigde Province of Turkey. Indian Vet J. 81, 974-976.

16. Mor N, Arslan MO, (2007). *Kars yöresindeki koyunlarda Toxoplasma gondii' nin seroprevalansı.* Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 13, 165-170.
17. Öncel T, Vural G, Babür C, Kılıç S, (2005). *Detection of toxoplasmosis gondii seropositivity in sheep in Yalova by Sabin Feldman dye test and latex agglutination test.* Turkiye Parazitol Derg. 29, 10-12.
18. Öz I, Özyer M, Çorak R, (1995). *Adana yöresi sığır, koyun ve keçilerinde ELISA ve IHA testleri ile toxoplasmosis'in yaygınlığının araştırılması.* J Etlik Vet Microbiol. 8, 87-89.
19. Panadero R, Painceira A, López C, Vázquez L, Paz A, Díaz P, Dacal V, Cienfuegos S, Fernández G, Lago N, (2010). *Seroprevalence of Toxoplasma gondii and Neospora caninum in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain).* Res Vet Sci. 88(1), 111-115.
20. Paşa S, Babür C, Kılıç S, Gasyağcı S, Bayramlı G, (2004). *Seroprevalance of Toxoplasmosis in sheep in Aydın region in Turkey.* Indian Vet J. 81, 366-367.
21. Romanelli PR, Freire RL, Vidotto O, Marana ER, Ogawa L, De Paula VSO, Garcia JL, Navarro IT, (2007). *Prevalence of Neospora caninum and Toxoplasma gondii in sheep and dogs from Guarapuava farms, Parana State, Brazil.* Res Vet Sci. 82(2), 202-207.
22. Tafner Ferreira MS, Silveira Flores Vogel F, Sangioni LA, Skrebsky Cezar A, Rezer de Menezes F, (2016). *Neospora spp, and Toxoplasma gondii infection in sheep flocks from Rio Grande do Sul, Brazil.* Semina Ciênc Agrár. 37(3), 1397-1406.
23. Utuk AE, Eski F, (2017). *Detection of anti-Neospora caninum antibodies in a goat flock in Kilis Province of Turkey*. I J V S. 6, 114-117.
24. Zhou M, Cao S, Sevinc F, Sevinc M, Ceylan O, Liu M, Wang G, Moumouni PFA, Jirapattharasate C, Suzuki H, Nishikawa Y, Xuan X, (2016). *Enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant TgSAG2 and NcSAG1 to detect Toxoplasma gondii and Neospora caninum-specific antibodies in domestic animals in Turkey.* J Vet Med Sci. 78, 1877-1881.

Epidemiological Investigation of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever infection in Cattle in some provinces of Turkey

Murat Şevik

Department of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Hatay Mustafa Kemal University, Hatay, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 18.01.2018, **Kabul Tarihi** / Accepted: 06.05.2018

Abstract: Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) is a zoonotic disease which causes lethal hemorrhagic fever in humans. The purpose of this study was to investigate the CCHF infection status in cattle in the Central Anatolia region and the central-west part of the Aegean region of Turkey. For this purpose, EDTA whole blood (n = 329) and sera (n =329) samples were obtained from epidemiologically independent herds (n =94) during the months of March 2016 and September 2017. The exposure status to CCHF was determined using ELISA for detection of CCHF virus (CCHFV) specific IgG antibodies in cattle sera samples. Real-time reverse-transcriptase PCR was used to detect viral RNA in EDTA whole blood samples. The CCHFV-specific IgG antibodies were detected in 4 out of 329 animals, accounting for 1.2% prevalence rate. CCHFV RNA was not detected in EDTA whole blood samples. The low seroprevalence suggests only sporadic introduction of CCHFV. Further epidemiological studies are needed to determine the distribution of CCHFV infection in livestock in Turkey.

Key words: Crimean-Congo hemorrhagic fever, Epidemiology, Turkey, Cattle, ELISA, Real-time RT-PCR

Türkiye'nin bazı İllerindeki Sığırlarda Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Enfeksiyonunun Epidemiyolojik Araştırılması

Özet: Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) insanlarda öldürücü hemorajik ateşe neden olan zoonotik bir hastalıktır. Bu çalışmanın amacı Türkiye'nin İç Anadolu ve Orta Batı Ege Bölgelerindeki sığırlarda KKKA enfeksiyon durumunu araştırmaktı. Bu amaçla Mart 2016 ve Eylül 2017 tarihleri arasında epidemiyolojik olarak birbirinden bağımsız işletmelerden (n=94) EDTA'lı tam kan (n = 329) ve serum (n = 329) örnekleri toplandı. KKKA'ne maruziyet durumu, sığır serum örneklerinde KKKA virusuna (KKKAV) spesifik lgG antikorlarının ELISA ile tespit edilmesi ile belirlenmiştir. Real time reverse transkripsiyon PCR yöntemi, EDTA'lı tam kan örneklerinde viral RNA varlığını tespit etmek için kullanılmıştır. Üç yüz yirmi dokuz hayvanın, dördünde KKKAV spesifik lgG antikoru tespit edildi ve %1.2 prevalans oranı hesaplandı. EDTA'lı tam kan örneklerinde KKKAV RNA'sı tespit edilememiştir. Düşük seroprevelans oranı sporadik KKKAV vakalarının olduğunu düşündürmektedir. Türkiye'deki çiftlik hayvanlarında KKKAV enfeksiyonunun dağılımını tespit etmek için daha fazla epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimler: Kırım Kongo Kanamalı Ateşi, Epidemiyoloji, Türkiye, Sığır, ELISA, Real-time RT-PCR

Introduction

Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) is a tick-borne zoonotic disease that can cause serious hemorrhagic disease in humans. CCHF is characterised by fever, weakness, myalgia and hemorrhagic signs with case fatality rates ranging from 5% to 80% [5, 37, 39]. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV), the causative agent of CCHF, is a single-stranded RNA virus and belongs to the *Nairovirus* genus of the *Bunyaviridae* family [5].

CCHFV is primarily transmitted by *Hyalomma* spp. ticks [35]. The virus can also be transmitted horizontally and vertically within the tick population [11]. Wild (giraffe, rhinoceros, eland, kudu, buffalo and zebra) and domestic animals (cattle, sheep, goats, horses, donkeys and camels) can be infected and play a role in the spread of virus [25]. Viremia lasting up to 2 weeks can be observed in infected animals, but they do not show clinical signs. However, seroconversion can be observed in infected animals [30].

CCHFV infections have been reported in Sub-Saharan Africa, Asia, the Middle East and Southeastern Europe [5, 9, 13]. CCHF was first reported in the Tokat Province in Turkey in 2002, and more than 9700 human cases have been reported from 2002 to 2016 [19].

Yazışma adresi / Correspondence: *Murat Şevik (ORCID: 0000-0002-9604-3341), Department of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Hatay Mustafa Kemal University, Hatay, Turkey E-posta: dr_muratank@hotmail.com*

Detection of CCHFV-specific antibodies in the animal population especially cattle can successfully be used as indicator for the presence or absence of CCHFV in an area [22, 31, 35]. Because *Hyalomma* tick species, which are both vectors and reservoirs of CCHFV are generally found in cattle, but can also cause infestation in sheep and goats [15]. Information about CCHFV infection in animals in Turkey is very limited. Therefore, the aim of this study was to investigate the CCHFV infection status in cattle in Central Anatolia Region and central-west part of the Aegean region of Turkey.

Materials and Methods

Study Area

This study was conducted during the months of March 2016 and September 2017 in the Afyonkarahisar Province in the central-west part of the Aegean region and in the Konya and Aksaray Provinces in the Central Anatolia region of Turkey (Fig. 1). These regions have continental climate characterised by hot and dry summer. The elevation of the Afyonkarahisar, Konya and Aksaray Provinces are 1034 m, 1031 m and 980 m, respectively. The annual rainfall in the studied provinces varies between 322 mm (Konya Province) and 439 mm (Afyonkarahisar Province) (Turkish State Meteorological Service). The number of herds in the Afyonkarahisar, Konya and Aksaray Provinces was 38993, 55565 and 17225, respectively (Turkish Statistical Institute, 2016).

Sample collection

EDTA whole blood (n =329) and sera (n = 329) samples from cattle were collected from 94 epidemiologically independent herds in the Afyonkarahisar, Konya and Aksaray Provinces (Table 1). On average, three to four cattle per herds were sampled randomly. All samples were collected from cattle older than 12 months, which were grazing frequently on common pastures. No clinical signs of disease were observed in the sampled animals at the sampling time. Buffy coat cells were obtained from EDTA whole blood samples by centrifugation at 2200 rpm for 10 minutes, and used for RNA extraction.



Figure 1. Location of investigated regions in Turkey.

Serological analysis

The CCHFV-specific IgG antibodies in the sera samples were detected using an adapted ELISA method with a commercial kit (Vectorbest, Novosibirsk, Russia) with modifications including the use of goat anti-bovine IgG-HRP conjugate (Southern Biotech, Birmingham, USA) [23, 28]. The reported sensitivity and specificity of the adapted ELISA method were 98% and 99%, respectively [23].

Sera samples were diluted 1:100 in dilution buffer (by manufacturer), and were incubated for 1 h at 37°C. After the wash step, goat anti-bovine IgG-HRP conjugate (Southern Biotech, Birmingham, USA) diluted 1:6.000 in conjugate dilution buffer (by manufacturer) was added to each well. Tetramethylbenzidine (Sigma-aldrich, USA) solution was added to each well after incubation period of 30 min at 37°C. The reaction was stopped with

H2SO4, and optical density of each well was read at 450 nm (reference wavelength 620 nm) filter using a spectrophotometer (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, Vt.) All samples were run in duplicate.

RNA extraction and real-time RT-PCR

RNA extraction was carried out from the buffy coat cells from EDTA whole blood samples using QIAamp Cador Pathogen Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Real-time RT-PCR was performed with primers and probe designed by Wölfel et al. [36] that amplified nucleotides 181-bp region near the 5′-end of the S segment of CCHFV. One step real-time RT-PCR was performed with the QuantiFast Probe RT-PCR plus Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Amplification was carried out in a Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany) with the following conditions: reverse transcription step of 20 min at 50 °C and 5 min at 95 °C, followed by 45 cycles at 94 °C for 15 sec, 59 °C for 30 sec. A set of synthetic oligonucleotides described by Atkinson et al. [3] was used as the positive control, whereas nuclease-free water was used as the negative control for the analyses. The optimization of the assay was carried out by using both positive and negative controls.

Statistical analysis

The confidence interval was calculated using GraphPad InStat version 3.10 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Seroepidemiological study

The result of this study showed that 4 out of 329 sera samples were positive for CCHFV specific antibodies (1.2% prevalence; 95% CI: 0.4%-3.2%) (Table 1). Ages of the seropositive cattle were higher than 4 years old. On the province basis, the highest antibody prevalence (3.4%) was found in the Afyonkarahisar Province whereas no CCHFV-specific antibodies were found in the cattle in the Konya and Aksaray Provinces (Table 1).

Table 1. The seroprevalence of CCHFV infection in the study area

Province	No. examined herds	No. positive herds	CCHFV seroprevalence (%)
Afyonkarahisar	35	2	3.4% (4/118)
Aksaray	25	-	- (0/89)
Konya	34	-	- (0/122)
Total	**94**	**2**	**1.2% (4/329)**

Detection of CCHFV RNA by real-time RT-PCR

CCHFV RNA was not detected in the buffy coat cells from EDTA whole blood samples.

Discussion

Crimean-Congo hemorrhagic fever has been reported in many regions of Asia, the Middle East, Sub-Saharan Africa and South-eastern Europe [5, 9, 13]. The endemic presence of CCHFV in Turkey has already been reported [17, 19, 32].

The first CCHF cases were reported in Turkey in 2002, in the region of Tokat Province, which is located in northern Turkey. After the first cases, CCHF occurred in the regions of the Black Sea and northern parts of the Central Anatolia [19]. Furthermore, CCHFV infection has been reported in non-endemic areas of the Turkey [27, 33]. Afyonkarahisar, Konya and Aksaray Provinces are not located in endemic areas of the Turkey, but the presence of CCHFV infection in the Afyonkarahisar Province was confirmed by existence of clinical human cases in 2008 [34].

In Turkey, most of the studies were conducted to determine the presence of CCHFV in ticks [1, 12, 26, 32, 38]. There are no sufficient data concerning the animal infection with the CCHFV in Turkey. Detection of CCHFV specific immunoglobulins in domestic animals is important indicators for the circulation of CCHFV in a region and risk for human infection [29]. Furthermore, it has been reported that following infection CCHFV specific IgM titers decline to undetectable levels in about sixteen weeks, while IgG titers remain detectable for at

least 5 years [21]. This study therefore investigated the prevalence of CCHFV-specific IgG antibodies in cattle. CCHFV infection status in cattle in Central Anatolia Region and central-west part of the Aegean region of Turkey has not been investigated to the best of found knowledge.

CCHFV specific antibodies were found in cattle in two herds in the Afyonkarahisar Province. No animals were tested positive for CCHFV-specific antibodies in the Konya and Aksaray Provinces. This result can be explained by the number of sampled cattle and the low seroprevalence of CCHF in these provinces. Furthermore, human CCHF cases were reported in the Afyonkarahisar Province whereas no human CCHF cases were reported in the Konya and Aksaray Provinces [34]. Previous studies have been reported a strong association between the appearance of human CCHF cases and seropositivity in the livestock [30].

In this study ages of the seropositive cattle were higher than 4 years old. This finding is consistent with the previous studies reported that probability of exposure of cattle to infected tick in the pasture increases with age [4, 10]. In the present study, seropositive cattle were residing in two herds; it might be an isolated local CCHFV circulation in that area.

Reported seroprevalence of CCHFV in cattle were 1% in the Giza governorate in central Egypt [14], 4.74% in 10 regions of Albania (Has, Kavaje, Kukes, Berat, Kolonje, Pogradec, Rreshen, Korce (Bulgarec/Qatrom) and Gjirokastra) [21], 6.7% in the Maharashtra region of India [24], 6.8% in the Southern Khorasan region of Iran [20], 13% in the Marmara region of Turkey [33], 17.3% in the Vardar region of Republic of Macedonia [23], 31% in the Malishevë municipality in Kosovo [8] and 71% in the Aytos municipality in Bulgaria [4]. The result of this study showed that overall 1.2% (4/329) of the cattle was positive for lgG antibodies to CCHFV. These different serological results can be explained by the competent vector distribution, host preference of tick vectors, climate and environmental changes, detection method, sample size and management conditions [16].

CCHFV infected animals do not show clinical signs but they have a viremic phase lasting up to 7-15 days [30, 35]. There have been few studies on the status of CCHFV infection in animals in Turkey [2, 18, 33]. Albayrak et al. [2] found CCHFV RNA in the blood of small ruminants in northern Turkey. A previous study has detected viral antigens in the blood of cattle in the Marmara region, a non-endemic region, of Turkey [33]. However, in this study CCHFV RNA was not detected in EDTA whole blood samples. This result suggests that sampled animals were not viremic at the time of sampling. It has also been suggested that there is no active circulation of the virus in the investigated regions. Members of the genus *Hyalomma* spp. ticks are the principal vectors of CCHFV [6]. Environmental factors such as temperature, humidity, precipitation and altitude have a significant effect on tick activities and can thus alter the incidences CCHFV infection [7]. Most of the CCHF cases have been reported in the northern part of the country and middle Black Sea region indicating that CCHF is endemic in that region of Turkey [17, 32]. Afyonkarahisar, Konya and Aksaray Provinces are not located in endemic areas of the Turkey. Thus, it can be speculated that environmental factors in the sampled area are not suitable for the spread of the CCHFV infection.

In conclusion, the results of this study indicate that seroprevalence of CCHFV was low in cattle in the investigated regions. Prevalence of CCHFV infection may change depending on the location of the prevalence study, and geographical and environmental factors that affect the abundance of tick population. Therefore, further epidemiological studies are needed to determine distribution of CCHFV in domestic animals in the whole country.

References

1. Albayrak H, Ozan E, Kurt M, (2010). An antigenic investigation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) in hard ticks from provinces in northern Turkey. Trop Anim Health Prod. 42, 1323-1325.
2. Albayrak H, Ozan E, Kurt M, (2012). Serosurvey and molecular detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) in northern Turkey. Trop Anim Health Prod. 44, 1667-1671.
3. Atkinson B, Chamberlain J, Logue CH, Cook N, Bruce C, Dowall SD, Hewson R, (2012). Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. Vector Borne Zoonotic Dis. 12, 786-793.
4. Barthel R, Mohareb E, Younan R, Gladnishka T, Kalvatchev N, Moemen A, Mansour SS, Rossi C, Schoepp R, Christova I, (2014). Seroprevalance of Crimean-Congo haemorrhagic

fever in Bulgarian livestock. Biotechnol Biotechnol Equip. 28, 540-542.

5. Bente DA, Forrester NL, Watts DM, McAuley AJ, Whitehouse CA, Bray M, (2013). Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. Antiviral Res. 100, 159-189.
6. Estrada-Peña A, Zatansever Z, Gargili A, Aktas M, Uzun R, Ergonul O, Jongejan F, (2007). Modeling the spatial distribution of crimean-congo hemorrhagic fever outbreaks in Turkey. Vector Borne Zoonotic Dis. 7, 667-678.
7. Estrada-Peña A, Ostfeld RS, Peterson AT, Poulin R, de la Fuente J, (2014). Effects of environmental change on zoonotic disease risk: an ecological primer. Trends Parasitol. 30, 205-214.
8. Fajs L, Humolli I, Saksida A, Knap N, Jelovšek M, Korva M, Dedushaj I, Avšič-Županc T, (2014). Prevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in healthy population, livestock and ticks in Kosovo. PLoS One. 9:e110982.
9. Formenty P, Schnepf G, Gonzalez-Martin F, Bi Z, (2007). International Surveillance and Control of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Outbreaks. Ergonul O, Onder E, Whitehouse CA. eds. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perspective. Dordrecht, Netherlands: Springer. p. 295-303.
10. Gergova I, Kunchev M, Kamarinchev B, (2012). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus-tick survey in endemic areas in Bulgaria. J Med Virol. 84, 608-614.
11. Gonzalez JP, Camicas JL, Cornet JP, Faye O, Wilson ML, (1992). Sexual and transovarian transmission of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in Hyalomma truncatum ticks. Res Virol. 143, 23-28.
12. Gunes T, Poyraz O, Vatansever Z, (2011). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks collected from humans, livestock, and picnic sites in the hyperendemic region of Turkey. Vector Borne Zoonotic Dis. 11, 1411-1416.
13. Hoogstraal H, (1979). The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. J Med Entomol. 15, 307-417.
14. Horton KC, Wasfy M, Samaha H, Abdel-Rahman B, Safwat S, Abdel Fadeel M, Mohareb E, Dueger E, (2014). Serosurvey for zoonotic viral and bacterial pathogens among slaughtered livestock in Egypt. Vector Borne Zoonotic Dis. 14, 633-639.
15. Ica A, Inci A, Vatansever Z, Karaer Z, (2007). Status of tick infestation of cattle in the Kayseri region of Turkey. Parasitol Res. 101, 167-169.
16. Jameson LJ, Ramadani N, Medlock JM, (2012). Possible drivers of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus transmission in Kosova. Vector Borne Zoonotic Dis. 12, 753-757.
17. Karti SS, Odabasi Z, Korten V, Yilmaz M, Sonmez M, Caylan R, Akdogan E, Eren N, Koksal I, Ovali E, Erickson BR, Vincent MJ, Nichol ST, Comer JA, Rollin PE, Ksiazek TG, (2004). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Turkey. Emerg Infect Dis. 10, 1379-1384.
18. Kirbas A, Ozdemir H, Aksözek A, (2010). The investigation of Crimean-Congo Haemorrhagic fever virus infection seroprevalance in cattle and sheep in Elazığ, Samsun, Sivas, Tokat and Yozgat provinces. Firat Univ J Health Sci. 24, 137-142.
19. Leblebicioglu H, Ozaras R, Irmak H, Sencan I, (2016). Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey: Current status and future challenges. Antiviral Res. 126, 21-34.
20. Lotfollahzadeh S, Nikbakht Boroujeni GR, Mokhber Dezfouli MR, Bokaei S, (2011). A serosurvey of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in dairy cattle in Iran. Zoonoses Public Health. 58, 54-59.
21. Lugaj A, Mertens M, Groschup MH, Bërxhol K, (2014). Serological Survey of CCHFV in Cattle in 10 Regions of Albania. Int J Res Applied, Nat Soc Sci. 2, 55-60.
22. Mertens M, Schuster I, Sas MA, Vatansever Z, Hubalek Z, Guven E, Deniz A, Georgiev G, Peshev R, Groschup MH, (2016). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Bulgaria and Turkey. Vector Borne Zoonotic Dis. 16, 619-623.
23. Mertens M, Vatansever Z, Mrenoshki S, Krstevski K, Stefanovska J, Djadjovski I, Cvetkovikj I, Farkas R, Schuster I, Donnet F, Comtet L, Tordo N, Ben Mechlia M, Balkema-Buschmann A, Mitrov D, Groschup MH, (2015). Circulation of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in the former Yugoslav Republic of Macedonia revealed by screening of cattle sera using a novel enzyme-linked immunosorbent assay. PLoS Negl Trop Dis. 9:e0003519.
24. Mourya DT, Yadav PD, Shete AM, Sathe PS, Sarkale PC, Pattnaik B, Sharma G, Upadhyay KJ, Gosavi S, Patil DY, Chaubal GY, Majumdar TD, Katoch VM, (2015). Cross-sectional Serosurvey of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus IgG in Livestock, India, 2013-2014. Emerg Infect Dis. 21, 1837-1839.
25. Nalca A, Whitehouse CA, (2007). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection among animals. Ergonul O, Onder E, Whitehouse CA eds. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perspective. Dordrecht, Netherlands: Springer. p.155-165.
26. Orkun Ö, Karaer Z, Çakmak A, Nalbantoğlu S, (2017). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks in Turkey: A broad range tick surveillance study. Infect Genet Evol. 52, 59-66.
27. Ozturk SB, Kırdar S, Ertugrul MB, Turan C, Ture M, (2017). A New Endemic Province of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever in Turkey: Aydin. Klimik Dergisi. 30, 9-14.
28. Schuster I, Mertens M, Köllner B, Korytář T, Keller M, Hammerschmidt B, Müller T, Tordo N, Marianneau P, Mroz C, Rissmann M, Stroh E, Dähnert L, Hammerschmidt F, Ulrich RG, Groschup MH, (2016). A competitive ELISA for species-independent detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus specific antibodies. Antiviral Res. 134, 161-166.
29. Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA, (1989). Antibody response in Crimean-Congo hemorrhagic fever. Rev Infect Dis. 11, 801-806.
30. Spengler JR, Bergeron É, Rollin PE, (2016). Seroepidemiological Studies of Crimean-Congo

Hemorrhagic Fever Virus in Domestic and Wild Animals. PLoS Negl Trop Dis. 10:e0004210.

31. Spengler JR, Estrada-Peña A, Garrison AR, Schmaljohn C, Spiropoulou CF, Bergeron É, Bente DA, (2016). A chronological review of experimental infection studies of the role of wild animals and livestock in the maintenance and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. Antiviral Res. 135, 31-47.
32. Tonbak S, Aktas M, Altay K, Azkur AK, Kalkan A, Bolat Y, Dumanli N, Ozdarendeli A, (2006). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: genetic analysis and tick survey in Turkey. J Clin Microbiol. 44, 4120-4124.
33. Tuncer P, Yesilbag K, Alpay G, Dincer E, Girisgin AO, Aydin L, Uyar Y, Ozkul A, (2014). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever infection in domestic animals in Marmara region, Western Turkey. Ankara Univ Vet Fak Derg. 61, 49-53.
34. Vatansever Z, Uzun R, Estrada-Peña A, Ergonul O, (2007). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Turkey. Ergonul O, Onder E, Whitehouse CA. eds. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perspective. Dordrecht, Netherlands: Springer. p. 59-74.
35. Whitehouse CA, (2004). Crimean-Congo hemorrhagic fever. Antiviral Res. 64, 145-160.
36. Wölfel R, Paweska JT, Petersen N, Grobbelaar AA, Leman PA, Hewson R, Georges-Courbot MC, Papa A, Gunther S, Drosten C, (2007). Virus Detection and Monitoring of Viral Load in Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Patients. Emerg Infect Dis. 13, 1097-1100.
37. Yen YC, Kong LX, Lee L, Zhang YQ, Li F, Cai BJ, Gao SY, (1985). Characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (Xinjiang strain) in China. Am J Trop Med Hyg. 34, 1179-1182.
38. Yesilbag K, Aydin L, Dincer E, Alpay G, Girisgin AO, Tuncer P, Ozkul A, (2013). Tick survey and detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in tick species from a non-endemic area, South Marmara region, Turkey. Exp Appl Acarol. 60, 253-261.
39. Yilmaz GR, Buzgan T, Irmak H, Safran A, Uzun R, Cevik MA, Torunoglu MA, (2009). The epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey, 2002-2007. Int J Infect Dis. 13, 380-386.

Broiler Sürülerinde *Ornithobacterium rhinotracheale* İnfeksiyonunun Seroprevalansının ELISA Yöntemi ile Araştırılması

Cenk Güllü[1], Göksel Erbaş[2]

[1]Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
[2] Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Geliş Tarihi / Received: 08.02.2018, **Kabul Tarihi** / Accepted: 06.05.2018

Özet: Gram negatif bir bakteri olan *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), solunum yolu hastalığına sebebiyet veren en önemli patojen etkenler arasında yer almaktadır. ORT hastalığı, tüm dünyada kanatlı endüstrisinde ağır ekonomik kayıplara neden olan, daha çok tavuk ve hindilerde görülen, akut seyirli, yüksek düzeyde bulaşıcı olan bir üst solunum yolu hastalığıdır. Bu çalışmada, Aydın, İzmir ve Manisa illerindeki ticari broiler yetiştirilen kümeslerde, üst solunum yollarında hastalığa ve yüksek verim kayıplarına neden olabilen, *Ornithobacterium rhinotracheale* bakterisinin neden olduğu ORT hastalığının serolojik prevalansının saptanması amaçlanmıştır. Örneklemede Aydın, İzmir ve Manisa illerindeki ticari Broiler yetiştiriciliği yapılan farklı kümeslerden toplanan 420 adet kan örneği kullanılmıştır. Her üç ilden de 140'ar örnek toplanmıştır. Her ildeki 5'er farklı çiftlikten kesim zamanında 28'er adet serum örneği alındı. Toplam 420 adet kan serumunun ELISA testi ile ORT yönünden değerlendirmesinde pozitiflik oranı %55.2 (232 pozitif – 188 negatif) olarak bulunmuştur. Aydın ilindeki pozitiflik oranı %40.8, İzmir ilindeki pozitiflik oranı %68.6, Manisa ilindeki pozitiflik oranı ise %56.4 olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde her üç ildeki sero-pozitiflik oranları da oldukça yüksek bulunmuştur. Pozitiflik oranlarındaki bu yükseklik göz önüne alındığında hastalıkla ilgili daha ayrıntılı çalışmaların planlanmasının gerekliliği ortaya çıkmaktadır. İleriki çalışmalarda serolojik araştırmaların tüm ülke bazında planlanarak yapılması ve de etkenin tam identifikasyonunun yapılarak antibiyotik dirençlilik profilinin çıkarılması hastalıkla mücadele açısından yararlı olacaktır.

Anahtar kelimeler: Broiler, ELISA, *Ornithobacterium rhinotracheale*

Investigation of the seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in broiler hens by ELISA

Abstract: *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), a Gram-negative bacterium, is one of the most important pathogenic agents causing respiratory disease. ORT disease is an acute, highly contagious upper respiratory tract disease seen mostly in chickens and in turkeys, causing severe economic losses in poultry industry all over the world. In this study, it was aimed to determine the serological prevalence of ORT disease in broiler poultry in Aydın, İzmir and Manisa provinces causing upper respiratory tract diseases and high yield losses. For the sampling; 420 blood samples were used and collected from different clusters of Aydın, Izmir and Manisa. A total of 140 samples were collected from each city. Twenty-eight different serum samples were taken at the time of slaughtering from 5 different farms on each side. When a total of 420 blood serum samples were evaluated by ELISA for ORT, the positivity rate was 55.2% (232 positive - 188 negative). The positivity rate in Aydın was 40.8%, İzmir was 68.6% and the Manisa was 56.4%. When the results of the study were evaluated in general, the sero-positivity rates of all three cities were found to be quite high. Considering this high level of positivity, it is necessary to plan more detailed studies about the disease in the near future. In future studies, planning serologic surveys all over the country, as well as the identification of the antibiotic resistance profile by making full identification of the agent will be helpful in combating the disease.

Key words: Broiler, ELISA, Ornithobacterium rhinotracheale

Giriş

Kanatlı endüstrisinin gelişiminde hastalıklar büyük problem teşkil etmektedir. Bunlar içerisinde solunum sistemi hastalıkları önemli rol oynamaktadır [3]. Kanatlılarda solunum yolu hastalıkları bakteriler, mantarlar ve virüsler gibi çeşitli patojenlerden kaynaklanır [7]. *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), solunum yolu hastalığına bağlı ortaya çıkan bir kanatlı patojenidir [11]. ORT, yakın zamanda dünyanın birçok ülkesinden izole edilmiştir. *Ornithobacterium rhinotracheale*, diğer mikroorganizmalarla da sinerji oluşturarak, mortalitenin yükselmesine, ilaç maliyetlerinin artması, yumurta üretimindeki düşüşlere ve yumurta kabuğu kalitesinin

Yazışma adresi / Correspondence: *Göksel Erbaş (ORCID ID: 0000-0002-1839-754X), Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Aydın/Türkiye E-mail: gerbas@adu.edu.tr*

azalması gibi etkilerinden dolayı ciddi ekonomik kayıplara neden olabilmektedir [17]. ORT, Gram-negatif, pleomorfik, çubuk şeklinde, hareketsiz bir bakteridir ve kanatlılarda en önemli patojenlerden biri olarak düşünülmektedir [16, 18].

Şu ana kadar yapılan çalışmalarda ORT'nin en az 18 ORT serotipi olduğu bildirilmektedir. Tavuklarda yapılan serotiplendirme çalışmaları sonucunda, elde edilen izolatların çoğunluğunun A serotipi olduğu ve suşların %95'inin ise A, B, D ve E serotiplerine ait olduğunu ortaya konmuştur [7]. O. rhinotracheale'nin serolojik tanısı için ELISA ve agar jel presipitasyon (AGP) testi kullanılmaktadır. AGP özellikle serotiplendirme için tercih edilen bir yöntemdir. ELISA, ORT'ye karşı antikor varlığını bulmak için günümüzde en doğru ve güvenilir yöntemdir [5]. ELISA serotip spesifitesi ELISA plakalarını kaplamak için kullanılan antijen ekstraksiyon metoduna bağlıdır. O. rhinotracheale'ye karşı antikorların varlığının görülebilmesi için, her yaşta, ya da klinik bulguların görüldüğü kanatlılarda tanısal amaçlar için ELISA testi kullanılabilmektedir [13].

ORT enfeksiyonunun görülme sıklığı ile ilgili ülkemizde geçmiş yıllarda da bazı araştırmalar yapılmıştır [2, 12, 13, 14]. Bu araştırmalar incelendiğinde antikor pozitifliğinin (%50–60 aralığında) oldukça yüksek denebilecek düzeylerde olduğu görülmektedir. Bu yüksek yüzdeler göz önüne alındığında sollunum yolu hastalıkları içerisinde düzenli olarak mücadelesi yapılmayan ORT hastalığı ile ilgili gerekli önlemlerin alınması için çalışmalar yapılması gerekliliği ve bu tip serolojik çalışmaların önemi bir kez daha ortaya çıkmaktadır.

Bu çalışmada, Türkiye'nin batı bölgelerinde yoğun kümes hayvanı yetiştiriciliği yapılan Aydın, İzmir ve Manisa illerindeki Ticari Broiler yetiştirilen kümeslerde, Üst solunum yollarında hastalığa, yüksek verim kayıplarına ve de bundan dolayı önemli maddi zararlara neden olabilen, *Ornithobacterium rhinotracheale* bakterisinin neden olduğu ORT hastalığının ELISA yöntemi ile serolojik prevalansının saptanması amaçlandı.

Materyal ve Metot

Örnekler

Çalışmada Aydın, İzmir ve Manisa illerindeki ticari Broiler yetiştiriciliği yapılan farklı kümeslerden toplanan 420 adet kan örneği kullanıldı. Her üç ilden 140'ar örnek toplandı. Bahsi geçen bu 140 örnek her ildeki 5'er farklı çiftlikten 28'er adet serum örneğinden meydana gelmektedir. Örnekler genel olarak kesim aşamasına gelmiş olan ve etçi amaçlı yetiştirilen 35–45 günlük yaştaki broiler sürülerinden 2017 yılının Mayıs ayı içerisinde alındı. Broilerlerden kan örneklerinin alınması kesim aşamasında gerçekleştirildi. Kanatlılar kesimhaneye getirildiklerinde rasgele seçilmişler ve usulüne uygun bir şekilde kanat alt yüzeyindeki venin dezenfeksiyonu sağlanmış ve iğne ile damara girilerek her bir hayvandan 4-5 ml kadar kan alındı. Kan alımını takiben ven tekrar dezenfeksiyonla temizlenip, hafif bası uygulanarak kanamanın durması sağlandı. Elde edilen kanların serumları çıkartılarak ependorf tüplere aktarıldı. Serumlar çalışılıncaya kadar -20°C'lik derin dondurucuda saklandı.

Serolojik test

Serum örneklerinde *Ornithobacterium rhinotracheale* antikor tespiti Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testi ile belirlenmiştir. ELISA testi için (BioCheck, Millfield Road, Hounslow, Londra) ticari olarak hazırlanmış ELISA kiti üretici firmanın talimatları doğrultusunda kullanılmıştır. Testte kısaca numuneler 1/100 oranında seyreltildi ve OD (Optical Density) değerleri bir ELISA platyt okuyucusu (Biotek ELX800™, USA) üzerinde 405 nm'de ölçüldü. Sonuçlar, numunenin pozitif (S/P) oranı hesaplanarak belirlendi. S/P oranı 0.999 veya daha düşük olan örnekler negatif kabul edildi ve 1'den yüksek S/P değerleri olan örnekler pozitif kabul edildi. S/P oranlarının hesaplanması ve pozitiflik ve negatiflik sonuçlarının oluşturulmasında BioCheck (Millfield Road, Hounslow, Londra) firmasının temin ettiği bilgisayar programından yararlanılmıştır. Çalışma sonucu elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesinde SPSS 22.0 (PASW Inc., Chicago. IL. USA) Paket programı kullanılmıştır ve Ki kare (X^2) testi uygulandı.

Bulgular

Araştırma sonuçlarında her üç ilin toplamında çalışılan 420 adet kan serumunun ELISA testi ile ORT yönünden değerlendirmesinde pozitiflik oranı %55.2 (232 pozitif – 188 negatif) olarak tespit edildi (Tablo 1).

Tablo 1. İllere göre ve toplam ORT ELISA test sonuçları

İLLER	Negatif	Pozitif	Negatif %	Pozitif %	Numune
AYDIN	83	57	59.2	40.8	140
İZMİR	44	96	31.4	68.6	140
MANİSA	61	79	43.6	56.4	140
Toplam	**188**	**232**	**44.8**	**55.2**	**420**

Test sonuçları her il için kümes bazında ayrı ayrı değerlendirildiğinde;

Aydın ilindeki toplam 140 örnekte pozitiflik oranı %40.8 (57 pozitif – 83 negatif) olarak tespit edilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Aydın ili Broiler çiftlikleri ORT ELISA test sonuçları

AYDIN İLİ	Gün	Negatif	Pozitif	Negatif %	Pozitif %	Numune
KÜMES A	44	13	15	46.4	54.6	28
KÜMES B	42	8	20	28.5	71.5	28
KÜMES C	43	19	9	67.8	32.2	28
KÜMES D	38	25	3	89.3	10.7	28
KÜMES E	43	18	10	64.3	35.7	28
Toplam	**42**	**83**	**57**	**59.2**	**40.8**	**140**

İzmir ilindeki toplam 140 örnekte pozitiflik oranı %68,6 (96 pozitif – 44 negatif) olarak tespit edilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. İzmir ili Broiler çiftlikleri ORT ELISA test sonuçları

İZMİR İLİ	Gün	Negatif	Pozitif	Negatif %	Pozitif %	Numune
KÜMES A	**42**	17	11	60.7	39.3	28
KÜMES B	44	5	23	17.9	82.1	28
KÜMES C	41	16	12	57.1	42.9	28
KÜMES D	43	4	24	14.3	85.7	28
KÜMES E	42	2	26	7.1	92.9	28
Toplam	**42.4**	**44**	**96**	**31.4**	**68.6**	**140**

Manisa ilindeki toplam 140 örnekte pozitiflik oranı %56.4 (79 pozitif – 61 negatif) olarak tespit edilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Manisa ili Broiler çiftlikleri ORT ELISA test sonuçları

MANİSA İLİ	Gün	Negatif	Pozitif	Negatif %	Pozitif %	Numune
KÜMES A	40	13	15	46.4	53.6	28
KÜMES B	39	10	18	35.7	64.3	28
KÜMES C	43	2	26	7.1	92.9	28
KÜMES D	43	15	13	53.6	46.4	28
KÜMES E	41	21	7	75.0	25.0	28
Toplam	**41.2**	**61**	**79**	**43.6**	**56.4**	**140**

İller bazında ORT antikoru görülme olasılığı bakımından beklenilen düzeyde pozitif veya negatif serum örneği gözlenip gözlenmediğini test etmek için Ki-kare (X^2) testinden yararlanılmıştır. Sonuçları içeren tüm veriler Tablo 5'de verilmektedir. Bu sonuçlara göre İzmir ilindeki ORT pozitiflik oranı beklenilen frekanstan önemli derecede yüksek, Aydın ilinde düşük, Manisa ilinde ise beklenen düzeye yakın bulunmuştur ($p<0,001$).

Tablo 5. Çalışma sonuçlarının genel değerlendirilmesi

İLLER ARASI SONUÇLAR				
		Antikor		Toplam
		Negatif	Pozitif	
AYDIN	Adet	83	57	140
	% İl içi	%59.3	%40.7	%100.0
	% Antikor	%44.1	%24.6	%33.3
İZMİR	Adet	44	96	140
	% İl içi	%31.4	%68.6	%100.0
	% Antikor	%23.4	%41.4	%33.3
MANİSA	Adet	61	79	140
	% İl içi	%43.6	%56.4	%100.0
	% Antikor	%32.4	%34.1	%33.3
Toplam	**Adet**	**188**	**232**	**420**
	Toplam %	**%44.8**	**%55.2**	**%100.0**

X^2=22.090***, ***= P<0.001

Tartışma ve Sonuç

Bu araştırmada Aydın, İzmir ve Manisa illerinden alınan toplam 420 adet kan serumunun %55.2'si (232 pozitif, 188 negatif) *Ornithobacterium rhinotracheale* antikorları açısından pozitif bulundu. Turan ve Ak [13] Marmara ve Karadeniz bölgelerindeki farklı çiftliklerde yaptıkları serolojik çalışmalarda %65 oranında serum pozitifliği saptamışlardır. *O. rhinotracheale* infeksiyonunun seroprevalansın ticari bir ELISA kiti ile belirlendiği ve Güney Marmara bölgesinde yürütülen başka bir çalışmada ise incelenen 821 serum örneğinin 440'ı (%53.59) *O. rhinotracheale* antikorları yönünden pozitif saptanmıştır [4]. Özbey ve ark. [12] Elazığ'da yapmış oldukları çalışmada tavuklardan toplanan 324 serum örneğinde ELISA testi kullanarak ORT antikorları açısından %10.2 (33 adet) pozitiflik saptandığını bildirmişlerdir. Araştırmalarında 10 adet broiler çiftliğinden ikisinde pozitiflik bulunmuştur.

Sonuçlar açısından araştırmamızla karşılaştırıldığında büyük bir farklılık gözükmektedir. Özbey ve ark. [12] çalışmalarında kullandıkları tavukların oldukça genç olmasının bu farklılığı yaratabileceğini bildirmektedirler. Çünkü antikor titreleri genellikle enfeksiyon sonrası 1 ila 4 hafta arasında en yüksek seviyeye ulaşmakta ve tespit edilebilmektedir [16]. Türkyılmaz ve Kaya [14] Aydın ilinde 267 tavuk örneği ile yaptığı çalışmasında ELISA testi ile %66.3 oranında seropozitiflik saptamıştır ve çalışmaları Aydın ilinde ORT hastalığının ELISA ile değerlendirildiği ilk çalışmadır. Çalışmamızda yalnızca Aydın ili sonuçlarımız değerlendirildiğinde %40.8 lik bir pozitiflik saptanmıştır. Bu da Türkyılmaz ve Kaya [14] ile Turan ve Ak [13]'ın sonuçlarından biraz düşük olmasına rağmen her üç ilin toplam sonuçlarına incelendiğinde (% 55.2) benzer sonuçlara ulaşılmaktadır. Çalışma sonuçları Aşyemez'in [4] sonuçları ile ise oldukça paralellik göstermektedir.

Aras ve ark. [2], ticari yumurtacı tavuk işletmelerinde bulunan tavuklarda *Ornithobacterium rhinotracheale* enfeksiyonunun serolojik prevalansının belirlenmesini amaçladıkları çalışmalarında Konya, Aksaray, Karaman, Ankara ve Gaziantep illerinde bulunan 26 farklı kümesteki yumurtacı tavuklardan 650 kan serum örneği toplamışlar ve oluşan antikorların varlığını ELISA testi ile belirlemişlerdir. Çalışmalarının sonuçlarına bakıldığında Toplam 650 kan serum örneğinden 113 (%17.4)'ünde *O. rhinotracheale* antikoru tespit etmişlerdir. Çalışma sonunda bu pozitif örneklerin, örnekleme yapılan 26 kümesten 12 (%46.2)'sinden toplandığı ve bu enfekte 12 kümesin Konya, Gaziantep, Ankara ve Karaman illerindeki 12 farklı çiftliğe ait olduğu bildirilmiştir.

Canal ve ark. [6], Brezilya'nın güneyinde broiler tavukların (%63.83) ve damızlık broylerlerin (%100) pozitifliğe sahip oldukları ve de sürülerde solunum semptomları ile *O. rhinotracheale* antikorları arasında pozitif bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir. İran'ın Batı Azerbaycan Eyaleti'nde Allymehr [1] *O. rhinotracheale*'ye karşı yapmış olduğu serolojik araştırmalarda tavuklardan alınan serum örneklerinin %44.2'sini pozitif olarak bildirmiştir. Bundan birkaç yıl sonra, Ghanbarpour ve Mahmood [8] İran'ın Güney doğusunda yaptıkları bir çalışmada 8 farklı çiftlikte bulunan 21 kümesten 420 serum örneği ile çalışmışlardır. Çalışmalarında ELISA testi ile *Ornithobacterium rhinotracheale*'ye karşı 6 çiftlikte bulunan 17 kümeste 134 adet (% 31.9) seropozitiflik saptamışlardır.

Mousavi ve ark. [10], İran'ın kuzeyindeki Guilan eyaletinde 2000 yılında 30-35 ve 40-45 günlük broiler tavuk çiftliklerini kapsayan çalışmalarında 32 sürüden alınan 640 serum numunesini ELISA testi ile incelemiş ve sürülerin ORT'e karşı antikor tespit etmişlerdir. Sonuçta 10 sürüde (%30.44) pozitif, 7 sürü (%21.74) şüpheli, 15 sürü (%7.82) istatiksel olarak negatif bulunmuştur. Toplanan 640 serum numunesinden, 30-35 günlük yaştaki sürülerde 24 pozitif, 30 şüpheli, 266 örnek ise negatif olarak tespit etmişlerdir. 40-45 günlük yaştaki numunelerde ise 178 numune pozitif, 77 numune şüpheli, 65 numunenin ise negatif olduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, ticari broiler tavuklarında antikor titreleri ile broiler yaşı arasında orantılı ORT antikor prevalansının pozitif korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir ($p<0.05$). Çalışmamızda ise kesim yaşındaki broiler sürüleri incelendiği için yüksek pozitiflik oranlarının bundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Chansiripornchai ve ark. [7] Tayland'da yaptıkları ve *Ornithobacterium rhinotracheale* sero-prevalansının ülkelerinde ilk defa incelendiği çalışmada örnekleme yaptıkları tüm çiftliklerde pozitiflik saptamışlardır. İnceledikleri broiler çiftliklerinde %19.8 ve damızlık broiler çiftliklerinde ise %49.8 oranında pozitiflik bildirmişlerdir. Amerika Birleşik Devletlerinde yumurtacı tavuklarda yapılan bir araştırmada da örnekleme yapılan tüm çiftliklerde sero-pozitiflik saptanmış ve ELISA ile elde edilen ORT pozitiflik oranı ise çalışmamıza benzer şekilde % 52 olarak bulunmuştur [9]. Uriarte ve ark. [15] Arjantinin Buenos Aires, Santa Fe, Entre Rios şehirlerinde ELISA ile yaptıkları araştırmada 739 adet serum analizinden 345 adeti (%47) ORT serum pozitif tespit etmişlerdir. Baksi ve ark. [5] Hindistan'ın yedi eyaletinden alınan serum örnekleri ile ORT'ye karşı antikor varlığının tespiti için çalışmışlar ve %74.37 düzeyinde pozitiflik saptamışlardır. Aynı zamanda araştırmalarında yaş ve mevsimin hastalık parametreleri üzerine etkisini de değerlendirmişlerdir. Kesim zamanı olarak değerlendirilen 41-50 haftalık yaş grubu diğer yaş gruplarına göre en yüksek pozitiflik oranına sahip olarak bildirilmiştir. Araştırmalarının sonucuna göre hastalık en çok mu-

son mevsiminde görülürken (%88.31), kış aylarında ise daha az (%62.20) pozitiflik oranlarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Araştırmamızda ise örnekleme Mayıs ayı içerisinde yapılmıştır. Bununla birlikte örneklemenin yapıldığı Ege bölgesinin batı kesimi ise hava sıcaklıklarının genelde yüksek olduğu yerler olarak söylenebilir. Bundan dolayıdır ki ülkemizin diğer yerlerine göre hastalığın biraz daha yüksek yüzde de görülebileceği düşünülmektedir.

Araştırmada aynı zamanda çiftlikler bazında da sonuçlar verilmiştir (Tablo2, 3 ve 4). İllerdeki çiftliklere göre yapılan değerlendirmelerde her üç ilde de yüksek pozitiflik oranlarına sahip olan çiftliklerin birbirlerine yakın olması oldukça dikkat çekici olarak kabul edilmiştir. Özellikle Aydın ilinde %10.7 pozitiflik oranına sahip olan çiftlik diğer çiftliklere oldukça uzak olup çevresinde herhangi bir kanatlı barınağının bulunmaması çiftlikler arası bulaşmanın olabileceğini düşündürmektedir.

ORT hastalığının diğer viral hastalıklarla birlikte seyredebilmesi, ya da gösterdiği klinik belirtiler açısından birçok viral hastalıkla karıştırılması önemli bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. Hastalığın tespitinde yapılan yanlış değerlendirmeler sonucunda özellikle büyük entegrelerin ciddi mali kayıplarla karşılaşacağı görülmektedir. ORT'nin ülkemize verdiği zararları tespit etmek için üstünde daha fazla çalışma ve araştırılma yapılması gereken bir konudur. Primer ya da sekonder olarak görülmesi ve sürekli yaşanılan solunum yönlü viral hastalıkların arkasına saklanması neticesinde yanlış aşılama ve koruyucu tedbirler nedeniyle yayılma eğilimi göstermesi ve içinden çıkılması güç durumlara kanatlı sektörünü sokması kaçınılmazdır. İleriki çalışmalarda serolojik çalışmaların yanında bakterinin izolasyonu ve identifikasyonunun da yapılarak çok değişken olabilen antibiyotik dirençliliklerinin de yapılarak tedavisi için gerekli tedbirlerin alınması önerilebilir.

Solunum sistemini etkileyen hastalıkların tespiti yapılırken ORT'nin her zaman dikkate alınması ve ülkemizdeki yoğun kanatlı üretiminde gerekirse aşılama programlarına eklenmesi dâhil bütün koruma önlemlerinin alınması gerekmektedir.

Teşekkür

Çalışmada yapılan istatistiksel analizlerde yardımını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Erbay BARDAKÇIOĞLU'na Teşekkür ederiz. Çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-17013 nolu proje numarası ile desteklenmiştir. Ayrıca araştırmanın yapılmasında, Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun (HADYEK) 17.01.2017 tarihli 2017 yılı 1. oturumunda alınan 64583101/2017/005 numaralı karar gereği etik açıdan bir sakınca bulunmamıştır. Bu çalışma Veteriner Hekim Cenk GÜLLÜ'nün Yüksek Lisans Tez Çalışmasından özetlenmiştir.

Kaynaklar

1. Allymehr M, (2006). Seroprevalence of Ornithobacterium rhinotracheale infection in broiler and broiler breeder chickens in west Azerbaijan province, Iran. J Vet Med A. 53, 40-42.
2. Aras Z, Sayın Z, Sanioğlu G, (2016). Serologic prevalence of Ornithobacterium rhinotracheale infection in commercial layers. Eurasian J Vet Sci. 32(1), 22-25.
3. Arda M, Minbay A, Aydın N, Akay Ö, İzgür M, (1994). Kanatlı Hayvan Hastalıkları, Genişletilmiş 3. Baskı, Ankara: Medisan Yayınevi Türkiye, 73-230.
4. Aşyemez AÜ, (2004). Güney Marmara bölgesinde hindi ve tavuklarda Ornithobacterium rhinotracheale infeksiyonu üzerinde bakteriyolojik ve serolojik çalışmalar. Doktora tezi. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
5. Baksi S, Rao N, Chauhan P, (2017). Seroprevalence of Ornithobacterium rhinotracheale in broiler breeders in India. PSM Vet Res. 2(2), 29-32.
6. Canal CW, Leão JA, Ferreira DJ, Macagnan M, Salle CTP, Back A, (2003). Prevalence of antibodies against Ornithobacterium rhinotracheale in broiler and breeders in southern Brazil. Avian Dis. 47, 731-737.
7. Chansiripornchai N, Wanasawaeng W, Sasipreeyajan J, (2007). Seroprevalence and identification of Ornithobacterium rhinotracheale from broiler and broiler breeder flocks in Thailand. Avian Dis, 51, 777-780.
8. Ghanbarpour R, Mahmood S, (2009). Sero-prevalence and identification of Ornithobacterium rhinotracheale in broiler flocks in south-eastern Iran. Trop Anim Health Prod. 41, 1679-1683.
9. Heeder CJ, Lopes VC, Nagaraja KV, Shaw DP, Halvorson DA, (2001). Seroprevalence of Ornithobacterium rhinotracheale infection in commercial laying hens in the north central region of the United States. Avian Dis. 45, 1064-1067.
10. Mousavi SM, Hassanzadeh M, Khoshkhoo PH, Azad GA, (2012). Detection and Prevalence antibodies against Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) by ELISA in broiler chicken farms in Guilan Province, Iran. Glob Vet. 8(2), 133-138.
11. Murthy TRGK, Dorairajan N, Balasubramanium GA, Dinakaran AM and Saravanabava K, (2008). In vitro antibi-

otic sensitivity of Ornithobacterium rhinotracheale strains isolated from laying hens in India. Veterinarski Arhiv. 78, 49-56.

12. Özbey G, Öngör H, Balık DT, Çelik V, Kılıç A, Muz A, (2004). Investigations on Ornithobacterium rhinotracheale in broiler flocks in Elazig province located in the East of Turkey. Vet Med Czech. 49(8), 305-311.
13. Turan N, Ak S, (2002). Investigation of the presence of Ornithobacterium rhinotracheale in chickens in turkey and determination of the seroprevalence of the infection using the enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Dis. 46, 442-446.
14. Türkyılmaz S, Kaya O, (2005). Detection of antibodies produced against Ornithobacterium rhinotracheale and Bordetella avium by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in hens and turkeys in Aydın Province, Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 29, 897-902.
15. Uriarte J, Corva S, Gornatti D, Origlia J, Píscopo M, Cerda R,Herrero M, Marcantoni H, Unzaga MF, Marino F, Spinsantti E,Pecoraro M, Petruccelli M, (2010). Evidencia serológica de infección en aves comerciales por Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) en las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos (Argentina). Analecta Vet. 30(1), 34-36.
16. Van Empel PCM, Hafez HM, (1999). Ornithobacterium rhinotracheale: a review. Avian Pathol. 28, 217-227.
17. Vandamme P, Segers P, Vancaneyt M, van Hover K, Mutters R, Hommez J, Dewirst F, Paster B, Kersters K, Falsen E, Devrieze L, Bisgaard M, Hinz KH, Mannheim W, (1994). Description of Ornithobacterium rhinotracheale gen. nov. sp. nov. isolated from the avian respiratory tract. Int J Syst Bacteriol. 44, 24-37.
18. Zorman-Rojs O, Zdovc I, Bencina D, Mrzel I, (2000). Infection of turkeys with Ornithobacterium rhinotracheale and Mycoplasma synoviae. Avian Dis. 44, 1017-1022.

Isparta Bölgesinden Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğüne Gönderilen Numunelerin Parazitolojik Açıdan Değerlendirilmesi

Mehmet Acıöz[1]

[1]*İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Datça, Muğla, Türkiye.*

Geliş Tarihi / Received: 16.11.2017, **Kabul Tarihi** / Accepted: 18.04.2018

Özet: Bu çalışma; Isparta bölgesinden Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü (KONYAVKEM)'ne gönderilen numunelerin ve sonuçların retrospektif olarak değerlendirilmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, 2014, 2015 ve 2016 yıllarında Isparta bölgesinden KONYAVKEM gönderilen dışkı, kadavra, kan ve organlar parazitoloji laboratuvarında muayene edilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Gönderilen 74 numuneden 44'ünde (% 59.4) paraziter etken tespit edilmiştir. Tüm hayvan gruplarında sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde; *Eimeria spp.* % 22.9*, Cryptosporidium spp.* % 13.5, *Toxoplasma gondii* % 8.1, *Trichostrongylus spp*. % 5.4, *Nematodirus spp*. % 2.7, *Moniezia spp.* % 1.3, *Fasciola hepatica* % 1.3, *Cystacaulus ocreatus* larvası % 1.3, *Coenurus cerebralis* % 1.3 ve *Babesia spp.* % 1.3 olarak bildirilmiştir. Sonuç olarak, veteriner hekimlere, sivil toplum kuruluşlarına paraziter hastalıklar hakkında bilgi verilmedir. Bu çalışma ile veteriner parazitolojinin, Isparta bölgesinde hayvan sağlığı ve yetiştiriciliği açısından önemi vurgulanmıştır.

Anahtar kelimeler: Hayvan Sağlığı, Isparta, Paraziter Enfeksiyonlar

The Parasitologic Evaluation of The Samples Sent from Isparta to Veterinerian Control Instution of Konya

Abstract: This study aims to evaluate the samples taken throughout Isparta and sent to the Institute of Veterinerian Control in Konya (KONYAVKEM) in terms of parasitology. The feces, cadaver, blood and the organs sent to KONYAVKEM from Isparta in 2014, 2015 and 2016 were examined in the parasitology laboratory and the results were evaluated. 44 samples out of 74 (59.4%) were realized to have parasitic infection. As far as the results are evaluated including all the animal species, it is stated as follows; *Eimeria spp*. 22.9%, *Cryptosporidium spp*. 13.5%, *Toxoplasma gondii* 8.1%, *Trichostrongylus spp*. 5.4%, *Nematodirus spp*. 2.7%, *Moniezia spp*. 1.3%, *Fasciola hepatica* 1.3%, *Cystacaulus ocreatus* larvae 1.3%, *Coenurus cerebralis* 1.3% and *Babesia spp*. 1.3%. This ultimately shows that veterinerians and non-profit organizations must be informed about parasitic disease. The focus of this study is that veterinerian parasitology is important for animal health and breeding in Isparta.

Key words: Animal health, Isparta, Parasitic infection

Giriş

Afyonkarahisar, Antalya, Burdur, Konya ve Isparta'yı da kapsayan bölgeye göller yöresi denilmektedir. 36.672 km² alana sahip bölgenin fazla yağış alması sebebiyle bu bölge büyükbaş ve küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinde önemli bir potansiyele sahiptir [1].

Özellikle Isparta ekonomisinde hayvan yetiştiriciliği önemli bir yer tutmaktadır. 2016 yılı Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre Isparta İli'nde 149382 adet sığır, 347 manda, 250158 koyun ve 304697 adet keçi mevcuttur [6].

Küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinde temel beslenme aracı olan çayır, mera ve yaylaların korunması ve en etkin şekilde değerlendirilmesi, hayvancılık ekonomisine (et, süt, yapağı) büyük katkı sağlayacaktır. Ayrıca köy ve mezralardaki insanların yaşam standartlarının artması, büyükşehirlere göçünde önlenmesinde büyük katkısı olacaktır[4].

Türkiye'de tarımsal verimlilik ve tarım dışı istihdam düşük, tarımın nüfus içindeki payı kabaca % 33 ve tarımın gayri safi milli hasıladaki payı kabaca %12'dir. Gelişmiş ülkelerin çok gerisinde kalmıştır. Bu durum hayvancılık sektörüne olumsuz yönde etkilemiştir [19]. Paraziter hastalıklar, hayvanlarda verim kayıplarına neden olarak ülke ekonomisini olumsuz yönde etkilemektedir. Bunlar et, süt, döl verimi, yavru kayıpları olarak sıralanabilir [21,24,25].

Yazışma adresi / Correspondence: *Mehmet Acıöz (ORCID: 0000-0002-8888-2794), İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Datça, Muğla, Türkiye. E-posta: mehmetacioz@hotmail.com*

Paraziter kökenli enfeksiyonlar, parazitin türü, morfolojik özellikleri, sayıları, yerleştikleri organ ve dokular, beslenme şekillerine göre farklılık göstermekle birlikte, kilo-besi kaybı, göçleri sırasında organ ve dokularda tahribat, ishal, anemi, sancı ve ciddi olgularda ölüme yol açabilecek çeşitli patojenitelere sahiptir [12,25].

Paraziter hastalıklardan bazıları zoonoz karakterde olmalarından dolayı da önem arz ederler. Sağlık Bakanlığı verileri göre, 2005-2010 yılları arasında insanlarda 2057 kist hidatik vakası rapor edilmiştir [5].

Bu çalışmada, 2014, 2015 ve 2016 yıllarında Isparta İli'nden KONYAVKEM'e gönderilen numunelerin parazitoloji açısından irdelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırma materyalini 2014, 2015 ve 2016 yıllarında Isparta İli'nden KONYAVKEM'e gönderilen numuneler oluşturmuştur. Bu amaçla "Hayvancılık Bilgi Sistemi" (HBS)'nden gönderilen marazi maddeler ve paylaşılan protokoller incelenmiştir [3]. Bu protokollere ait veriler (ilçe, yıl, adet, yaş, nevi ve türü) tek tek kontrol edilmiştir. Gönderilen numuneler rutin teknikler kullanılarak çalışılmıştır. Kan protozoonları açısından giemasa boyası ile hazırlanan frotiler incelenmiştir. Otopsi yapılan hayvanlar erişkin parazitleri görmek amacıyla makroskopik olarak muayene edilmiştir. Kan serumları rutin ELISA yöntemiyle bakılmıştır. Dışkı örnekleri önce makroskobik, daha sonra sırayla direkt bakı, flotasyon ve sedimentasyon yöntemleriyle mikroskobik olarak incelenmiştir [16]. Sonuçlar tartışılmış ve Isparta'da görülen parazitler hakkında genel bir bilgi elde edilmiştir.

Bu çalışma için HADMEK'in 05.06.2009 tarih ve 12 sayılı kararına istinaden etik kurul onayı alınmamıştır.

İstatistiksel analiz

Bu çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizi için , Statistical Package for the Social Sciences for Windows 16.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, ABD) paket programı kullanılmıştır.

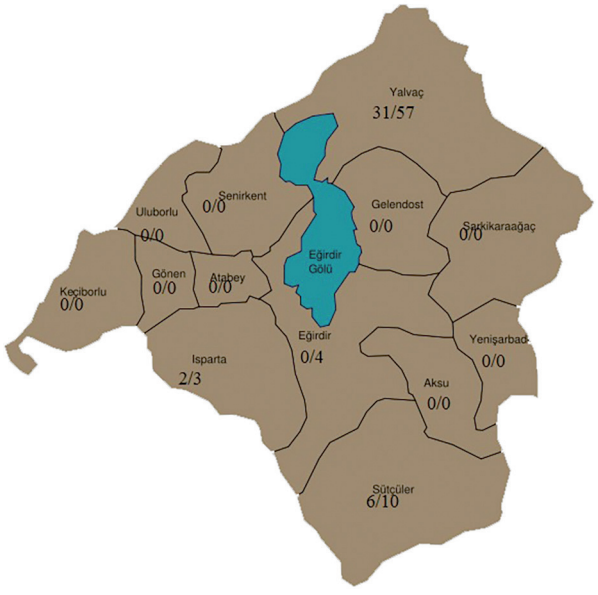
Bulgular

Isparta'dan 3 yılda (2014, 2015 ve 2016) KONYAVKEM Parazitoloji Laboratuarına, koyun, keçi ve sığır cinsi hayvanlara ait toplam 74 adet marazi madde gönderilmiştir. İncelenen 74 marazi maddeden 44'inde paraziter etken tespit edilmiştir. Gönderilen numunelerde enfekte hayvan sayısı ve incelenen hayvan sayısı Şekil 1'de gösterilmiştir. Hayvan gruplarına göre tespit edilen parazit cins/türleri ve oranları tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. İncelenen hayvanlara göre parazit cins/türleri ve oranları

Parazit	Koyun		Kuzu		Keçi		Oğlak		Sığır		Toplam	
	EHS*	%	EHS	%	EHS	%	EHS	%	EHS	%	EHS	%
Eimeria spp.	1	4,5	11	33,4	3	37,5	2	18,1	-	-	17	22,9
Cryptosporidium spp.	-		5	16,1	-	-	3	27,2	-	-	10	13,5
Toxoplasma gondii	6	27,2	-	-	-	-	-	-	-	-	6	8,1
Trichostrongylus spp.	1	4,5	1	3,2	2	25	-	-	-	-	4	5,4
Nematodirus spp.	1	4,5	-	-	1	12,5	-	-	-	-	2	2,7
Moniezia spp.	-		1		-	-	-	-	-	-	1	1,3
Fasciola hepatica	1	4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1,3
Cystacaulus ocreatus larvası	-		-	-	1	12,5	-	-	-	-	1	1,3
Coenurus cerebralis	1	4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1,3
Babesia spp.	1	4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1,3

*EHS: Enfekte Hayvan Sayısı



Şekil 1. Enfekte bulunan hayvanların ilçelere göre dağılımı (Enfekte hayvan sayısı/incelenen hayvan sayısı).

Tartışma ve Sonuç

Isparta ilinde parazitoloji alanında yapılan çalışmalar çok sınırlıdır. Demirci ve ark. 2003 yılında yaptıkları çalışmada, Isparta'nın da içinde bulunduğu göller bölgesinin insan fasciolosisi için endemik olduğunu bildirmişlerdir [10]. Bizim çalışmamızda da koyunlarda % 1.3 oranında fasciolosis bildirilmiştir. Bu hastalığın yöre insanını ve hayvan sağlığını tehdit edebileceğine düşünülmektedir.

Burdur yöresinde buzağı ve danalarında % 26.5, Afyon ilinde sığırlarda % 26.5, Bingöl'de keçilerde % 61.5, koyunlarda % 56, Adana, Mersin ve Osmaniye gelen oğlaklarda % 23.53 oranında, *Eimeria spp*. enfekte olduğu bildirilmiştir [8,11,15,17]. Bu çalışmada da % 22.9 oranında *Eimeria spp*. bulunmuş olup yukarıda belirtilen çalışmalar ile uyumludur.

Van ilinde sığırlarda % 8.14, koyunlarda % 13.17, keçilerde % 10.71, Nevşehir'de ishalli buzağılarda %20.7, Aydın'da keçilerde % 18.6, Sivas'ta buzağılarda % 70.3, Erzurum' da buzağılarda ise % 22.8 oranında *Cryptosporidium spp*. enfekte olduğu bildirilmiştir [7,9,18,20,23,]. Isparta'da bir keçi sürüsünde 3 ölü, 130 ishalli oğlakların tamamında *Cryptosporidium parvum* ookisti tespit edilmiştir [22]. Bu enfeksiyonunun yaygınlığı ile yapılan çalışmalarda prevalans oranlarının farklı olması, alınan numunelerin, hayvanların sağlık durumu, yaşı ve sürülerde salgın olup olmaması gibi faktörlere bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Toxoplasmosis özellikle koyunlarda abortlara ve neonetal kuzu ölümlerine neden olmaktadır. Aktaş ve ark. 1997 yılında Elazığ yöresinde yapıkları çalışmada, gebe koyunlarda % 48.2, önceki yıl yavru atmışlarda ve kan alındığı yıl yavru atan koyunlarda sırayla %45,6, %46,3 oranında *T.gondii* sero-pozitiflik saptamışlar [2]. Yapılan başka bir çalışmada, *T. gondii* ile sero-pozitif koyunlardan doğan kuzularda neonetal ölüm oranın %30,7, sero-negatif annelerden doğan kuzularda bu oran %13,6 olarak saptanmıştır [13]. Bizim çalışmamızda da koyunlarda % 8.1 oranında *T. gondii* saptanmış olup, bu enfeksiyonun yöre koyunculuğu için tehdit oluşturabileceği düşünülmektedir.

Türkiye'de koyunlarda, coenurosis yaygınının %1.3 ile %36.8 oranları arasında olduğu bildirilmiştir [14,26]. Bizim çalışmamızda % 1.3 oranda bulunan Coenurosis cerebralis Türkiye'de bildirilen oranlar arasındadır.

Ayrıca bu çalışmada Isparta yöresinde ruminatlarda, *Trichostrongylus spp*., *Nematodirus spp*., *Moniezia spp*., *Cystacaulus ocreatus* larvası. gibi etkenler belirlenmiştir. Hayvan yetiştiriciliği açısından verim kayıplarına neden olan bu parazitlerin var olması, herkes tarafından dikkate alınması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile Isparta bölgesinde hayvan sağlığı ve yetiştiriciliği açısından önemli parazitler vurgulanmıştır.

Teşekkür

Katkılarından dolayı Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü çalışanlarına teşekkür ederim.

Kaynaklar

1. Akman, Y, (1990). *İklim ve Biyoiklim*. Ankara: Palme Yayıncılık, s. 319.
2. Altıntas K, Güngör C, Zeybek H, Yaralı C, (1997). *Sabin-Feldman testi ile Ankara yöresi koyunlarında Toxoplasma gondii' nin prevalansının saptanması*. Türkiye Parazitol Derg. 21, 63-65.
3. Anonim, (2017). *HBS (Protokol Sonuç Raporu*). http://www.tarim.gov.tr, Erişim tarihi: 05.01.2017.
4. Anonim, (2001). *Isparta Valiliği; Isparta İli Çevre Durum Raporu*. http://www.csb.gov.tr, Erişim tarihi: 12.01.2017.

5. Anonim, (2011). *TC Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Zoonotik Hastalıklar Daire Başkanlığı. Zoonotik Hastalıklar Hizmet içi Eğitim Modülü*. Sağlık Bakanlığı Yayın No: 799; Ankara,

6. Anonim, (2016). *TUİK, 2016 Yılı Hayvansal üretim istatistikleri*. http://www.tuik.gov.tr, Erişim tarihi: 11.01.2017.

7. Çiçek M, Körkoca H, Gül A, (2008). *Van belediye mezbahasında çalışan işçilerde ve kesimi yapılan hayvanlarda Cryptosporidium sp.'nin araştırılması*. Türkiye Parazitol Derg. 32, 8-1.

8. Çiçek H, Sevimli F, Kozan E, Doğan N, (2007). *Prevalence of coccidia in beef cattle in western Turkey*. Parasitology Research. 101, 1239-43.

9. Değerli S, Çeliksöz A, Kalkan K, Özçelik S, (2005). *Prevalence of Cryptosporidium spp. and Giardia spp. in cows and calves in Sivas.* Turk J Vet Anim Sci. 29, 995-999.

10. Demirci M, Korkmaz M, Kaya S, Kuman A, (2003). *Fascioliasis in eosinophilic patients in Isparta region of Turkey*. Infect. 31,15-18.

11. Gül A, Kılınç ŞG, (2016). *Bingöl Belediye Mezbahasında kesimi yapılan koyun ve keçilerde dışkı bakılarına göre endoparazitlerin yaygınlığının araştırılması*. Dicle Üniv Vet Fak Derg. 2, 61-66.

12. Güralp N, (1981). *Helmintoloji* (2 baskı). Ankara: Ankara Üniv Vet Fak Yayın:368.

13. Huffman EM, Kirk JH, Pappaioanou M, (1985). *Factors associated with neonatal lamb mortality*. Theriogenology. 24, 163-171.

14. Kalkan A, (1977-1978). *The study fixing parasitic fona in sheep and lamb in Diyarbakır represinting to in the South East Anatolian Regions*. Etlik Vet. Kont. Araşt. Enst. Derg. 4, 64-78.

15. Köse O, (2011). *Burdur Yöresi Buzağı ve Danalarında Eimeria Türlerinin Prevalansı.* Yüksek Lisans Tezi, Mehmet Akif Üniv Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Burdur.

16. MAFF, (1986). *Manual of Veterinary Parasitological Techniques*. London: Her Majesty's Stationary Office. p. 160.

17. Özdemir R, Çaya H. Adana, (2012). *Mersin ve Osmaniye İllerinden Gelen Oğlaklarda Coccidiosisin Prevalansının Araştırılması.* AVKAE Derg. 2, 6-9.

18. Paşa S, Ulutaş B, (2003). *Prevalence of Cryptosporidium oocysts in goats in Aydın province.* Türkiye Parazitol Derg. 27, 240-242.

19. Saraçoğlu M, (2006). *Tarımsal Yapının AB Üyeliği Açısından Değerlendirilmesi,* Kamu-İş İş Hukuku ve İktisat Dergisi. 4, 8-16.

20. Sarı B, Aktaş MS, Arslan MÖ, (2008). *Erzurum Yöresinde Buzağılarda Cryptosporidium Türlerinin Prevalansı.* Türkiye Parazitol Derg. 32, 116-119.

21. Sarıözkan S, Yalçın C, (2009). *Estimating the production losses due to cystic echinococcosis in ruminants in Turkey.* Vet Parasitol. 163: 330-4.

22. Sevinç F, Şimşek A, Uslu U, (2005). *Massive Cryptosporidium parvum infection associated with an outbreak of diarrhoea in neonatal goat kids*. Turk J Vet Anim Sci. 29: 1317- 1320.

23. Şimşek AT, et al, (2012). *Nevşehir yöresindeki yeni doğan ishalli buzağılarda cryptosporidiosis' in real time PCR ve Nested PCR yöntemleri ile saptanması*, Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi. 9, 79-87.

24. Şimşek S, Köroğlu E, Rişvanlı A, (2003). *İneklerde döl tutma problemi ile Fasciola hepatica arasındaki ilişki.* Fırat Ü Sağ Bil Derg. 17: 227-230.

25. Toparlak M, Tüzer E, (2002). *Veteriner Helmintoloji.* İstanbul: İstanbul Üniv Vet Fak.

26. Uslu U, Guclu F, (2007). *Prevalence of Coenurus cerebralis in sheep in Turkey*. Vet Med. 63, 678-680.

Anadolu Mandası Dışkılarından Enterekok Türlerinin İzolasyonu ve Antibiyotik Dirençliliklerinin Tespiti*

Sezen Ak[1], Timur Gülhan[2]

[1]Bafra İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Bafra, Samsun
[2]Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Samsun

Geliş Tarihi / Received: 13.02.2018, **Kabul Tarihi** / Accepted: 13.04.2018

Özet: Enterokoklar normal sindirim sistemi florasında bulunmakla birlikte, özellikle *Enterococcus faecalis* ve *E. faecium* gibi türler, insan ve çok sayıda hayvan türünde önemli hastalıklar oluşturmaktadır. Mandaların diğer hayvanlarda olduğu gibi bazı hastalıkların duyarlı hayvan popülasyonlarına ve insanlara bulaştırılmasında rol oynadıkları bilinmektedir. Bu çalışmada Samsun ili ve ilçelerinde yetiştiriciliği yapılan Anadolu mandalarına ait 1000 dışkı örneği enterokok türleri yönünden selektif zenginleştirme standart kültürel metodu ile incelendi. Örneklerin 100'ünden (%10) *E. faecalis*, 92'sinden (%9.2) *E. faecium*, 48'inden (%4.8) *E. hirae* ve 32'sinden (%3.2) de *E. durans* olmak üzere, toplam 272 (%27.2) enterokok izole ve identifiye edildi. İzolatlar vankomisin ve teikoplanine %2.9, trimetofrin-sülfamethaksole %3.7, ampisiline %5.1, penisiline %7.4, sefoperazone %8.8, basitrasine %15.4, streptomisine %19.9, amikasin ve gentamisine %20.6, tetrasikline %26.5 ve eritromisine %33.8 oranında dirençli bulundu. İzolatların 126'sında (%46.3) iki ve daha fazla antibiyotiğe direnç tespit edilmesi, çoğul antibiyotik dirençliliği açısından önemli olarak değerlendirildi. Bu araştırma ile bölgemizde ilk kez Anadolu mandalarına ait dışkı örnekleri enterokok türleri açısından incelendi. Araştırmadan elde edilen verilerin, yöremizde yapılacak benzer çalışmalara kaynak teşkil edebileceği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Anadolu mandası, Antibiyotik direnci, Dışkı, Enterokok

Isolation of Enterococci Species From Anatolian Buffaloes and Determination of Antibiotic Resistances

Abstract: Although enterococci found in the normal gastrointestinal flora, especially species such as *Enterococcus faecalis* and *E. faecium*, cause important infections in people and a large number of animals. Buffaloes as in other animals known to play a role in certain diseases transmitted to susceptible animals and human populations. In this study, 1000 fecal samples collected from Anatolian buffaloes in breeding Samsun and around were examined for *Enterococcus* species using selective enrichment standard cultural methods. In total 272 (27.2%) *Enterococcus* including 100 (10%) *E. faecalis*, 92 (9.2%) *E. faecium*, 48 (4.8%) *E. hirae* and 32 (3.2%) *E. durans* were isolated and identified from samples. The isolated strains were found to be resistance to vancomycin and teicoplanin 2.9%, trimethoprim+sulfamethoxazole 3.7%, ampicillin 5.1%, penicillin 7.4%, cefoperazone 8.8%, bacitracin 15.4%, streptomycin 19.9%, amicasin and gentamicin 20.6%, tetracycline 26.5% and erythromycin 33.8%. Of 272 isolates in 126 (46.3%) detecting resistance to two or more antibiotics was considered significant in terms of multiple antibiotic resistance. Fecal samples obtained from Anatolian buffaloes were examined first time in our region respect to *Enterococcus* species. We concluded that the data obtained this research can constitute a resource to similar studies in our region.

Key words: Anatolian Buffaloes, Antibiotic resistance, Feces, Enterococci

Giriş

Enterokoklar gıda endüstrisinde starter kültür olarak da kullanılan önemli bir bakteri grubunu oluşturmaktadır [13]. Enterokok cinsi içerisinde 20'den fazla tür bulunmaktadır. Pek çoğu probiyotik olarak kullanılabilecek kadar zararsız bakteriler olmakla birlikte bazıları ciddi hastalıklara neden olabilmektedir [7]. Enterokok türleri çevresel şartlara dayanıklılığı ile çevresel kontaminant bakterilerin başında gelmektedir. Dışkı ile kontamine çiğ veya az ısısal işlem görmüş gıdaların tüketilmesi sonucu sindirim sistemi enfeksiyonları görülmektedir [8]. Ayrıca pek çok enterokok türü sahip olduğu çeşitli virülens faktörleri ve antibiyotiklere dirençlilik karakterleri açısından insanlardaki hastane enfeksiyonlarının başlıca etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır [21]. Enterokoklar normal sindirim sistemi florasında bulunmakla birlikte, özellikle *Enterococcus faecalis* ve *E. faecium* gibi türlerin, insan ve çok sayıda hay-

*Aynı isimli yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Yazışma adresi / Correspondence: *Timur Gülhan (ORCID: 0000-0003-4798-1427), Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Samsun E-posta: timur.gulhan@omu.edu.tr*

van türünde bazı önemli enfeksiyonlara yol açtıkları ortaya konulmuştur. Bazı enterokok türlerinin zoonotik öneme sahip olduğu belirlenmiştir [18].

Manda (*Bubalus bubalis*), et, süt ve çeki hayvanı olarak dünya çapında, özellikle belirli ülkelerde yaygın olarak, yetiştirilen bir hayvandır. Evcil ve yabani formlardan köken alan mandaların yaklaşık 74 ırkı bulunmaktadır. Bu ırklar kabaca, bataklık ve ırmak mandaları olarak ikiye ayrılmaktadır. Bataklık mandaları yük hayvanı olarak kullanılırken, ırmak mandaları et ve süt yönlü yetiştirilmektedir. Türkiye'deki mandalar, ırmak mandalarının bir alt grubu olan Akdeniz mandalarından köken almakta ve Anadolu mandası olarak tanımlanmaktadır. Dünya çapında yaklaşık olarak 177 milyon manda bulunmaktadır. Ülkemizde 158.000 civarında manda yetiştirildiği, Samsun ilinde ise yaklaşık 20. 000 manda bulunduğu bildirilmektedir [2].

Bu çalışma, Samsun ili ve ilçelerinde halk elinde yoğun olarak yetiştiriciliği yapılmakta olan Anadolu mandalarına ait dışkı örneklerinde enterokok türlerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirildi. Enterokok türlerinin manda popülasyonlarında sıklığı, yaygınlığı ve dağılımı araştırıldı. İzolatların farklı türden antibiyotik gruplarına olan dirençlilik/duyarlılık özellikleri ortaya konuldu.

Materyal ve Metot

Dışkı Örnekleri: Çalışmanın materyalini Samsun ilçelerindeki Anadolu mandalarına ait 1000 adet dışkı örneği oluşturdu. Bu amaçla alınan dışkı sayıları ve merkezler Şekil 1 ve Tablo 1'de sunuldu.



Şekil 1. Anadolu mandası dışkı örneklerinin toplandığı merkezler

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

Merkez	Manda sayısı	Alınan dışkı sayısı
Bafra	8765	386
Vezirköprü	2869	140
Alaçam	1936	100
Çarşamba	1857	80
Terme	1496	80
Ondokuz Mayıs	1116	50
Kavak	428	30
Ladik	408	20
Asarcık	335	20
Salıpazarı	206	20
Tekkeköy	148	20
Yakakent	79	20
Atakum	62	10
Canik	42	10
İlkadım	20	10
Ayvacık	6	4
Toplam	**19.773**	**1000**

Besiyerleri ve Test Kiti: Dışkı örneklerinde enterokok izolasyonu ve identifikasyonu amacıyla azide dextrose broth (ADB, Difco), bile esculine agar (BEA, Difco), blood agar base (Oxoid), brain heart infusion broth (BHIB, Oxoid), triptic soy agar (TSA, Oxoid) ve mueller-hinton agar (MHA, Oxoid) besiyerleri kullanıldı. Besi yerleri prospektüslerine uygun olarak hazırlandı. Ayrıca şüpheli kolonilerin L-Pyrrolidonyl-ß-Naphthylamide (PYR) aktivitelerinin belirlenmesinde PYR strip test kiti (Bioanalyse, Türkiye) kullanıldı.

İzolasyon ve İdentifikasyon: Dışkı örneklerinden enterokok türlerinin selektif izolasyonu amacıyla dışkı örnekleri transport ve ön zenginleştirme ADB içerisinde 37 ºC'de 24-48 saat inkübasyondan sonra, bu besiyerinden bile esculin agar (BEA)'a ekimler yapılarak aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. Eskulin pozitif (siyah renkli) kolonilerden, Gram pozitif, PYR pozitif, katalaz negatif, kok morfolojisinde olanlar % 7 koyun kanlı agara ekilerek saflaştırıldı. İzolatlar, tür tayini ve sonrasında antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için % 10'luk BHI'de -20 ºC'de saklandı. İzolatların tür düzeyinde identifikasyonu amacıyla %6.5'luk NaCl'de üreme, %0.1 tetrazoliumda üreme, hareket, potasyum tellürit (%0.04) redüksiyonu ve arjinin hidrolizi ile

arabinoz, arbutin, sorbitol, sorboz, sukroz, laktoz, mannitol, inulin, raffinoz fermantasyon testleri konvansiyonel yöntemlere göre yapıldı [26].

Antibiyotik Duyarlılık Testi: İzolatların vankomisin (30 µg), teikoplanin (30 µg), ampisilin (10 µg), amikasin (30 µg), basitrasin (10 µg), eritromisin (15 µg), gentamisin (10 µg), kanamisin (30 µg), penisillin (10 µg), sefaperazon (75 µg), streptomisin (10 µg), tetrasiklin (30 µg), ve trimetofrin-sülfametheksol (1.25 ve 23.75 µg) antibiyotiklerine dirençlilik/duyarlılık durumlarının belirlenmesinde standart disk difüzyon tekniği kullanıldı [4].

Bulgular

İzolasyon ve İdentifikasyon Sonuçları: İzole edilen enterokok türlerinin dışkı örneklerinin sağlandığı merkezlere göre dağılımı ve dışkı sayıları Tablo 2'de sunuldu.

Antibiyogram Testi Sonuçları: İzole edilen enterokok türlerinin 12 farklı antibiyotiğe duyarlılık/dirençlilik sonuçları Tablo 3'de gösterildi. İzole edilen enterokok türlerinde çoğul antibiyotik dirençliliği değerlendirildiğinde; 272 suştan 126'sında (%46.3) iki ve daha fazla antibiyotiğe direnç tespit edildi. Test edilen 12 antibiyotikten 9'una 2, 8'ine 2, 7'sine 2, 5'ine 4, 4'üne 10, 3'üne 30 ve 2'sine de 76 izolatın birlikte dirençli olduğu görüldü. İzolatların çoklu antibiyotik direnç patternleri Tablo 4'de sunuldu.

Tablo 2. Enterokok türlerinin izole edildiği merkezlere göre dağılımı

Merkez	Dışkı sayısı	*E. faecalis* (%)	*E. faecium* (%)	*E. hirae* (%)	*E. durans* (%)	Toplam (%)
Bafra	386	20(5.2)	14(3.6)	12(3.1)	10(2.6)	56(14.5)
Vezirköprü	140	10(7.1)	8(5.7)	6(4.3)	4(2.9)	28(20)
Alaçam	100	8(8)	10(10)	4(4)	4(4)	26(26)
Çarşamba	80	10(12.5)	8(10)	4(5)	4(5)	26(26)
Terme	80	8(10)	10(12.5)	4(5)	2(2.5)	24(30)
Ondokuz Mayıs	50	10(20)	8(16)	2(4)	4(8)	24(48)
Kavak	30	6(20)	8(26.7)	4(13.3)	2(6.7)	20(66.7)
Ladik	20	4(20)	4(20)	2(10)	2(10)	12(60)
Asarcık	20	4(20)	2(10)	2(10)	-	8(40)
Salıpazarı	20	4(20)	4(20)	4(20)	-	12(60)
Tekkeköy	20	4(20)	4(20)	2(10)	-	10(50)
Yakakent	20	4(20)	4(20)	2(10)	-	10(50)
Atakum	10	2(20)	2(20)	-	-	4(40)
Canik	10	2(20)	2(20)	-	-	4(40)
İlkadım	10	2(20)	2(20)	-	-	4(40)
Ayvacık	4	2(50)	2(50)	-	-	4(100)
Toplam	**1000**	**100(10)**	**92(9.2)**	**48(4.8)**	**32(3.2)**	**272 (27.2)**

Tablo 3. Enterokok türlerinin antibiyotik direnç/duyarlılık patternleri

	Antibiyotik	*E. faecalis* (n=100)		*E. faecium* (n=92)		*E. hirae* (n=48)		*E. durans* (n=32)		Toplam (n=272)	
		S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)
1	VA	96(96)	4(4)	90(97.8)	2(2.2)	48(100)	0(0)	30(93.8)	2(6.2)	264(97.1)	8(2.9)
2	TEİ	96(96)	4(4)	90(97.8)	2(2.2)	48(100)	0(0)	30(93.8)	2(6.2)	264(97.1)	8(2.9)
3	AM	90(90)	10(10)	92(100)	0(0)	46(95.8)	2(4.2)	30(93.8)	2(6.2)	258(94.9)	14(5.1)
4	AN	74(74)	26(26)	80(87)	12(13)	36(75)	12(25)	26(81.3)	6(18.7)	216(79.4)	56(20.6)
5	B	80(80)	20(20)	88(95.7)	4(4.3)	38(79.2)	10(20.8)	24(75)	8(25)	230(84.6)	42(15.4)
6	E	70(70)	30(30)	60(65.2)	32(34.8)	34(70.8)	14(29.2)	20(62.5)	12(37.5)	184(66.2)	88(33.8)
7	GM	76(76)	24(24)	78(84.8)	14(15.2)	38(79.2)	10(20.8)	24(75)	8(25)	216(79.4)	56(20.6)
8	P	84(84)	6(6)	84(91.3)	8(8.7)	44(91.7)	4(8.3)	28(87.5)	4(12.5)	252(92.6)	20(7.4)
9	CFP	98(98)	2(2)	86(93.5)	6(6.5)	42(87.5)	6(12.5)	22(68.8)	10(31.2)	248(91.2)	24(8.8)
10	S	74(74)	26(26)	82(89.1)	10(10.9)	40(83.3)	8(16.7)	20(62.5)	12(37.5)	218(80.1)	54(19.9)
11	TE	70(70)	30(30)	76(82.6)	16(17.4)	32(66.7)	16(33.3)	22(68.8)	10(31.2)	200(73.5)	72(26.5)
12	SXT	98(98)	2(2)	90(97.8)	2(2.2)	46(95.8)	2(4.2)	28(87.5)	4(12.5)	262(96.3)	10(3.7)

Tablo 4. İzole edilen enterokok türlerinde belirlenen çoğul antibiyotik direnç patternleri

Antibiyotik Sayısı	Antibiyotik Direnç Fenotipi	*E. faecalis* (n=100)	*E. faecium* (n=92)	*E. hirae* (n=48)	*E. durans* (n=32)	Toplam (n=272)
9	VA-AM-B-E-GM-P-CFP-S-SXT	1	-	-	1	2
8	AM-AN-GM-P-CFP-S-TE-SXT	1	1	-		2
7	AN-B-E-GM-CFP-S-SXT	1	-	-	1	2
5	AM-AN-E-P-S	1	1	-	-	4
	AN-B-GM-S-TE	1	-	1	-	
4	AM-AN-E-GM	1	1	-	-	10
	AN-B-GM-TE	1	-	1	1	
	AN-GM-S-TE	1	-	-	-	
	AN-E-GM-S	1	1	1	-	
	B-GM-P-TE	1	-	-	-	
3	TEI-B-TE	1	2	-	1	30
	AM-E-TE	1	-	-	-	
	AM-GM-S	1	1	1	-	
	AN-B-TE	1	1	1	1	
	AN-P-TE	1	1	-	-	
	AN-CFP-TE	1	-	1	1	
	AN-S-TE	1	2	-	-	
	B-E-GM	1	-	-	-	
	B-E-P	1	-	1	-	
	B-GM-TE	1	1	-	1	
	B-S-TE	1	-	-	-	
	E-CFP-SXT	1	1	1	-	
2	VA-TEI	2	2	1	-	76
	TEI-S	2	1	1	1	
	AM-AN	2	1	1	1	
	AN-E	2	1	2	1	
	AN-GM	1	2	2	1	
	AN-S	2	1	2	2	
	AN-TE	4	1	2	1	
	B-E	2	1	1	1	
	B-GM	2	1	1	1	
	B-S	4	1	1	1	
	E-GM	2	1	1	1	
	E-P	1	2	1	1	
	E-S	6	1	2	1	
	E-CFP	4	1	1	2	
	E-TE	2	1	1	1	
	GM-S	2	1	2	1	
	GM-TE	1	2	3	1	
	P-SXT	4	1	2	1	
	CFP-TE	1	1	1	2	
	S-TE	4	1	2	1	
	Toplam	**50**	**24**	**30**	**22**	**126**
		%50	**%26.1**	**%62.5**	**%68.8**	**%46.3**

Vankomisin (VA, 30 µg), Teikoplanin (TEİ, 30 µg), Ampisilin (AM, 10 µg), Amikasin (AN, 30 µg), Basitrasin (B, 10 µg), Eritromisin (E, 15 µg), Gentamisin (GM, 10 µg), Penisilin (P, 10 µg), Sefoperazon (CFP, 75 µg), Streptomisin (S, 10 µg), Tetrasiklin (TE, 30 µg), Trimetofrin-Sülfamethaksol (SXT, 1.25 ve 23.75 µg)

Tartışma

Enterokoklar insan ve hayvan barsak florasının bir parçası olmaları, gıda sektöründe bazı türlerin çok güvenli olmasa da kullanılıyor olmasına rağmen, zaman zaman önemli hastalık vakalarından izole edilmektedirler. Enterokok türlerinin farklı kaynaklardan izolasyonu ve karakterizasyonu amacıyla çok sayıda çalışma yapılmıştır [3, 6, 7, 10, 11]. Ancak mandalarda enterokok türlerinin belirlenmesine yönelik çalışma sayısı yetersizdir.

Yabani ve evcil mandalarda zoonoz karaktere de sahip pek çok etkenin varlığı ve yaygınlığı araştırılmıştır [12, 17, 16, 19, 20].

Yapılan literatür incelemesinde, manda dışkılarından enterokok türlerinin tespitine yönelik çalışma sayısının çok sınırlı olduğu görülmektedir [14, 23]. Diğer yandan, yürütülen çalışmalar daha çok manda sütlerinden enterokok türlerinin belirlenmesine yöneliktir [1, 5, 9, 22, 24, 25]. Mandalarda yapılan çalışmaların sınırlı kalmasının belki de en önemli nedenleri; mandaların spesifik coğrafik bölgelerde lokalize olması ve popülasyonunun ülkeden ülkeye değişkenlik göstermesinden kaynaklanabilir.

Yaban hayatındaki mandalarda gerçekleştirilen bir çalışmada [23] incelenen 2 adet dışkı örneğinden 1'inden (%50) *E. hirae* izole edilmiştir. Benzer bir araştırmada [14], 35 manda dışkısından 23'ü (%65.7) *Enterococcus faecium*, 4'ü (%11.4) *E. hirae* ve 2'si (%5.7) *E. faecalis* olmak üzere toplam 29 enterokok türü izole edilmiştir. İzolatların 15'i tetrasikline, 10'u sülfamataksasol+trimetoprime, 14'ünün eritromisine, 10'unun gentamisine ve 12'sinin de ampisiline dirençli olduğu bildirilmiştir.

Bu araştırmada, incelenen 1000 dışkı örneğinin 100'ünden (%10) *E. faecalis*, 92'sinden (%9.2) *E. faecium*, 48'inden (%4.8) *E. hirae* ve 32'sinden (%3.2) da *E. durans* olmak üzere, toplam 272 (%27.2) enterokok izole ve identifiye edildi. İzolatlar vankomisin ve teikoplanine %2.9, trimetofrin-sülfamethaksole %3.7, ampisiline %5.1, penisiline %7.4, sefoperazone %8.8, basitrasine %15.4, streptomisine %19.9, amikasin ve gentamisine %20 .6, tetrasikline %26.5 ve eritromisine %33.8 oranında dirençli bulundu. 272 izolatın 126'sında (%46.3) iki ve daha fazla antibiyotiğe direnç tespit edilmesi, çoğul antibiyotik dirençliliği açısından önemli olarak değerlendirildi.

Manda dışkılarından enterokok türlerinin ayrıntılı olarak araştırıldığı çalışmaya rastlanılamadığı için bölgemizdeki manda populasyonlarından izole edilen enterokok türleri ve izolasyon oranları detaylı olarak tartışılamadı. Ancak, konuyla ilgili bilgiye ulaşılan iki literatür [14, 23] verisindeki oranların, bu çalışma bulgularında daha yüksek olduğu görüldü. Bu çalışmada manda dışkılarının klinik olarak sağlıklı hayvan populasyonlarından elde edilmiş olması, diğer iki çalışma verileri ile farklılığı açıklayabilir. Diğer yandan çalışmalarda kullanılan metot ve örnek toplanan coğrafik bölge farklılıkları sonuçları etkileyebilmektedir.

Antibiyotiklere dirençli enterokok kökenli hastane enfeksiyonları güncelliğini korumaktadır [15]. Bu açıdan antibiyotiklere dirençli diğer bakterilerle mücadelede olduğu gibi uygun koruma ve kontrol programlarının belirlenmesi önem arz etmektedir. Antibiyotiklere dirençli enterokok türlerinin insanlara bulaştırılmasında, insanlarla yakın temas halinde olan hayvanlar önemli rol oynamaktadır. Etkenlerde belirlenen çoğul antibiyotik dirençlilikleri, sadece kendi aralarında değil diğer etkenlere de dirençliliğin genetik olarak aktarılması, artan patojen özelliklerinin insan ve hayvan sağlığını yakından ilgilendirmesi nedeniyle konu ile ilgili daha ayrıntılı çalışmaların yapılmasını zorunlu hale getirmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile bölgemizde ilk kez Anadolu Mandalarına ait dışkı örneklerinde enterokok türlerinin tespiti ve antibiyotik duyarlılık patternleri incelendi. Bölgemizde yetiştiriciliği yapılan mandalarda enterokok türlerinin dağılımı ve çeşitliliği ortaya konuldu. Diğer hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda olduğu gibi baskın enterokok türlerin, *E. faecalis* ve *E. faecium* olduğu görüldü. İzolatlar arasında en fazla dirençliliğin eritromisin ve tetrasikline olduğu belirlendi. İzole edilen 272 enterokok suşunun 126'sında (%46.3) iki ve daha fazla antibiyotiğe direnç tespit edilmesi, çoğul antibiyo-

tik dirençliliği açısından önemli olarak değerlendirildi. Daha ileri düzey çalışmalar ile mandalardan izole edilen bakterilerin direnç patternlerini ortaya konulması gerektiği kanısına varıldı.

Teşekkür

Bu çalışma PYO.VET.1904.14.006 numaralı yüksek lisans tez projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Kaynaklar

1. Andrighetto C, Knijff E, Lombardi A, Torriani S, Vancanneyt M, Kersters K, Swings J, Dellaglio F, (2001). *Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses.* J Dairy Res. 68(2), 303-316.
2. Anonim, (2018). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Hayvancılık Genel Müdürlüğü, Ocak 2018 Verileri, Erişim adresi: http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/HAYGEM.pdf, Erişim Tarihi: 10.01.2018.
3. Boynukara B, Ekin İH, Aksakal A, Gülhan T, (2002). *İnsan, köpek ve kedi dışkılarından enterokokların izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkları*. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Dergisi. 2(1), 37-42.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2013). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement M100-S23. Wayne, PA.
5. Coppola S, Parente E, Dumontet S, Lapeccerella A, (1988). *The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella Cheese from water-buffalo milk*. Le Lait. 68(3), 295-309.
6. Çiftci A, Diker KS, (2009). *The role of enterococcal virulence factors on experimental amyloid arthropathy in chickens*. FEBS J. 276, 305.
7. Çiftci A, Fındık A, İça A, Baş B, Onuk EE, Güngördü S, (2009). *Slime production and antibiotic resistance of Enterococcus faecalis isolated from arthritis in chickens*. J Vet Med Sci. 71(6), 849-853.
8. Enany ME, Riad EM, Wahdan A, (2012). *Bacterial causes of pneumonia in buffalo calves*. SCVMJ. 17(2), 27-38.
9. Gelsomino R, Vancanneyt M, Condon S, Swings J, Cogan TM, (2001). *Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheese making factory*. Int J Food Microbiol. 71(2), 177-188.
10. Gülhan T, Aksakal A, Ekin İH, Savaşan S, Boynukara B, (2006). *Virulence factors of Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis strains isolated from human and pets*. Turk J Vet Anim Sci. 30, 477-482.
11. Gülhan T, Boynukara B, Durmuş A, Kiziroğlu I, Sancak YC, (2012). *Enteric bacteria and some pathogenic properties of Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium and Escherichia coli strains isolated from wild ducks and gulls*. Fresen Environ Bull. 21(7), 1961-1966.
12. Hadimli HH, Pinarkara Y, Sakmanoğlu A, Sayin Z, Erganiş O, Uslu A, Al-Shattrawi HJ, (2017). *Serotypes of Salmonella isolated from feces of cattle, buffalo, and camel and sensitivities to antibiotics in Turkey*. Turk J Vet Anim Sci. 41, 193-198.
13. Jahan M, Holley RA, (2016). *Transfer of antibiotic resistance from Enterococcus faecium of fermented meat origin to Listeria monocytogenes and Listeria innocua*. Lett Appl Microbiol. 62, 304-310.
14. Katakweba AAS, Møller KS, Muumba J, Muhairwa AP, Damborg P. Rosenkrantz JT, Minga UM, Mtambo MMA, Olsen JE, (2014). *Antimicrobial resistance in faecal samples from buffalo, wildebeest and zebra grazing together with and without cattle in Tanzania*. J Appl Microbiol. 118, 966-975.
15. Kim MC, Cha MH, Ryu JG, Woo GJ, (2017). *Characterization of vancomycin-resistant Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium isolated from fresh produces and human fecal samples*. Foodborne Pathog Dis. 14(4), 195-201.
16. Mahanti A, Samanta I, Bandopaddhay S, Joardar SN, Dutta TK, Sar TK, (2014). *Isolation, molecular characterization and antibiotic resistance of Enterotoxigenic E. coli (ETEC) and Necrotoxigenic E. coli (NTEC) from healthy water buffalo*. Vet Arhiv. 84(3), 241-250.
17. Nuhay Ç, Gülhan T, (2017). *Samsun ili ve ilçelerinde yetiştirilen Anadolu mandalarının dışkı örneklerinde Escherichia coli O157:H7'nin tespiti.* Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 28 (1), 39-45, 2017.
18. Olsen RH, Schønheyder HC, Christensen H, Bisgaard M, (2012*). Enterococcus faecalis of human and poultry origin share virulence genes supporting the zoonotic potential of E. faecalis*. Zoonoses Public Hlth. 59 256-263.
19. Rahimi E, Momtaz H, Behzadnia A, Baghbadorani ZT, (2014). *Incidence of Listeria species in bovine, ovine, caprine, camel and water buffalo milk using cultural method and the PCR assay*. Asian Pac J Trop Dis. 4(1), 50-53.
20. Rehman MU, Rashid M, Sheikh JA, Bhat MA, (2014). *Molecular epidemiology and antibiotic resistance pattern of Enteropathogenic Escherichia coli isolated from bovines and their handlers in Jammu, India*. J Adv Vet Anim Res. 1(4), 177-181.
21. Sharifi Y, Hasani A, Ghotaslou R, Naghili B, Aghazadeh M, Milani M, Bazmani A, (2013). *Virulence and antimicrobial resistance in enterococci isolated from urinary tract infections*. Adv Pharm Bull. 3(1), 197-201.
22. Teixeira LM, Merquior WLC, Vianni MCE, Carvalho MGS, Fracalanzza SEL, Steigerwalt AG, Brenner DJ, Facklam RR, (1996). *Phenotypic and genotypic characterization of atypical Lactococcus gawieae strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of L. gawieae as a senior subjective synonym of Enterococcus seriolicida*. Int J Syst Bacteriol. 46(3), 664-668.
23. Thamacharoensuk T, Thongchul N, Taweechotipatr M, Tolieng V, Kodama K, Tanasupawat S, (2013). *Screening and characterization of lactic acid bacteria from animal faeces for probiotic properties*. Thai J Vet Med. 43(4), 541-551.
24. Turanta F, Unluturk A, Goktan D, (1989). *Microbiological and compositional status of Turkish white cheese*. Inter J Food Microbiol. 8(1), 19-24.
25. Villani F, Coppola S, (1994). *Selection of enterococcal strains for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture*. Ann Microbiol Enzimol. 44, 97-105.
26. Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki KI, (2012). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 5, parts A and B, Springer-Verlag, New York, NY.

Efficacy of Gaseous Ozone Against *Paenibacillus Larvae* Spores on Hive Materials

Emrah Torlak[1], Mehmet Kürşat Işık[2]

[1] Necmettin Erbakan University, Faculty of Science, Department of Molecular Biology and Genetics, Konya, Turkey
[2] Konya Food and Agriculture University, Strategic Research and Development Centre, Konya, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 13.02.2018, **Kabul Tarihi** / Accepted: 16.04.2018

Abstract: American Foulbrood (AFB) is a highly contagious bacterial honey bee disease caused by Paenibacillus larvae. The elimination of P. larvae spores from contaminated hives is a key factor to achieve the long-term success in AFB control. The purpose of this study was to evaluate the efficacy of gaseous ozone in inactivating the P. larvae spores on wooden and plastic hive materials. Untreated pinewood and polyvinyl chloride (PVC) were chosen as representatives for the hive materials. Pinewood and PVC sticks inoculated with a spore cocktail of three P. larvae strains were treated up to 120 min with two different constant concentrations of gaseous ozone (9.8 and 17.1 mg/L) at room temperature. Ozonation at 17.1 mg/L for 120 min yielded over the 4 log reduction in the counts of spores on PVC sticks. Whereas, reduction of 2.3 log was obtained on pinewood sticks under the same experimental conditions. Reductions achieved in the levels of P. larvae spores on PVC sticks after 90 and 120 min of ozonation were significantly ($p<0.05$) higher than those on pinewood sticks. Our results suggest that gaseous ozone treatment is a promising candidate for the sterilization of plastic hives contaminated with P. larvae spores.

Ozon Gazının Kovan Materyalleri Üzerinde *Paenibacillus Larvae* Sporlarına Karşı Etkinliği

Key words: *Paenibacillus larvae*, Spore, Hive material, Ozonation.

Özet: Amerikan Yavru Çürüklüğü (AYÇ) *Paenibacillus larvae*'nın neden olduğu oldukça bulaşıcı bakteriyal bir bal arısı hastalığıdır. *P. larvae* sporlarının kontamine kovanlardan eliminasyonu AYÇ'nin uzun süreli başarılı kontrolünde anahtar bir faktördür. Bu çalışmanın amacı ozon gazının ahşap ve plastik kovan materyalleri üzerinde *P. larvae* sporlarını inaktivasyon etkinliğinin değerlendirilmesidir. Kovan materyallerini temsilen işlem görmemiş çam ağacı ve polivinil klorür (PVC) seçilmiştir. *P. larvae* sporları ile kontamine edilen çam ağacı ve PVC çubukları ozon gazı ile 120 dakikaya kadar iki farklı sabit konsantrasyonda (9.8 ve 17.1 mg/L) oda sıcaklığında muamele edilmiştir. PVC çubuklara 120 dakika boyunca 17.1 mg/L düzeyinde ozon uygulaması spor sayısında 4 log üzerinde azalmaya neden olmuştur. Buna karşılık, aynı deneysel koşullarda çam ağacı çubukları üzerinde 2.3 log azalma elde edilmiştir. PVC çubuklar üzerinde *P. larvae* spor seviyelerinde 90 ve 120 dakika ozonlama sonrasında elde edilen indirgenme değerleri çam ağacı çubukları üzerinde elde edilen değerlerden önemli ($p<0.05$) düzeyde yüksektir. Sonuçlarımız ozon gazı uygulamasının *P. larvae* sporlarıyla kontamine plastik kovanların sterilizasyonu için umut verici bir aday olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: *Paenibacillus larvae*, Spor, Kovan materyali, Ozonlama.

Introduction

Paenibacillus larvae, a Gram-positive facultative anaerobe, is the etiological agent of American Foulbrood (AFB), a severe bacterial disease of honey bee brood (*Apis mellifera*) [2, 11]. *P. larvae* has ability to form extremely tenacious endospores when environmental conditions do not favor vegetative bacterial growth. The spores are the only infectious form of pathogen and can infect only the larvae, whereas spores do not cause infection in adult bees upon their ingestion [14, 20, 27]. *P. larvae* spores can survive under environmental stress conditions for an extended period of time, and are resistant to a wide-variety of treatments such as heat, desiccation and chemicals [10, 13]. A key factor in the control of AFB is disinfection of beehive equipment, especially when apiary is confronted with clinical signs accompanied by extremely high numbers of spores [8].

Wood and plastic are the materials most generally preferred for hive construction due to their advantages of being durable and flexible. Traditional

Yazışma adresi / Correspondence: *Emrah Torlak (ORCID: 0000-0003-4636-7791), Necmettin Erbakan University, Faculty of Science, Department of Molecular Biology and Genetics, Konya, Turkey E-posta: etorlak@konya.edu.tr*

decontamination of wooden hive materials for *P. larvae* spores involves a variety of treatments including disinfection with chemicals, scorching with a blowtorch and immersion into molten paraffin. However, options available for plastic hives are limited compared to the range of treatments can be used for wooden hives [9]. Del Hoyo et al. [7] found the dipping of wooden frames in hot paraffin was a very effective disinfection method. However, it should be noted that the manipulation of hot paraffin requires special equipment and heavy duty protective clothing, which the average beekeeper does not have [9]. Dobbelaere et al. [8] reported that complete elimination of *P. larvae* spores on wooden hive materials by disinfectants could only be achieved when they were used at extremely high concentrations. They also reported that the scorching of wood was not satisfactory as it only effective against spores at the surface of material. These disadvantages of the traditional decontamination methods for hives have led to use of alternative treatments such as methyl oxide and gamma radiation. However, these treatments are expensive and generally only available to beekeepers who operate near a treatment facility [6, 16].

Gaseous ozone is an environment-friendly and powerful sanitizer due to its potential oxidizing capacity [23]. The regulatory status of gaseous ozone for sanitizing applications has been addressed in several countries. It has been registered as a sanitizer for direct application on surfaces by the US Environmental Protection Agency [1, 12]. Ozone does not require storage, special handling or mixing considerations, and hence it may be considered more practical compared to other chemical sanitizers [4]. Therefore, this study was aimed to evaluate for the first time the efficacy of gaseous ozone against *P. larvae* spores on wooden and plastic hive materials.

Materials and Methods

Microorganisms and spore suspension

Two strains obtained from the field and one certified strain (ATCC 9545) of *Paenibacillus larvae* were used to contaminate representative hive materials. Field strains were previously isolated from bee products and identified by PCR technique. Stock cultures of test strains were passaged onto Columbia sheep blood agar (Liofilchem, Roseto Degli Abruzzi, Italy) and incubated at 35°C and 5% CO_2 as approximately 80% of cells were sporulated. Sporulation was checked by staining with malachite green and microscopic examination. Spore suspensions were prepared by transferring of the sporulated colonies from agar surface into distilled water and resulted suspensions were pooled in the same tube to obtain a spore cocktail of three strains. The pooled suspension was centrifuged and resuspended in sterile distilled water. Then, spore concentration of the suspension was determined on Columbia sheep blood agar by plate count technique and adjusted to 10^7 spores/mL with sterile distilled water. The final suspension was used as inoculum and refrigerated until used. It was heated at 80°C for 10 min to eliminate vegetative cells and activate spores before inoculation of hive materials.

Inoculation of hive materials

Untreated pinewood and polyvinyl chloride (PVC) were chosen as representative for wooden and plastic hive materials. Totally 30 small sticks (7×3×2.5 cm) of each material, sterilized under ultra violet light, were arranged on an aluminum foil. Then, about 10 mL of the pooled spore suspension, supplemented with 0.5 mL Tween 80 (Merck, Darmstadt, Germany) in order to increase wettability [22], was transferred into an atomizer (DeVilbiss Healthcare, Somerset, PA, USA) and sprayed as homogeneously as possible on the sticks. After inoculation, sticks were remained for 30 min to dry and inoculated sticks were refrigerated until ozone treatment.

Ozone treatment

A 9 L gas-tight plexiglas desiccator (Belart Products, Wayne, NJ, USA) equipped with two gas valves for the air inlet and outlet was used as ozonation chamber. Inoculated sticks were placed into chamber with the inoculated surface uppermost. Each treatment group was comprised of three pinewood or PVC sticks. Inoculated sticks were subjected to two different concentrations of gaseous ozone produced directly from atmospheric oxygen by a lab-scale generator (Genozon, Denizli, Turkey) with adjustable ozone output. Ozonation was performed for four exposure times (30, 60, 90 and 120 min) at ambient laboratory conditions.

The ozone concentrations in the air flow produced by the generator were determined as 9.8 and 17.1 mg/L based on ozone/iodine stoichiometry by the iodometric titration method [15]. Iodometric method was carried out by bubbling of gaseous ozone at a flow rate of 1 L/min in a washing bottle equipped with a diffuser containing 200 mL buffered potassium iodide (KI) solution. After bubbling of KI solution, pH was lowered to 2 with sulfuric acid (4.5 mol/L), in order to complete the reaction. Immediately after, the liberated iodine was titrated to a starch endpoint with freshly standardized sodium thiosulfate solution (0.1 mol/L). The times required to reach asymptotic concentrations of ozone in the treatment chamber were calculated by a mass balance equation previously described by Silva et al. [26]:

$$C_0 \times \left(1 - e^{\left(-w\frac{t}{V_t}\right)}\right) = C$$

where C_0 is the concentration of ozone in air flow (mg/L), v is the rate of air flow (L/min), t is the time (min), V_t is the volume of treatment chamber (L) and C is the predicted ozone concentration in the chamber for specified time (mg/L).

Enumeration of *P. larvae*

Enumeration of *P. larvae* on inoculated sticks before and after ozone exposure was performed by plate count technique. The sticks were aseptically transferred to the sterile stomacher bags containing 200 mL of maximum recovery diluent (Lab M, Bury, UK) supplemented with Tween 20 at 1%. Then bags were hand shaken vigorously for 10 min to release spores from sticks. Additional ten-fold dilutions were made by maximum recovery diluent. Totally 1 mL of initial suspensions and ten-fold dilutions were surface plated on three Columbia sheep blood agar plates. After incubation at 35°C and 5% CO_2 for 4 days, the *P. larvae* colonies were counted and results were determined as log cfu/stick.

Statistical Analyses

Results obtained from three independent trials were analyzed by Levene's and Shapiro-Wilk tests to check the homogeneity of the variances and normality, respectively. One-way analysis of variance was used to compare the differences between groups. The Bonferroni correction method, a multiple comparison test, was used for a post hoc comparison at $p<0.05$. The data were evaluated via SPPS 20 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Results

According to the concentration curves constructed by the results of mass balance equation, the durations required to reach the asymptotic concentrations of ozone (9.8 and 17.1 mg/L) in the treatment chamber were less than 50 min (Figure 1).

The reductions in the level of *P. larvae* spores on ozonated pinewood and PVC sticks during 120 min of treatment are shown in Table 1 and Table 2, respectively. Initial inoculation levels on pinewood and PVC sticks were determined as 6.5 and 6.6 log cfu/stick, respectively. After 120 min of treatment, spore population on pinewood sticks was significantly ($p<0.05$) reduced by 1.6 and 2.3 log at ozone concentrations of 9.8 and 17.1 mg/L, respectively. These reduction levels were exceeded on PVC sticks after 90 min of ozonation. Reductions of 2.9 and 4.1 log were observed in the counts of *P. larvae* spores on PVC when the sticks were treated for 120 min at 9.8 and 17.1 mg/L, respectively. Enumeration results indicated that reductions in the levels of *P. larvae* spores on PVC sticks after 90 and 120 min were significantly ($p<0.05$) higher than those on pinewood sticks.

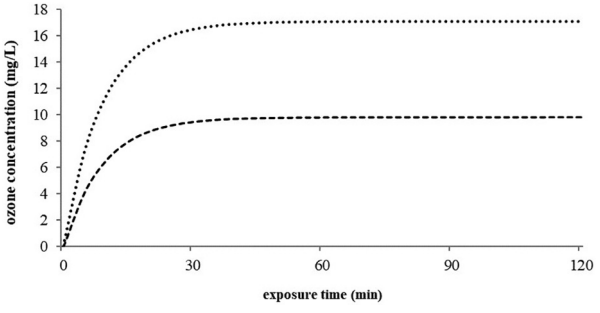


Figure 1. Predicted ozone concentrations in the chamber during the treatments: ---- 9.8 mg/L, - - - - 17.1 mg/L.

Table 1. Viable population of *Paenibacillus larvae* spores on pinewood sticks during ozonation (±standard deviations, log cfu/stick).

Ozone concentration (mg/L)	Treatment time (min)				
	0	30	60	90	120
9.8	6.5±0.2^{a}	6.3±0.2^{a}	5.9±0.3^{ab}	5.4±0.5^{ab}	4.9±0.2^{b}
17.1	6.5±0.2^{a}	6.2±0.3^{a}	5.6±0.5^{ab}	4.9±0.3^{bc}	4.2±0.3^{c}

^{ab} Values followed by the same letter in the same row are not significantly different ($p< 0.05$).

Table 2. Viable population of *Paenibacillus larvae* spores on PVC sticks during ozonation (±standard deviations, log cfu/stick).

Ozone concentration (mg/L)	Treatment time (min)				
	0	30	60	90	120
9.8	6.6±0.2^{a}	6.2±0.4^{ab}	5.6±0.3^{b}	4.6±0.4^{c}	3.7±0.5^{c}
17.1	6.6±0.2^{a}	6.2±0.2^{a}	5.1±0.4^{b}	3.8±0.3^{c}	2.5±0.5^{d}

^{ab} Values followed by the same letter in the same row are not significantly different ($p< 0.05$).

Discussion

Ozone in gaseous state has been successfully utilized for inactivation of bacterial spores both in their suspensions and on different types of materials including glass, plastic, stainless steel and wood [3, 5, 18]. In this work, we observed the reduction in viability of *P. larvae* spores on hive materials up to 4.1 log, as a result of exposure to gaseous ozone. However, it should be noted that the antimicrobial effect of ozone against bacterial species is influenced by the physiological state and structural properties of the bacterium, and spores are generally more resistant to oxidizing effects compared to their vegetative counterparts [12, 24]. In accordance with our results, James [16] reported that cadavers of honey bee larvae infected with *P. larvae* were effectively sterilized with ozonation at 0.9 mg/L in combination with elevated temperature (50°C) and relative humidity (75%). In the study of Khadre and Yousef [19], the sporicidal action of ozone was compared with hydrogen peroxide in spore suspensions of *Bacillus* species. Their results demonstrated that ozone at 11 mg/L was more effective than 10% (v/v) concentration of hydrogen peroxide.

Sporicidal activity of ozone can be explained by a complex and progressive oxidative process that affects outer spore components such as spore coat and inner membrane [28]. The outer spore coat layers were identified as a probable site of action of ozone in the electron microscopic study of ozone-treated *Bacillus subtilis* spores [19]. Specific effect of ozone against spore's inner membrane can be attributed to oxidation of unsaturated fatty acids and membrane proteins. Young and Setlow [28] suggested that ozone does not kill spores by DNA damage but rather by damaging the ability of the spores to germinate. They also suggested that damage to the inner membrane of spores causes defects in spore germination. Apart from the damage to the outer layers of the spore, gaseous ozone may also penetrate into the spore core and inactivate various vital cellular components including critical core enzymes and proteins [12, 17, 21].

The main challenge in ozonation of wooden materials for the purpose of decontamination is their porous structure. When materials possessing porous surface, the spores can penetrate and embed into cavities of the test material. Embedding of spores into the test materials could preclude the interaction of gaseous disinfectants with the spores, thereby decreasing their potential for spore inactivation. Therefore, it can be suggested that sporicidal efficacy of gaseous disinfectants like ozone on different materials is significantly affected by the surface porosity. Similar to our results, previous studies reported that the reductions observed on wooden materials after treatment with gaseous disinfectants including ozone were considerably lower than on nonporous materials such as plastics [4, 25].

The results obtained from this study suggest that gaseous ozone treatment is a promising alternative to current decontamination methods especially for plastic hives. Complete elimination of *P. larvae* spores from hive materials is a requirement to prevent the spread and recurrence of the AFB. Therefore, additional validation studies are still needed to achieve more reduction in the counts of *P. larvae* spores on hive materials.

References

1. Achen M, Yousef AE, (2001). Efficacy of ozone against *Escherichia coli* O157:H7 on apples. J Food Safety. 66, 1380-1384.
2. Alonso-Salces RM, Cugnata NM, Guaspari E, Pellegrini MC, Aubone I, De Piano FG, Antunez K, Fuselli SR, (2017). Natural strategies for the control of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood in honey bees: a review. Apidologie. 48, 387-400.
3. Aydogan A, Gurol MD, (2006). Application of gaseous ozone for inactivation of *Bacillus subtilis* spores. J Air Waste Manage. 56, 179-185.
4. Cullen PJ, Norton T, (2012). *Ozone sanitation in the food industry*. O'Donnell C, Tiwari BK, Cullen PJ, Rice CRG. eds. Ozone in Food Processing, A John Wiley & Sons Ltd., Oxford. p. 163-176.

5. De Candia S, Morea M, Baruzzi F, (2015). Eradication of high viable loads of *Listeria monocytogenes* contaminating food-contact surfaces. Front Microbiol. 6, 1-12.

6. De Guzman ZM, Cervancia CR, Dimasuay KG, Tolentino MM, Abrera GB, Cobar ML, Fajardo AC, Sabino NG, Manila-Fajardo AC, Feliciano CP, (2011). Radiation inactivation of *Paenibacillus larvae* and sterilization of American Foul Brood (AFB) infected hives using Co-60 gamma rays. Appl Radiat Isot. 69, 1374-1379.

7. Del Hoyo M, Basualdo M, Torres J, Bedascarrasbure E, (1998). Use of DHT-equipment for disinfection of AFB-contaminated beehive materials in Argentina. Am Bee J. 138, 738-740.

8. Dobbelaere W, De Graaf DC, Reybroeck W, Desmedt E, Peeters JE, Jacobs FJ, (2001). Disinfection of wooden structures contaminated with *Paenibacillus larvae subsp. larvae* spores. J Appl Microbiol. 91, 212-216.

9. FERA, (2013). Hive cleaning and sterilization. Food and Environment Research Agency, York.

10. Genersch E, (2017). *Foulbrood diseases of honey bees-from science to practice*. Vreeland RH, Sammataro D. eds. Beekeeping-From Science to Practice, Springer, Cham. p. 157-174.

11. Genersch E, Forsgren E, Pentikäinen J, Ashiralieva A, Rauch S, Kilwinski J, Fries I, (2006). Reclassification of *Paenibacillus larvae subsp. pulvifacien*s and *Paenibacillus larvae subsp. larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. Int J Syst Evol Microbiol. 56, 501-511.

12. Guzel-Seydim ZB, Greene AK, Seydim AC, (2004). Use of ozone in the food industry. LWT-Food Sci Technol. 37, 453-460.

13. Hasemann L, (1961). How long can spores of American foulbrood live? Am Bee J. 101, 298-299.

14. Hitchcock JD, Stoner A, Wilson WT, Menapace DM, (1979). Pathogenicity of *Bacillus pulvifaciens* to honeybee larvae of various ages (Hymenoptera: Apidae). J. Kansas Entomol Soc. 52: 238-246.

15. IOA, (1996). Quality assurance committee revised standardized procedure 001/96. International Ozone Association, Scottsdale.

16. James RR, (2011). Potential of ozone as a fumigant to control pests in honey bee (Hymenoptera: Apidae) hives. J Econ Entomol. 104, 353-359.

17. Kasler D, Yousef AE, (2017). *Antimicrobial gases for food application*. Juneja VK, Dwivedi HP, Sofos JN. eds. Microbial Control and Food Preservation, Springer, New York. p. 327-348.

18. Khadre MA, Yousef AE, (2001a). Decontamination of a multilaminated aseptic food packaging material and stainless steel by ozone. J. Food Safety. 21, 1-13.

19. Khadre MA, Yousef AE, (2001b). Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: A comparative study. Int J Food Microbiol. 71, 131-138.

20. Lauro FM, Favaretto M, Covolo L, Rassu M, Bertoloni G, (2003). Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. Int J Food Microbiol. 81, 195-201.

21. Mudd JB, Leavitt R, Ongun A, McManus TT, (1969). Reaction of ozone with amino acids and proteins. Atmos Environ. 3, 669-682.

22. Nascimento MS, Brum DM, Pena PO, Berto MI, Efraim P, (2012). Inactivation of *Salmonella* during cocoa roasting and chocolate conching. Int J Food Microbiol. 159, 225-229.

23. Patil S, Cullen PJ, Bourke P, (2014). *Ozone: a novel microbial inactivation process*. Boziaris IS. ed. Novel Food Preservation and Microbial Assessment Techniques, CRC Press, London. p. 126-154.

24. Restaino L, Frampton EW, Hemphill JB, Palnikar P, (1995). Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. Appl Environ Microbiol. 61, 3471-3475.

25. Rogers JV, Sabourin CLK, Choi YW, Richter WR, Rudnicki DC, Riggs KB, Taylor ML, Chang J, (2005). Decontamination assessment of *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, and *Geobacillus stearothermophilus* spores on indoor surfaces using a hydrogen peroxide gas generator. J Appl Microbiol. 99, 739-748.

26. Silva MV, Gibbs PA, Kirby RM, (1998). Sensorial and microbial effects of gaseous ozone on fresh scad (*Trachurus trachurus*). J Appl Microbiol. 84, 802-810.

27. Wilson WT, (1971). Resistance to American foulbrood in honey bees: XI. Fate of *Bacillus larvae* spores ingested by adults. J Invertebr Pathol. 17, 247-255.

28. Young SB, Setlow P, (2004). Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore resistance to and killing by aqueous ozone. J Appl Microbiol. 96, 1133-1142.

An Investigation of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) and Bovine Parainfluenza Type 3 Virus (BPI3V) Infections in Small-Scale Cattle Herds in Afyonkarahisar Province*

Sibel Gür[1]

[1] *Department of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar, Turkey*

Geliş Tarihi / Received: 04.01.2018, **Kabul Tarihi** / Accepted: 30.05.2018

Abstract: Respiratory and reproductive system disorders are the most important problems of ruminant breeding and cause great economic loss. Bovine viral diarrhea and bovine parainfluenza 3 infections are among the leading respiratory pathogens and are very common in our country. The aim of this study is to serologically investigate the status in family-type small-scale enterprises of these two virus infections throughout Afyonkarahisar province. For this purpose, 1.279 adult cattle blood samples were collected from all the districts, which were not vaccinated recently for these infections. Sera samples were controlled using standard virus neutralization test and seropositive samples were re-tested to determine antibody titers. Pestivirus-specific antibody presence was detected in 978 (74.9%) cattle, and the rates varied between 50.7% (İhsaniye) and 92.8% (Çay) according to the districts. For BPI3V, the least positivity was found in Sinanşa (58.8%) while the highest rate was detected in Emirdag with 97.5%. In total, 82.7% (1.058 / 1.279) seropositivity was determined.

As a result, the determined values for these economically important infections are not very different from those obtained in the country, but are higher than expected due to the target population. Considering that the domestic animal population has decreased, supporting of small producers with national or regional preventive practices is gaining importance.

Key words: Afyonkarahisar, Bovine viral diarrheavirus, bovine parainfluenza 3 virus, serology.

Afyonkarahisar İlinde Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) ve Bovine Parainfluenza Type 3 Virus (BPI3V) Enfeksiyonlarının Küçük Ölçekli Sığır Sürülerinde Araştırılması

Özet: Solunum ve üreme sistem bozuklukları ruminant yetiştiriciliğinin en önemli sorunlarındandır ve büyük ekonomik kayıplara neden olur. Bovine viral diarrhea and bovine parainfluenza 3 enfeksiyonları önde gelen solunum sistemini patojenleri arasındadır ve ülkemizde oldukça yaygındır. Bu çalışmanın amacı, Afyonkarahisar ili genelinde bu iki virus enfeksiyonunun aile tipi küçük ölçekli işletmelerdeki durumunu serolojik olarak araştırmaktır. Bu amaçla tüm ilçelerden, bu enfeksiyonlar için yakın zamanda aşı yapılmamış 1.279 erişkin sığırdan kan örnekleri toplandı. Serum örnekleri standart virus nötralizasyon testi ile kontrol edildi ve seropozitif örnekler antikor titre değerlerinin belirlenmesi için tekrar test edildiler. Pestivirus spesifik antikor varlığı 978 (%74.9) sığırda tespit edildi ve oranların ilçelere göre %50.7 (İhsaniye) ile %92.8 (Çay) arasında değiştiği görüldü. BPI3V için, en az pozitiflik Sinanşa'da (%58.8) iken, en yüksek oran ise %97.5 ile Emirdağ'da tespit edildi. Toplamda ise %82.7 (1.058/1.279) seropozitiflik belirlendi. Sonuç olarak, ekonomik önemi olan bu enfeksiyonlar için tespit edilen değerler, ülkedede elde edilen oranlardan çok farklı değildir ancak hedef populasyon nedeniyle beklenenden daha yüksektir. Yerli hayvan populasyonunun azalması dikkate alınarak, ulusal veya bölgesel koruyucu uygulamalar ile küçük üreticilerin desteklenmesi önem kazanmaktadır.

Anahtar kelimeler: Afyonkarahisar, Bovine viral diarrheavirus, bovine parainfluenza 3 virus, seroloji.

Introduction

Respiratory diseases (BRD) in cattle are one of the most important health problems of dairy cattle breeding all over the world [12]. Diagnosis and treatment of the disease is very difficult due to the complexity of the etiology (number of viruses, bacteria, fungi and mycoplasma), difficulties in differential diagnosis, and the need to use a distinct and specific strategy for each agent and serotype.

Clinical acute BRD rates are higher in winter and especially in dairy herds. Cattle of all ages can be affected, but the prognosis is more severe in the offspring. Factors such as lack of optimal immunity in newborns and young animals, passive immuni-

* *This study was presented at the 7th International Veterinary Congress, Paris, France, on September 4-5, 2017.*
Yazışma adresi / Correspondence: *Sibel Gür, Department of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, ANS Campus, Afyonkarahisar, Turkey. E-mail: sibelgur@aku.edu.tr*

ty regression, malnutrition, weaning and transport stress increase susceptibility to infectious agents and enhance the severity of clinical signs [26,43]. The major causes of heavy economic consequences are deaths, weight loss, yield losses and treatment costs [22,44]. Annual cost for cattle breeders is estimated at US $ 750 million in USA [18]. The cost of individual treatment was approximately $ 15.57 [15], this amount can be as high as $ 92.26 due to yield losses and treatment charges [25].

A wide variety of pathogens, especially viruses and bacteria, cause BRD separately or at the same time [3]. Studies have shown that the primary agents are usually viruses [11] and creates disposition to secondary bacterial infections. The most important causative agents are Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) [13] and Bovine Parainfluenza type 3 virus (BPI3V) [20], which may result in extensive and sometimes fatal lung damage. Besides many other viruses; Bovine Herpesvirus type 1, Bovine Viral Diarrhea, Bovine Adenovirus, Bovine Coronavirus and Influenza Virus, etc. contributes to the multi-etiological spectrum.

Bovine Viral Diarrhea/Mucosal Disease (BVD/MD) virus was first identified in 1946 [28]. The agent is classified in pestivirus genus of the family *Flaviviridae*. According to classifications of the field viruses from all over the world, 7 main antigenic group was determined; BVDV type 1-2, Classical swine fever virus (CSFV), Border Disease virus (BDV) type 1-2-3, and H138 isolate [4]. BVDV type 1 is generally isolated from cattle while type 2 is from small ruminants and vice versa. There are two biotype of the BVDV; cytopathogen (cp) and noncytopathogen (ncp). Pathogenesis of the infection is mainly determined by biotype of the virus and age (immuncompetent status) of the infected host.

Bovine Parainfluenza type 3 virus (BPI3V) is a member of Respirovirus genus of the *Paramyxoviridae* family and closely related to human parainfluenza type 3 [21]. Since the first description in a pneumonic tissue of calves in 1959 [36], disase has been reported all over the world. The viral genome includes single-stranded RNA, helical symmetry, and lipid membrane. The virus mainly affects the respiratory system and leads to susceptibility to bronchopneumonia or secondary bacterial infections alone [16]. Rates of the infection are very high in Turkey [1.29]. The rates in the goat and sheep are also quite high [9,47].

In this study, it was aimed to serologically examine BVDV and BPI3V infections, the most common viral agents causing respiratory tract diseases, in all districts of Afyonkarahisar province, and to reveal realistic profiles of these infections.

Materials and Methods

Sapled animals and study design

Blood serum samples were collected from all of the districts of Afyonkarahisar province; Başmakçı 71, Bayat 44, Bolvadin 87, Çay 84, Çobanlar 66, Dazkırı 57, Dinar 86, Emirdağ 120, Evciler 46, Hocalar 53, İhsaniye 136, İscehisar 93, Kızılören 72, Sandıklı 59, Sinanpaşa 34, Sultandağı 73 and Şuhut 98. Total of 1.279 samples were obtained from 6 months old and above cattle (table 1). Most of the animals were between 2 and 5 years old. The gender of the sampled animals was ignored, but the vast majority of them were female because of their breeding purpose. No clinical signs were detected during sampling. The number of cattle in the sampled herds were among 1 to 30 but was less than 10 in the majority. In addition, there was no Vet service and detailed health records, but according to anamnesis information from farm owners, animals have not been vaccinated in the last two years.

Blood samples were taken from Vena Jugularis in tubes with silicone, centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Sera fractions transferred into stock tubes. After inactivation (30 min at 56°C), samples were stored frozen (-20°C) until use in the test.

Cell culture

Madin Darby bovine kidneys cell culture (ATCC, CCL-22) was used for propagation and titration of the viruses, and virus neutralisation analysis. Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) and Fetal Bovine Serum (FDS) (1-5%) were used as medium. BVDV virus is well recognized as cell contaminant virus [2], test culture was controlled in the aspect of pestivirus antigen (Ag) prior of all tests.

Test viruses

Reference strains of BVDV (NADL) and BPI3V (SF4) was utilized in the tests.

Virus Neutralisation Test (VNT)

Standard VNT is a highly sensitive and reliable method for the detection of many cytopathogenic (cp) viruses, especially in the controlls of specific antibodies (Abs). For the detection of BPI3V and BVDV virus specific antibodies, the blood serums were diluted 1/5 into 96 well microplate with only medium, then the reference strains (SF4 and NADL) calculated as 100 $DKID_{50}$ were added in equal volumes (50 µl). After one hour incubation (5% CO2, 37°C), MDBK cell suspension (300.000 cell/ml) was added to all wells and left to incubation for 1-3 days. Wells were controlled everyday by inverted tissue culture microscope and evaluated according to the micro-morphological changes on the cells.

Each seropositive samples were serially diluted as 1/5, 1/10…1/160 and re-tested to determine Ab titer values.

Results

Titers values of control viruses

Tissue Culture Infective $dose_{50}$ ($100TCID_{50}$) values of the reference test viruses of BPIV-3 (SF-4) and BVDV (NADL) were calculated as $10^{-4.5}$ ve $10^{-3.7}$, respectively.

Serological test results

According to the VNT test, serum dilutions of 1/5 and above were accepted as positive for both viruses. Out of 1.279 blood serum samples from 17 districts, 978 (74.9%) samples were found to be positive for BVDV. Proportions were varied between 50.7% (İhsaniye) and 92.8% (Çay). The mean seropositivity rate for BPI3V was higher for BPI3V with 82.7% (1.058/1.279), lowest proportion was detected in Sinanpaşa (58.8%) while highest at Emirdağ (97.5) districts (table 1).

Ab titer ratios of the BVDV seropositive samples peaked at 1/10 and 1/20 dilution points, but a slight increase was observed after 1/80 (figure 1).

The same titer distribution was also determined for BPI3V, and it was generally seen that the mean Ab titer distribution was similar (figure 2).

Table 1. Sample numbers, districts and BVDV - BPI3V Ab (%) data

No	Localisations	Sample No	BVDV		BPI3V	
			Ab (+)	Ab (%)	Ab (+)	Ab (%)
1	Başmakçı	71	52	73.2	64	90.1
2	Bayat	44	37	84	32	72.7
3	Bolvadin	87	77	88.5	76	87.3
4	Çay	84	78	92.8	75	89.2
5	Çobanlar	66	50	75	47	71.2
6	Dazkırı	57	39	68.4	48	84.2
7	Dinar	86	73	84.8	65	75.5
8	Emirdağ	120	92	76.6	117	97.5
9	Evciler	46	39	84.7	36	78.2
10	Hocalar	53	41	77.3	45	84.9
11	İhsaniye	136	69	50.7	127	93.3
12	İscehisar	93	68	73.1	78	83.8
13	Kızılören	72	63	87.5	59	81.9
14	Sandıklı	59	44	74.5	56	94.9
15	Sinanpaşa	34	27	79.4	20	58.8
16	Sultandağı	73	40	54.7	49	67.1
17	Şuhut	98	69	70.4	64	65.3
Total		**1.279**	**958**	**74.9**	**1.058**	**82.7**

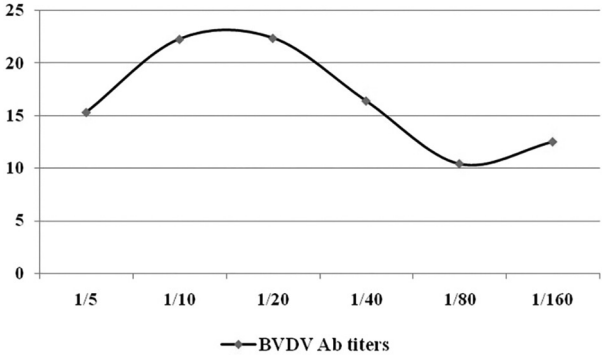


Figure 1. Ab titer distribution of BVDV seropositive samples (%)

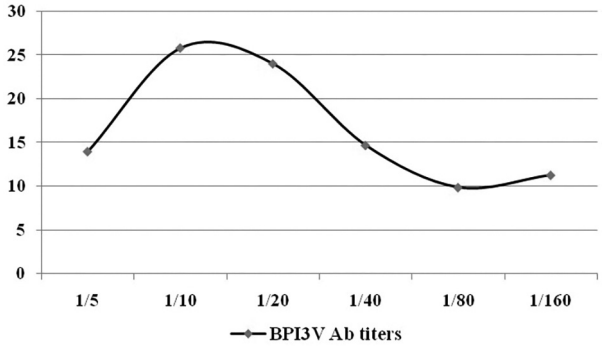


Figure 2. Ab titer distribution of BPI3V seropositive samples (%)

Discussion

In this study, the sampling was carried out whole districts of the Afyonkarahisar province to reveal a realistic prophile for the two infections. Ruminant pestiviruses are among the most problematic infections in Turkey. In this study, 978 (74.9%) positive BVDV samples were found from 1.279 blood samples from 17 districts. Rates at any localization were not less than 50% and varied between 50.7% (İhsaniye) and 92.8% (Çay).

In previous studies in Afyonkarahisar province, 98.2% seropositivity for pestiviruses was detected in an organized dairy herd containing more than 1.000 cattle [30]. Ratios in small-scale private farms were investigated before using 972 samples from 9 districts in the same province, with an average rate of 84.6% (ranging from 73.6% to 95.2%) [14]. Ruminant pestiviruses were also investigated in goats and found to have an infection rate of 61.8% (435/703) [19].

Investigations in different regions of the country in the last decade show that pestiviruses are quite common in throughout the country. The reported rates in Central Anatolia are 82.6%, 75.2% in Isparta, 71.5% in Diyarbakır and 81.5% in Burdur [31]. Burgu et al. [6] 26 were controlled dairy herds in different regions of the country and sero positivity was reported as 24.8% (2.589/10.419) and 0.32% (40/12.413) Ag positivity in adult cattle.

BPI3V seroposivity rate was found to be higher than pestivirus in this study, and one of the highest in Turkey. Out of 1.279 adult cattle 1.058 was found to be seropositive (82.7%). The least value was 58.8%, while the highest was 97.5% in the studied districts. Studies related to BPI3V more focused on cattle in Turkey, the serological ratios reach 100%. Seropositivity was detected as 88% in 15 of 17 cattle herds located in Southeastern Anatolia [10]. Burgu et al. [8] found 94.37% antibody presence in cattle herds with respiratory system disorders and found that the agent was BPI3V. Yavru et al. [46] was determined 53.9% in the samples taken from a local slaughterhouse in Konya. Özdarendeli and Kandil [29] were resported 89.7% in Malatya. BPI3V Abs were determined as 26.4% in goats in the Afyonkarahisar previously [19].

BRD is a multi-factoral problem worldwide. Dairy herds are at greater risk than beef herds [27]. In an epidemiological study of 16.581 cattle herds across France, the acute BRD rate was 9.8% with 6.5% lethality (17). Proportion of acute illness is much higher (35%) in Norway [27]. The severity of acute clinical BRD is basically increased by the presence of immunosuppressive factors. The emergence of clinical disorders of respiratory system infections in autumn and winter is not only due to the effect of cold but also due to the possibility of aerosol transmission in closed management conditions. Bad ventilation, transport, low temperatures, high humidity and population densities are also creates predisposition [12].

Besides the major effective viral agents of ABRD, pathology is largely dependent on secondary pathogenesis. Leukocyte dysfunction during pestivirus infection [40] leads to problems such as prolonged clearance of other viruses [33], immunosuppression [24,33] and susceptibility to secunder infections [35]. BPI3V is among the leading causes of clinical respiratory disorders and is widespread throughout the world. Pasteurella multocida and Mannheimia haemolitica and some other viruses are frequently isolated during acute BPI3V infection [16,23,39] and also increase the severity of prognosis. It should be noted that pestivirus infections have a potential role in increasing the efficacy of BPI3V infection. In this study, it is difficult to make a definite decision because of the lack of antigen screening data, but the obtained high rates indicate the high level of viral exposure. It is known that BVD is among the major factors in multiple etiologic infections [32,33,35,41]. Due to the presence of a close antigenic relationship between BVDV 1 and 2, the formatted antibodies are cross-react. Circulating type/types are not the subject of this study. However, in a molecular study in Turkey, type 1 isolates were from cattle while type 2 from sheep [48], as expected. BVD is often seen to be complicated with infectious bovine Rhinotracheitis (IBR), BRSV, *Pasteurella spp.,* etc. under field conditions [33,34,37,38]. PI animals can not be clinically diagnosed because of the absence of specific clinical findings, but they are constantly shedding the virus and leading to various health problems and significant economic losses.

Cattle breeding in Anatolia have been carried out almost entirely in small and medium-sized family-type enterprises. Especially in the last two decades, the number of intensive breeding of enterprises is increasing despite the significant decline in the total number of cattle. Nevertheless, the vast majority of current livestock are in small-scale enterprises, especially in rural areas. Traditional management methods are practiced in private small farms and include many objectionable factors; absence of regular health records and vet consultancy, inadequate preventive measures against infections, malnutritions, inappropriate management conditions, etc. However, significant advantages can be mentioned. The most important of them; grasslands usage at the vast majority of the year reduces nutritional expenses and lower level of viral infections which cause to major economic costs.

Afyonkarahisar province is one of the leading provinces in terms of cattle population in Turkey. Cattle breeding are the most targeted beef production. The breeding period is short and the use of pasture is very limited due to the climatic and environmental features of the region. BRD continues to be one of the main health problems in the province. Necessary protective health practices ignored due to short-term breeding. Closed system intensive management style causes high incidence of especially viral infections. Cattle raised in indoor conditions are exposed to a higher burden of airborne pathogens and airborne pollutants such as ammonia, endotoxins and dust particles [12]. Breeding aim was generally dual and most of the disadvantages mentioned above are not the issue in this study. The rate of pestivirus has recently been reported as 98.2% in organized farms [30]. Although the obtained value in this study (74.9%) was not low, it can not be said to be far above the country average [5,7,42,45].

However, both infections investigated were found to be at a higher than expected due to the targeted population. Presence of acute or more likely PI animals in the vicinity seems very possible. Common pasture use in village conditions, proximity of farms to one another and inter-farm iatrogenic transmission may be possible factors for transmission of the viruses.

Considering the persistence characteristics of BVDV, it appears that long-term economic losses have the potential to continue or increase. This possibility is also valid for BPI3V. The absence of preventive medicine practices is the main problem of small private enterprises. Countrywide or regional extensive studies aiming control/eradication of the prominent infections should be regarded as a requirement, considering narrowed domestic livestock.

Acknowledgement

This study was supported by Afyon Kocatepe University, Scientific Research Commission (Project Number: 16.KARİYER.95).

References

1. Alkan F, Özkul A, Karaoğlu MT, Bilge S, Akça Y, Burgu İ, Yeşilbağ K, Oguzoğlu TÇ, (1997). *Sığırlarda viral nedenli solunum sistemi enfeksiyonlarinin seroepidemiyolojisi.* Ankara Univ Vet Fak Derg. 44, 73-80.
2. Audet S, Crim R, Beeler J, (2000). *Evaluation of vaccines, interferons and cell substrates for pestivirus contamination.* Biologicals 28(1), 41-46.
3. 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.
4. Becher P, Avalos Ramirez R, Orlich M, Cedillo Rosales S, König M, Schweiser M, Stalder H, Schirrmeier H, Thiel HJ, (2003). *Genetic and antigenic characterisation of novel pestivirus genotypes: implications for classification.* Virology 311, 96-104.
5. Bilgili İ, (2016). *Isparta ili ve çevresinde sığırcılık İşletmelerinde bovine viral diyare virus (BVDV) Enfeksiyonunun serolojik olarak araştırılması.* Yüksek Lisans Tezi. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
6. Burgu İ, Alkan F, Özkul A, Yesilbağ K, Karaoğlu MT, Güngör B (2003). *Türkiye'de süt sığırcılığı işletmelerinde bovine viral diarrhea virus (BVDV) enfeksiyonunun epidemiyolojisi ve kontrolü*. Ankara Univ Vet Fak Derg,50:127-133.
7. Burgu İ, Özkul A, (1993). *Detection by cultural isolation of bovine viral diarrhoea virus following field infections in cattle and their fetuses in Turkey.* Dtsch Tierarztl Wochenschr. 100, 361-363.
8. Burgu İ, Öztürk F, Akça Y, Toker A, (1984). *Karacebey harası sığırlarında parainfluenza-3 virusunun neden olduğu viral pnömoni olayı.* Ankara Univ Vet Fak Derg. 31(2), 180-185.
9. Çabalar M, Ataseven VS, (1999). *Van yöresinde koyunlarda parainfluenza virus-3, bovine herpes virus-1 ve respiratory syncytial virus enfeksiyonlarının serolojik olarak araştırılması.* YYÜ Sağ Bil Derg. 5, 73-78.
10. Çabalar M, Can-Şahna K, (2000). *Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde süt sığırlarında Parainfluenza Virus-3, Bovine Herpesvirus-1 ve Respiratory Syncitial Virus enfeksiyonlarının seroepidemiyolojisi.* YYÜ Vet Fak Derg. 11(2), 101-105.
11. Caldow 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.
12. Callan RJ, Garry FB, (2002). *Biosecurity and bovine respiratory disease.* Vet Clin North Am Food Anim Pract. 18, 57-77.

13. Elvander M, (1996). *Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncitial virus.* Vet Rec. 138, 101-105.

14. Erol N, Gür S, Acar A, (2014). *A serological investigation for Bovine Viral Diarrhea Virus infection in and around Afyonkarahisar province, West Anatolia.* Kocatepe Vet J. 7(1), 17-21.

15. Faber R, Hartwig N, Busby WD, BreDahl R, (1999). *The costs and predictive factors of bovine respiratory disease in standardized steer tests.* AS Leaflet, R1648. Iowa State Univ. Beef Research Report.

16. 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.

17. Gay E, Barnouin J, (2009). *A nation-wide epidemiological study of acute bovine respiratory disease in France.* Prev Vet Med. 89, 265-271.

18. Griffin D, (1997). *Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle.* Vet Clin N Am Food Anim Pract. 13, 367–377.

19. Gür S, Erol N, Yapıcı O, (2009). *Afyon, Konya ve Eskişehir illerinde keçilerde pestivirus ve Parainfluenza virus tip 3 enfeksiyonlarının serolojik olarak araştırılması.* Kocatepe Vet J. 2(1), 23-27.

20. 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, 193-2000.

21. Henrickson KJ, (2003). *Parainfluenza Viruses.* Clin Microbiol Rev.16, 242–264.

22. Hurd HS, Kaneene JB, Lloyd JW, Hars SB, (1995). *Application of a stochastic distributed delay simulation model to financial analysis of respiratory disease in Michigan dairy cattle.* Prev Vet Med. 24, 117-128.

23. Jericho KWF, Darcel CleQ, Langford EV, (1982). *Respiratory Disease in Calves Produced with Aerosols of Parainfluenza-3 Virus and Pasteurella haemolytica.* Can J Comp Med. 46, 293-301.

24. Lee SR, Nanduri B, Pharr GT, Stokes JV, Pinchuk LM, (2009). *Bovine viral diarrhea virus infection affects the expression of proteins related to Professional antigen presentation in bovine monocytes.* Biochim Biophys Acta 1794, 14-22.

25. McNeill JW, Paschal JC, McNeill MS, Morgan WW, (1996). *Effect of morbidity on performance and profitability of feedlot steers.* J Anim Sci (Suppl. 1) 74.

26. Muggli-Cockett NE, Cundiff LV, Gregory KE, (1992). *Genetic analysis of bovine respiratory disease in beef calves during the first year life.* J Anim Sci. 70, 2013–2019.

27. Norstrom M, Skjerve E, Jarp J, (2000). *Risk factors for epidemic respiratory disease in Norwegian cattle herds.* Prev Vet Med. 44, 87-96.

28. Olafson P, Maccallum AD, Fox FH, (1946). *An apparently new transmissible disease of cattle.* Cornell Vet. 36, 205-213.

29. Özdarendeli A, Kandil M, (2001). *Malatya'da Sığırlarda Parainfluenzavirus Tip-3 Enfeksiyonu Üzerinde Serolojik Araştırma.* Turk J Vet Anim Sci. 25, 223-226.

30. Özel M, Gür S, (2015). *Serological investigation for Bovine Viral Diarrhea and Bovine Herpesvirus Type-1 Viruses in precolostral calves and their dams.* Harran Univ Vet Fak Derg, 4(2), 57-63.

31. Özturk D, Kale M, Pehlivanoglu F, Hasırcıoglu S, Turutoglu H, (2012). *Evaluation for Some Bacterial and Viral Abortions of Dairy Cattle Farms in Burdur District of Turkey.* Kafkas Univ Vet Fak Derg. 18(2), 255-258.

32. Pollreisz JH, Kelling CL, Brodersen BW, Perino LJ, Cooper VL, Doster AR, (1997). *Potentiation of bovine repiratory syncytial virus infection in calves by bovine viral diarrhea virus.* Bovine Pract. 31, 32-38.

33. Potgieter LND, McCracken MD, Hopkins FM, Walker RD, (1984). *Effect of bovine viral diarrhea virus infection on the distribution of infectious bovine rhinotracheitis virus in calves.* Am J Vet Res. 45, 687-690.

34. Pritchard GC, Borland ED, Wood L, Pritchard DG, (1989). *Severe disease in a dairy herd associated with acute infection with bovine viral diarrhoea virus, Leptospira hardjo and Coxiella burnetii.* Vet Rec. 124, 625-629.

35. Reggiardo C, Kaeberle ML, (1981). *Detection of bacteremia in cattle inoculated with bovine viral diarrhea virus.* Am J Vet Res. 42, 218-221.

36. Reisinger RC, Heddleston KL, Manthel CA, (1959). *A myxovirus (SF-4) associated with shipping fever of cattle.* J Am Vet Med Ass. 135, 147-152.

37. 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.

38. Ridpath J, (2010). *The contribution of infections with bovine viral diarrhea viruses to bovine respiratory disease.* Vet Clin North Am Food Anim Pract. 26, 335-348.

39. Rosenquist BD, English JE, Johnson DW, Loan RW, (1970). *Mixed viral etiology of a shipping fever epizootic in cattle.* Am J Vet Res. 31, 989-994.

40. Roth JA, Kaeberle ML, Griffith RW, (1981). *Effects of bovine viral diarrhea virus infection on bovine polimorphonuclear leucocyte function.* Am J Vet Res. 42, 244-250.

41. Siegler HH, Marschang F, Morscher H, (1984). *Beobachtungen über Zusammenhänge zwischen Virusinfectionen und boviner mastitis.* Tierärztl Umschau. 39, 602-604.

42. 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), Infeksiyöz Bovine Rhinotracheitis (IBR) ve Mavi Dil (BT) Enfeksiyonlarının Rollerinin Araştırılması.* Dicle Üniv Vet Fak Derg. 10(1), 13-18.

43. Snowder 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.

44. Van der Fles-Klerx HJ, Sorensen JT, Jalvingh AW, Huierne RB, (2001). *An economic model to calculate farm-specific model to calculate farm-specific losses due to bovine respiratory disease in dairy heifers.* Prev Vet Med, 51, 75-94.

45. Yavru S, Simsek A, Kale M, Bulut O, Yapıcı O, Avcı O, Dik I, (2013). *Sütçü sığırların kan ve süt serumlarında Bovine Viral Diarrhea Virus antikorlarının ELISA ile belirlenmesi.* Eurasian J Vet Sci. 29(2), 097-102.

46. Yavru S, Şimşek A, Yapkıç O, Kale M, (2005). *Serological evaluation of viral infections in bovine respiratory tract.* Acta Vet Beograd 55(2-3), 2005.

47. 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, 268-71.

48. Yeşilbağ K, Förster C, Wolf BB, Yılmaz Z, Alkan F, Özkul A, Burgu İ, Rosales SC, Thiel TJ, König M, (2008). *Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: Identification of a new subgroup in BVDV-1.* Vet Microbiol. 130, 258-267.

Etlik Vet Mikrobiyol Derg, 2018; **29 (1):** 57-62 **Araştırma Makalesi** / Research Article

Kanatlı Kökenli *Escherichia coli*'lerin Filogruplandırılması*

Mehmed Omerovic, H. Kaan Müştak

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

Geliş Tarihi / Received: 01.03.2018, **Kabul Tarihi** / Accepted: 02.05.2018

Özet: Filogruplandırma, *Escherichia coli* suşlarının karakteristik özelliklerinin anlaşılması, enfeksiyonların önlenmesi, kontrol edilmesi ve yeni tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada, kanatlı kökenli avian patojenik *E. coli* (APEC) ve avian fekal *E. coli* (AFEC) suşlarının filogruplandırılması amaçlandı. Çalışmada 150 adet APEC ve 150 adet AFEC suşunun filogruplandırılması kuadrupleks PCR metodu ile gerçekleştirildi. Çalışma sonucu 150 APEC suşunun 4'ü A (%2.66), 43'ü B_1 (%28.66), 38'i B_2 (%25.33), 2'si C (%1.33), 18'i E (%12), 5'i F (%3.33), 1'i Clade I (%0.66), 2'si negatif (%1.33) olarak belirlenirken 37 (%24.66) suş gruplandırılamadı. İncelenen 150 AFEC suşunun ise 5'i A (%3.33), 8'i B_1 (%5.33), 16'sı B_2 (%10.66), 16'sı C (%10.66), 1'i D (%0.66), 27'si E (%18), 9'u F (%6), 3'ü Clade I veya Clade II (%2) olarak gruplandırılırken 51 (%34) gruplandırılmadı. *Escherichia coli* enfeksiyonlarının önlenmesi amacıyla geliştirilecek olan aşılarda yersel suşların kullanılması ve bu suşlara ait özelliklerin belirlenmesi gerektiği bilinmektedir. Bu nedenle, elde edilen sonuçlar epidemiyolojik açıdan önem taşımaktadır. Bununla birlikte çalışma sonunda, genotipik olarak çeşitlilik gösteren *E. coli* suşlarından, özellikle APEC suşlarının, daha detaylı genotipik analizler yapılarak yeni filogrupların araştırılması gerektiği vurgulandı.

Anahtar kelimeler: AFEC, APEC, *Escherichia coli*, filogruplandırma.

Phylogrouping of *Escherichia coli* Strains Originated From Poultry

Abstract: Phylogrouping has a major role to understand the characteristic features of *E. coli* strains, control and establishment of new treatment methods. This study was aimed to phylogrouping the strains of avian pathogenic *E. coli* (APEC) and avian fecal *E. coli* (AFEC). A total of 150 samples of APEC and 150 samples of AFEC were analyzed and phylogrouped using quadruplex PCR method. Among the APEC samples, it was determined that 4 (2.66%) belonged to group A, 43 (28.66%) belonged to group B_1, 38 (25.33%) belonged to group B_2, 2 (1.33%) belonged to group C, 18 (12%) belonged to E, 5 (3.33%) belonged to group F, 1 (0.66%) belonged to Clade I, 2 (1.33%) were negative and 37 (24.66%) was ungrouped. On the other hand among AFEC samples, 5 (3.33%) belonged to A group, 8 (5.33%) belonged to B_1, 16 (10.66%) belonged to B_2 group, 16 (10.66%) belonged to C group, 1 (0.66%) belonged to D group, 27 (18%) belonged to E group, 9 (6%) belonged to F group, 3 (2%) belonged to Clade I or Clade II and 51 (34%) were ungrouped. It is known that the use of terrestrial strains in vaccines to be developed in order to prevent *E. coli* infections and the properties of these strains should be determined. The results obtained for this reason are of epidemiological importance. In addition, regarding *E. coli* strains, especially APEC, which show genotypic diversity, more research needs to be done to investigate new phylogroups.

Key words: AFEC, APEC, *Escherichia coli*, phylogrouping.

Giriş

Kanatlı hayvanlarda, *Escherichia coli* suşları, kanatlı sektöründe bağırsak dışı enfeksiyonlara (ekstraintestinal) veya bağırsak enfeksiyonlarına (intestinal) yol açarak ciddi ekonomik kayıplara neden olabilmektedir [4, 10]. Kanatlılarda, bağırsak enfeksiyonlarına neden olan ve dışkıdan izole edilen, fekal, fakültatif patojen *E. coli* suşları avian fekal *E. coli* (AFEC) olarak isimlendirilmektedir. Avian patojenik *E. coli* (APEC) suşları ise, kommensal olarak, sağlıklı hayvanların bağırsak florasında bulunan bakteriler olup, vücudun çeşitli organ ve sistemlerine yerleşerek ekstraintestinal enfeksiyonlara neden olmaktadırlar [4].

Diğer hayvanlarda ise, bağırsak enfeksiyonlarına neden olan intestinal *E. coli* suşlarının ortak adı, ishal yapan (Diyarejenik) *E. coli* (DEC)'dir. Barsak patotipleri ise,enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Vero- veya Shiga-toksin üreten *E. coli* (VTEC veya STEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) ve diffuz aderent *E.*

**Bu makale ilk yazarın yüksek lisans tezinden hazırlanmıştır.*

Yazışma adresi / Correspondence: *H. Kaan Müştak (ORCID: 0000-0002-3694-1959), Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Dışkapı, Ankara E-posta: kaanmustak@gmail.com*

coli (DAEC)'dir. Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC)'ler kommensal olarak, sağlıklı hayvanların bağırsak florasında yer alır. Bu bakteri grubunda septisemik patojenik *E. coli* (SEPEC), üropatojenik *E. coli* (UPEC), meme patojenik *E. coli* (MPEC) ve rahim enfeksiyonlarına neden olan endometriyal patojenik *E. coli* (EnPEC) bulunur [4].

Escherichia coli patotipleri ile yapılan karşılaştırmalı genomik analizler ve epidemiyolojik çalışmalar *E. coli*'nin genetik yapısını ortaya çıkarmış ve *E. coli* içerisinde genotipik olarak farklı filogrupların varlığına işaret ederek bu türde geniş bir altyapının var olduğunu göstermiştir [6, 11]. Yapılan çalışmalara göre, *E. coli* suşları, 4 ana filogenetik gruptan birine girmektedir. Bunlar A, B1, B2 ve D'dir. Bu dört filogrubun birbirinden farklılaştığı fenotipik özellikler ise farklı şekerleri metabolize etme yeteneği, antibiyotik direnç profilleri ve büyüme hızı-sıcaklık ilişkisidir. Ekstraintestinal patojenik suşlar genellikle B_2 ve D; kommensal suşlar ise A ve B_1 gruplarında yer almaktadır. *Escherichia coli* populasyonlarının filogenetik analizlerinde ayrım gücünü artırmak için çeşitli genetik markerlar ile A_0, A1, B1, $B2_2$, $B2_3$, D_1 ve D_2 altgrupları oluşturulmuştur [1, 2].

Filogenetik grupların (A, B_1, B_2 ve D) belirlenmesi için *chuA* ve *yjaA* genleri ile TspE4C2 DNA fragmentinin kullanıldığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli yöntem kullanılmaktadır. 2013 yılında geliştirilen ve *arpA* geni de eklenerek yapılan kuadrupleks PCR tabanlı filogrup belirleme metoduyla 8 filogrup (A, B_1, B_2, C, D, E, F ve *E. coli* klan 1) belirlenebilmiştir. Bu yöntemle belirlenen yeni gruplar içerisinde yer alan Grup C, B_1 grubu ile yakın ilişkili olmasına rağmen farklı genotipte suşları da içermektedir. Grup E, eskiden sınıflandırılmamış suşları içeren yeni bir grup olarak tanımlanmış, grup F, B_2'inin kardeş grubu olarak belirlenmiştir. *Escherichia* Clade I ise fenotipik olarak *E. coli*'den ayırt edilemeyen ancak genotipik olarak farklı bir filogrup olarak tanımlanmıştır [1, 2]. Clermont ve ark. [2], filogruplandırma sonucunda herhangi bir gruba girmeyen *E. coli* suşlarını "gruplandırılamayan" şeklinde gruplandırmış ve bu suşlara MLST (Multilocus sequence typing) yapılmasını önermişlerdir.

Filogruplandırma, *E. coli* suşlarının özelliklerinin belirlenmesi suretiyle enfeksiyonların önlenmesi, kontrol edilmesi ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır [2]. Bu çalışmada, kanatlı kökenli *E. coli* (APEC ve AFEC) suşlarının filogruplandırılması ve elde edilen sonuçların karşılaştırılması amaçlandı.

Materyal ve Metot

Kullanılan Suşlar

Bu çalışmada, 2015-2017 yılları arasında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kanatlı Hayvan Hastalıkları Laboratuvarına gönderilmiş olan *E. coli* şüpheli, septisemi sonucu ölen tavuklara ait iç organlardan (kalp, karaciğer, dalak) izole ve identifiye edilen 150 APEC suşu kullanıldı. Bununla birlikte, 150 AFEC suşu ise, yine aynı yıllar arasında aynı kümeslerden gelmiş olan altlık ve dışkı örneklerinden izole ve identifiye edildi (Tablo 1). İzole ve identifiye edilen *E. coli* suşları daha sonra kullanılmak amacıyla %20 gliserin ilave edilmiş TSB (Merck, Almanya)'de süspanse edilerek -80°C'de saklandı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Dalı'na ait suş koleksiyonundan alınan A grubu için *E. coli* AVMC92-01, B_1 grubu için *E. coli* AVMC92-02, B_2 grubu için *E. coli* AVMC92-03, C grubu için *E. coli* AVMC92-04, D grubu için *E. coli* AVMC92-05, E grubu için *E. coli* AVMC92-06 ve F grubu için *E. coli* AVMC92-07 suşu pozitif kontrol olarak tüm testlerde kullanıldı.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan suş sayıları ve bu suşların örneklenen organlara göre dağılımı.

Organ	APEC	AFEC	Toplam
Kalp	53	-	53
Karaciğer	56	-	56
Dalak	41	-	41
Altlık	-	68	68
Dışkı	-	82	82
Toplam	**150**	**150**	**300**

Escherichia coli Filogruplarının Belirlenmesi

Bu çalışmada, kanatlı kökenli *E. coli*'lerin filogruplandırılması amacı ile Clermont ve ark. [2]'nın uyguladığı kuadrupleks PCR yöntemi kullanıldı. Bu amaçla, Thermo Scientific GeneJET Genomik

DNA Purification Kiti ile DNA ekstraksiyonu yapılan 300 *E. coli* suşuna ait DNA'da bulunan gen bölgeleri Tablo 2'de gösterilen primerler ile çoğaltıldı. Reaksiyon, her primerden 0.2 µM, 200 µM dNTP, 2.5 µl PCR reaksiyon buffer, 3 mM $MgCl_2$, 2 U Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific; EP0402) ve 1 µl template DNA'nın bulunduğu 25 µl PCR karışımı içerisinde gerçekleştirildi. Amplifikasyon için 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takip eden 30 siklus (grup E ve C için 28 siklus), denatürasyon 94°C'de 5 sn, bağlanma 60°C'de (grup E ve C için 57°C) 20 sn, uzama 72°C'de 5 sn ve 72°C'de 5 dk son uzama aşaması uygulandı [2]. Agaroz jel elektroforez sonucu elde edilen bant görüntüleri Biyo-görüntüleme sistemi (Syngene) kullanılarak değerlendirildi.

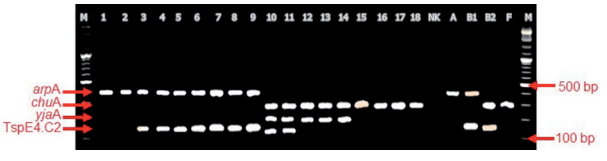
Tablo 2. Kuadrupleks PCR için kullanılan primelerin dizileri, bağlandıkları spesifik gen bölgeleri ve PCR ürünlerinin uzunlukları [2].

Metod	Primer	Gen	Sekans	PCR Ürünü (bp)
Kuadrupleks	chuA.1b	*chu*A	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288
	chuA.2		TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
	yjaA.1b	*yja*A	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	211
	yjaA.2		AATGCGTTCCTCAACCTGTG	
	TspE4C2.1b	TspE4C2	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152
	TspE4C2.2b		AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	
	AceK.f	*arp*A	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400
	ArpA1.r		TCTCCCCATACCGTACGCTA	
Grup E	ArpAgpE.f	*arp*A	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	301
	ArpAgpE.r		GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	
Grup C	trpAgpC.1	*trp*A	AGTTTTATGCCCAGTGCGAG	219
	trpAgpC.2		TCTGCGCCGGTCACGCCC	
Internal Kontrol	trpBA.f	*trp*A	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489
	trpBA.r		GCAACGCGGCCTGGCGGAAG	

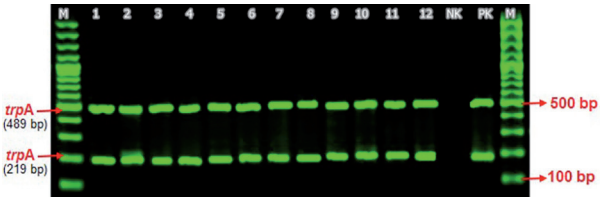
Grup A, C, B_1, B_2, D, E, Clade I ve F gruplarının belirlenmesinde *chu*A, *yja*A ve *arp*A genleri ile TSPE4C2 DNA fragmanı kullanıldı. Kuadrupleks PCR sonucu bu genlerin bulunması ve/veya bulunmamasına göre gruplar belirlendi. Kuadrupleks PCR sonucunda grup A veya C, D veya E ve E veya Clade I çıkan suşların hangi gruba dahil olduğunu tespit etmek için ayrıca konvansiyonel tekli PCR yapıldı. Grup E ve grup C'nin belirlenmesinde ise sırasıyla, ArpAgpE.f, ArpAgpE.r ile trpAgpC.1, trpAgpC.2 primer dizileri kullanıldı. Aynı zamanda, grup E ve C'nin belirlenmesinde PCR yönteminin kontrolü için internal kontrol kullanıldı [2].

Bulgular

İzole edilen *E. coli* suşlarında *arp*A, *chu*A, *yja*A, TspE4.C2 (kuadrupleks PCR) ve *arp*A, *trp*A, (Grup C ve E) genlerinin varlığı araştırıldı. Bu genlerin bulunup bulunmamasına göre *E. coli* suşlarının filogruplandırılması yapıldı (Şekil 1, Şekil 2 ve Şekil 3).

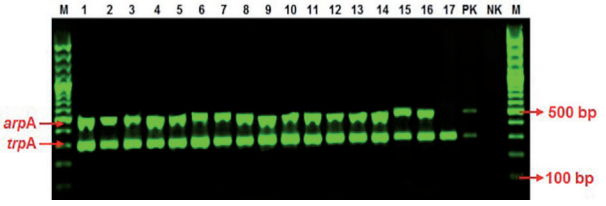


Şekil 1. Kuadrupleks PCR jel elektroforez görüntüsü. *arp*A (400 bp), *chu*A (288 bp), *yje*A (211 bp) ve TspE4.C2 (152 bp) genleri. 1-2, A pozitif örnekler (+,-,-,-); 3-9, B_1 pozitif örnekler (+,-,-,+); 10-14, B_2 pozitif örnekler (-,+,+,+/-,+,+,-); 15-18, F pozitif örnekler (-,+,-,-) ; M, moleküler marker; NK, negatif kontrol; A, A grup pozitif kontrol; B1, B_1 grup pozitif kontrol; B2, B_2 grup pozitif kontrol ve F, F grup pozitif kontrol.



Şekil 2. Grup C PCR jel elektroforez görüntüsü. *trp*A (489 bp) ve *trp*A (219 bp) genleri. 1-12, C pozitif örnekler; M, moleküler marker; NK, negatif kontrol; PK, C grup pozitif kontrol.

İncelen 150 APEC suşunu 4'ü A (%2,66), 43'ü B_1 (%28,66), 38'i B_2 (%25,33), 2'i C (%1,33), 18'i E (%12), 5'i F (%3,33), 1'i Clade I (%0,66), 2'si negatif (%1.33) olarak belirlendi. Geriye kalan 37 örnek ise gruplandırılamadı (Tablo 3). İncelenen 150 AFEC suşunun ise 5'i A (%3,33), 8'i B_1 (%5,33), 16'sı B_2 (%10,66), 16'sı C (%10,66), 1'i D (%0,66), 27'si E (%18,00), 9'u F (%6,00), 3'ü Clade I veya Clade II (%2,00) olarak belirlendi. Geriye kalan 51 örnek ise belirlenmiş bir gruba girmedi (Tablo 3).



Şekil 3. Grup E PCR jel elektroforez görüntüsü. *trp*A (489 bp) ve *arp*A (301 bp) genleri. 1-17, E pozitif örnekler; M, moleküler marker; NK, negatif kontrol; PK, E grup pozitif kontrol.

Tablo 3. APEC ve AFEC suşların filogruplandırılma sonuçları.

Kuadrupleks PCR				Filogrup	İncelenen suşlar	
arpa **(400 bp)**	***chu*A (288 bp)**	***yja*A (211 bp)**	**TspE4.C2 (152 bp)**		**APEC Sayı (%)**	**AFEC Sayı (%)**
+	-	-	-	A	4 (2,66)	-
+	-	+	-	A	-	5 (3,33)
+	-	-	+	B1	43 (28,66)	8 (5,33)
-	+	-	+	B2	4 (2,66)	-
-	+	+	+	B2	28 (18,66)	5 (3,33)
-	+	+	-	B2	6 (4)	11 (7,33)
+	-	+	-	C	2 (1,33)	16 (10,66)
+	+	+	-	Clade I	1 (0,66)	14 (9,33)
-	-	+	-	Clade I veya II	-	3 (2)
+	+	-	+	D	-	1 (0,66)
+	+	-	-	E	18 (12)	27 (18)
-	+	-	-	F	5 (3,33)	9 (6)
+	-	+	+	Gruplandırılamayan	27 (18)	9 (6)
+	+	+	+	Gruplandırılamayan	10 (6,66)	42 (28)
-	-	-	-	Negatif	2 (1,33)	-

Tartışma ve Sonuç

Escherichia coli tüm sıcakkanlı hayvanların ve insanların gastrointestinal sistemlerinde en yaygın görülen mikroorganizmalardan biridir. *E. coli*, hem hayvanlarda hem de insanlarda yaraların fırsatçı enfeksiyonlarından ciddi sistemik enfeksiyonlara kadar değişen çeşitlilikte hastalıklara neden olmaktadır. APEC patotiplerinin neden olduğu ekonomik kayıplar ve etkenin zoonoz karakteri kanatlı endüstrisi için büyük önem teşkil etmektedir [10]. Filogruplandırma ise *E. coli* suşlarının genotipik olarak sınıflandırılmasında kullanılan ve bu sayede

E. coli'lerin özelliklerinin anlaşılması ile enfeksiyonların önlenmesi, kontrol edilmesi ve yeni tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

Ekstraintestinal *E. coli* enfeksiyonlarından sorumlu olduğu bilinen B_2 ve D gruplarının [9], kommensal olan A veya B_1 grupları ile karşılaştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır [5, 8]. Fernanda ve ark. [3]'nın 149 APEC suşunu Clermont ve ark. [1]'nın metoduna göre filogruplandırdıkları çalışmalarında APEC suşlarının A (%42,95), B_1 (%34,22), B_2 (%2,01), C (%6,71), D (%4,02), E (%4,02) ve F (%6,04) grubuna dahil olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada da benzer sayıda (n: 150) APEC suşu araştırılmış olup, Fernanda ve ark. [3]'nın yaptığı çalışmaya göre, B_1 (%28.66) ve F (%3.33) grupları yönünden benzer, ancak A (%2,66), B_2 (%25,33), D (%0,00) ve E (%12,00) grupları yönünden farklı sonuçlar gözlendi. Buna göre B_2 ve E grupları daha yüksek, A grubu düşük oranda belirlenirken D grubu tespit edilemedi. Kümes için APEC kontrol programlarındaki farklılıklar veya tavuk yetiştiriciliği için alınan ülkesel önlemler bazı kümeslerde patojen bazı ülkelerde ise kommensal APEC suşlarının baskın olduğunu göstermektedir [3, 5, 8]. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, incelenen APEC'lerin içerisinde kommensal suşlar kadar ekstraintestinal suşların da bulunduğunu ve patojen suş sayısının azaltılması yönünde gerekli biyogüvenlik önlemlerinin alınması gerektiğini gösterdi. Buradan çıkarılan diğer bir sonuç ise APEC'lere ilişkin koruma programlarının geliştirilmesinde yapılacak araştırmalarda filogruplandırma yönteminin de kullanılmasının uygun olacağı yönünde oldu.

Logue ve ark. [7], 452 adet APEC ve 199 adet AFEC suşunu tripleks PCR ile filogruplandırdıkları çalışmalarında [2] APEC suşlarını A %38,05, B_1 %17,25, B_2 %15,92 ve D %10,05; AFEC suşlarını A %45,22, B_1 %28,14, B_2 %16,58 ve D %10,05 oranlarında bildirmişlerdir. Aynı örnekleri kuadrupleks PCR metoduna göre [1] tekrar filogruplandırmış ve APEC suşlarını A %10,17, B_1 %18,58, B_2 %15,26, C %27,65, D %5,08, E %3,31, F %19,26, Clade I %0,44 ve gruplandırılamayanları %0,22 oranında; AFEC suşlarını ise A %36,18, B_1 %28,64, B_2 %11,05, C %6,53, D %7,03, E %4,52, F %4,02 ve Clade I %2,01 oranında belirlerken gruplandırılamayan grubunda AFEC suşu bulamamışlardır. Bu çalışmanın sonucunda bulunan APEC ve AFEC, F ve E yoğunluğu ile Logue ve ark. [7]'nın çalışmasından elde ettikleri sonuçlara benzerlik gösterirken, herhangi bir filogruba dahil olmayan (gruplandırılamayan) suş sayısı daha yüksek oranda (APEC %24,66, AFEC %34,00) bulundu. Ayrıca APEC suşları içinde F grubu (% 3,33) daha düşük ve AFEC suşları içinde E grubu (%18,00) daha yüksek oranda bulundu. Bu farklılıkların, bölgesel suşlara ait genotipik farklılıklardan dolayı olduğu düşünüldü. Bu durum aşı uygulamalarında bölgesel suş seçiminin önemini bir kez daha ortaya koymuştur. Ayrıca bu çalışmada AFEC suşlarının filogruplandırılması sonucunda ekstraintestinal patojen suşları içeren B_2 grubu %10,66 oranında bulundu. Gerek bu çalışmada elde edilen sonuçlar, gerekse Logue ve ark. [7]'nın yaptıkları çalışmada AFEC suşları arasında dikkate değer oranda ekstraintestinal *E. coli* suşunun varlığı gösterilerek elde edilen sonuçların diğer çalışmalar ile uyumlu olduğu tespit edildi.

Türkiye dışındaki ülkelerde yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlar tavuklarda *E. coli* enfeksiyonlarının önlenmesi için yapılacak olan koruma ve kontrol programlarının geliştirilmesi ve bu amaçla en çok kullanılan biyolojik korunma faktörü olan aşı için bölgesel farklılıkların önemli olduğu ve aşı geliştirilmesinde mutlaka yersel suşların kullanılarak bu suşlara ait özelliklerin de belirlenmesinin gerektiği anlaşıldı.

Escherichia coli enfeksiyonları, dünyanın her yerinde ve özellikle de kanatlı yetiştiriciliğinde, önlenemeyen bir enfeksiyondur. Kümes dezenfeksiyonu ve biyogüvenlik kurallarına uyulması, hem kanatlı sağlığının korunması hem de gıda zinciri yoluyla insanlara bulaşmasının engellenmesi bakımından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, AFEC suşları arasında patojen ekstraintestinal suşların yüksek oranda bulunduğunu gösterdi. Bu sonuç APEC suşlarının kökeninin kümes materyali olabileceği veya dışkıyla çıkartılan APEC suşlarının çevrede bulunarak diğer hayvanlara bulaşmada önemli olabileceğini gösterdi. Çalışmamızda izole edilen APEC ve AFEC suşlarından herhangi bir gruba dahil olmayan suşların yüksek oranda belirlenmesi, farklı *E. coli* genotiplerinin bulunabileceğini ve daha detaylı genotipik analizler yapılarak yeni filogrupların araştırılması gerektiğini göstermiştir.

Kaynaklar

1. Clermont O, Stephane B, Edouard B, (2000). *Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group*. Applied Environ Microbiol. 4555-4558.

2. Clermont O, Julia KC, Erick D, David MG, (2013). *The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups.* Environ Microbiol Rep. 5(1), 58-65.

3. Fernanda MC, Diniz SA, Silva MX, Jamili MSM, Barbosa SM, Lage AP, Heinemann MB, (2015). *Phylogenetic Group Determination of Escherichia coli Isolated from Animals Samples*. Sci World J. 4 pages http://dx.doi.org/10.1155/2015/258424.

4. Gyles CL, Fairbrother JM, (2010). *Escherichia coli*. Carlton LG, John FP, Glenn S, Charles OT. eds. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, Fourth edition. Blackwell Publishing, Hoboken, New Jersey, ABD. p. 267 – 307.

5. Johnson JR, Stell AL, (2000). *Extended virulence genotypes of Escherichia coli strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise*. J Infect Dis. 181, 261-272.

6. Köhler CD, Dobrindt U, (2011). *What defines extraintestinal pathogenic Escherichia coli?* Int J Med Microbiol. 301, 642-647.

7. Logue CM, Wannemuehler Y, Nicholson BA, Doetkott C, Barbieri NL, Nolan LK, (2017). *Comparative Analysis of Phylogenetic Assignment of Human and Avian ExPEC and Fecal Commensal Escherichia coli Using the (Previous and Revised) Clermont Phylogenetic Typing Methods and its Impact on Avian Pathogenic Escherichia coli (APEC) Classification*. Front Microbiol. 8, 283.

8. Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, Elion J, Denamur E, (1999). *The link between phylogeny and virulence in Escherichia coli extra-intestinal infection*. Infect Immun. 67, 546–553.

9. Ramadan H, Awad A, Ateya A, (2016). *Detection of phenotypes, virulence genes and phylotypes of avian pathogenic and human diarrheagenic Escherichia coli in Egypt*. J Infect Dev Ctries. 10(6), 584-591.

10. Rasidbegovic E, Kavazovic A, (2008). *Gljivične i bakterijske bolesti ptica*. Veterinarski fakultet, Sarajevo univerzitet, Bosna i Hercegovina. p: 73-86.

11. Whittam TS, Ochman H, Selander RK, (1983). Geographic components of linkage disequilibrium in naturalpopulations of *Escherichia coli*. Mol Biol Evol, 1, 67–83.

Etlik Vet Mikrobiyol Derg, 2018; **29 (1):** 63-70 **Derleme** / Review Article

Liyofilizasyon: Genel Proses Değerlendirmesi

Mustafa Sencer Karagül[1], Buket Altuntaş[1]

Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Brusella Referans ve Aşı Üretim Laboratuvarı[1]

Geliş Tarihi / Received: 19.04.2018, **Kabul Tarihi** / Accepted: 17.05.2018

Özet: Liyofilizasyon veya bir diğer adıyla dondurarak kurutma, final ürün özelliklerini, stabiliteyi ve verimi etkileyen kompleks bir proses olarak kabul edilmektedir. Liyofilizasyon, zorluklarına rağmen sunduğu avantajlar nedeniyle zoonoz hastalıkların da yer aldığı birçok hastalığa karşı uygulanan aşıların üretim zincirinde yer almaktadır. Aşılar diğer biyolojik maddeler veya mikroorganizmalar liyofilizasyon dışında, soğutma veya dondurma ile stabil hale getirilebilirler. Fakat ürünlerin donmuş fazda taşınması ve depolanmasının yüksek maliyeti yanında olası sistemsel arızalar ürünün yapısını bozarak kaybına neden olabilmektedir. Bu açıdan liyofilize formulasyonlar daha iyi stabilite avantajı ile birlikte, taşıma ve depolama sırasında da kolay idare sağlamaktadırlar. Bu derlemede, liyofilizasyon metodunun genel proses değerlendirilmesi yapılarak, prosesi oluşturan, dondurma, birincil kurutma ve ikincil kurutma basamakları arasındaki etkileşim açıklanmıştır. Canlı aşıların üretiminde önemli bir proses olan liyofilizasyon, prosesi uygulayan araştırmacıların gözünden değerlendirilmiş, üretim ve liyofilizasyon faaliyetlerinde bulunan çalışanlara yönlendirici ve destekleyici bilgiler paylaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: Dondurma, Dondurarak-Kurutma, Liyofilizasyon, Stabilite,

Liyophilization: A General Process Evaulation

Abstract: Lyophilization, in other words, freeze drying is considered to be a complex process having an influence on the productivity, stability and the characteristics of the final product. Despite its difficulties, lyophilization is involved in the production chain of vaccines against some diseases, including zoonotic diseases, thanks to its advantages. Vaccines, other biological substances or microorganisms can be stabilized through cooling or freezing as well as lyophilization. However, transporting and storing the products in the frozen phase is rather expensive and some possible systematic problems might disrupt the product. For this reason, lyophilized formulations have the advantage of more stability; in addition, they are more manageable during transporting and storing. This review study evaluates the general process of lyophilization and reveals the interaction between the steps of freezing, primary drying and secondary drying, which constitute the process. Lyophilization, which is an important process for the production of live vaccines, has been evaluated from the perspective of the researchers who actually carry out the process and some guiding and helpful information for the ones that are involved in production and lyophilization activities has been included.

Key words: Freezing, Freeze drying, Lyophilization, Stability.

Giriş

Liyofilizasyon en basit haliyle, maddenin önce dondurulduğu ve sonrasında sublimasyon ve akabinde desorpsiyon ile solvent miktarının, biyolojik veya kimyasal reaksiyonları desteklemeyecek değerlere kadar azaltıldığı bir stabilizasyon prosesi olarak tanımlanmaktadır [7,10,13]. Kriyopreservasyon (dondurarak saklama) ve dondurarak kurutma, maddelerin uzun dönem depolamasının sağlanmasında tercih edilen teknikler olarak kabul edilmekte ve artan bir şekilde biyolojik materyallerin geniş bir aralığında uygulanmaktadır [15]. Dondurarak kurutma olarak bilinen liyofilizasyon; kuru, aktif, uzun raf ömrüne sahip ve kolayca çözülebilen bir ürün elde etmek için dondurma ve kurutma işlemlerinin faydalarını kombine eden bir proses olarak tanımlanmaktadır [1]. Hali hazırda pazarlanan biyofarmasötik ürünlerin %50'sinin liyofilize formda olduğu aktarılmaktadır ki, bu haliyle en yaygın formulasyon stratejisini temsil etmektedir [10,16,17]. Uygulamanın temeli farklı metodolojiler için ortak olmasına rağmen, birçok laboratuvarın doğru preservasyon ve saklama prosedürlerinde uzmanlık bilgisi yetersiz kalmaktadır. Aynı zamanda buna bağlı numune ve kültürlerin saklanmasında uygun ve güncel olmayan protokoller uyguladığı ifade edilmektedir [15]. Bu nedenle prosesi oluşturan basamakların değerlendirilerek iyi anlaşılması elzemdir.

Yazışma adresi / Correspondence: *Mustafa Sencer Karagül (ORCID: 0000-0001-7215-5229), Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Brusella Referans ve Aşı Üretim Laboratuvarı, İstanbul E-posta: msencerk@hotmail.com*

Liyofilizasyon

Liyofilizasyon, Yunanca 'çözücü seven-sıvı çeken' liyofil' teriminden türetilmiştir ve kuru bir ürünün yüksek seviyede tekrar rehidre olabilme yeteneğini ifade etmektedir [10,13,26]. Operasyonel olarak dondurarak kurutma, vakum desikasyonu aracılığıyla dayanıksız ürünlerin rehidre olmasının kontrol edilebilir bir metodu olarak açıklanabilir [1,15]. Liyofilizasyon, her bir basamağın kritik olduğu çok aşamalı bir operasyon olarak ifade edilmektedir. Bu proseste başarılı olabilmek için ana bileşenler iyi anlaşılmalı ve sıkı kontrol altında tutulmalıdır [26].

Biyolojik materyallerin stabil bir halde preservasyonu, biyolojik-medikal bilim, tarım ve biyoteknoloji için temel bir gereksinimdir [15]. Liyofilizasyon, farmasötik ve biyoteknoloji endüstrilerinde formulasyonların stabilitesini geliştirmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır [10,32]. Ayrıca, dayanıksız ilaçların özellikle terapötik proteinlerin uzun dönem stabilitelerini geliştiren önemli ve iyi bilinen bir prosestir [10,16,31]. Liyofilizasyon prosesi sonrasında kurumuş ve poröz yapıdaki ürün, karakteristik liyofil özelliği ile çözücüyü hızlıca absorbe ederek, proses öncesindeki orjinal yapısal formuna tekrar dönüşebilir [13]. Proses sonucu oluşan poröz yapıdaki ürün kekinin nem içeriği düşüktür ve belirlenmiş saklama koşullarında istenilen kullanımına kadar çok uzun süre depolanabilir [32].

Yaşam için vazgeçilmez olan su, hücre içindeki biyokimyasal aktiviteleri destekleyen yaygın bir solvent (çözücü) olarak metabolizmanın devamını ve bütün yaşamsal faaliyetleri destekler [15]. Dondurarak kurutmaya tabi tutulan ürünler de, öncelikli olarak sudan yani solventten ve suyun içinde çözünen veya süspanse olan diğer materyallerden teşekküllerdir [1,3,10,17]. Su yokluğunda, canlı hücrelerde uyku hali veya ölüm fazının sonuçlanması ve hücresel ekstraktlarda biyokimyasal aktivitelerin inhibisyonu nedeniyle bildiğimiz yaşam devam edememektedir. Bu açıdan başarılı sonuçlar için sublimasyon ve desorpsiyon aşamalarında takip edilmesi gereken olay, liyofilizasyon prosesine maruz kalan ürüne ait bileşenlerden olan suyun uzaklaşmasıdır. Bu nedenle dayanıksız ürünleri stabilize etmek için depolanmış örneklerdeki su içeriğinin azaltılması veya immobilize edilmesi gereklidir. [1,15]

Liyofilizasyon prosesinde anahtar kelime, liyofilizasyon prosesinin bir stabilizasyon prosesi olarak kabul edilmesidir [13]. Stabilizasyon prosesi ise, bir maddenin doğal kinetik saatinin fazlasıyla değiştirilmesini içerir. Örneğin, bir aşının 2 gün +4 derecede depolanması neticesinde etkinliğinin %90'a gerilediğini varsayalım. Eğer aşı içindeki nem miktarını düşürerek, kinetik saati yavaşlatılabilir ve 1 saniye zamanın etkisi 1 saate uzatılabilirse bu durumda aşının stabilitesi 2 gün yerine 20 yıla kadar çıkabilir [13]. Buradaki çarpıcı örnek, aslında liyofilizasyon prosesinin uygun şekilde yürütüldüğünde araştırmacılara ve üreticilere sunabileceği göz ardı edilemez fayda potansiyeline ışık tutmaktadır.

Tarihçe

Liyofilizasyon metodunun geçmişi, tarih öncesi zamanlara dayanmaktadır. Astek ve Eskimoların bu metodu gıda maddelerinin saklanmasında kullandıkları paylaşılmıştır [1,15]. Aynı zamanda yine yüzyıllar önce aynı işlemin İnkalar tarafından And Dağları'nda Altiplano düzlüklerinin oksijeni az atmosfer ortamında ve güneşin radyan ısısı altında et kurutmak için kullanıldığı aktarılmıştır [26].

1880'lerin sonlarına doğru, proses laboratuvar ölçeğinde kullanılmış ve temel prensipleri anlaşılmıştır [1,15]. 1890 yılında yaklaşık olarak -20°C sıcaklıkta ve subatmosferik basınç altında, dokuların kurutulabildiği bildirilmiştir. 1905 yılında ise araştırmacılar kimyasal bir pompa aracılığıyla 1 ATM daha düşük bir basınç altında hayvan dokularının kurutulabildiğini paylaşmıştır [13]. Pratik olarak liyofilizasyon metodu, ısıya duyarlı antibiyotik ve kan ürünlerinin işlenmesine ihtiyaç duyulduğu 1930'lara kadar bir laboratuvar tekniği olarak kalmıştır [1,15].

Kullanım alanları

Liyofilizasyon termolabil (ısıya duyarlı) biyolojik materyallerin korunması için önemli bir prosestir. Günümüzde çeşitli endüstrilerde geniş kullanım alanına sahiptir [24]. Mikrobiyal kültür gibi canlı materyallerin stabilizasyonu, müzede sergilenen hayvan örneklerinin preservasyonu (taksidermi), çiçeklerin kurutulması ve reaksiyon ürünlerin kon-

santrasyonu veya geri kazanımı gibi prosesler için farklı alanlarda kullanılmaktadır [10,17]. Liyofilizasyon, yangın veya sel sonucu hasara uğramış değerli el yazması kitap ve belgelerin kurtarılmasında da araç olmuştur. Bu tür uygulamalara sıklıkla ihtiyaç duyulmamakla birlikte, bu teknolojinin sonraki nesillere faydalı olabilecek uygulamalar olduğu gerçeği, aslında bu teknoloji tarafından sağlanan ödüllendirici bir mirastır [24].

Liyofilizasyon işleminin en yaygın kullanım alanlarından biri sağlık hizmetleri endüstrisidir. Bu alan, kimyasal bileşikler, parenteral formülasyonlar, aşılar ve ayrıca teşhis ürünlerindeki farmasötiklerin liyofilizasyonunu içerir. Liyofilizasyon, biyo-endüstri sektöründe, standart bir işleme tekniği haline gelerek üretilen yüksek kaliteli ve yüksek maliyetli ürünlerde (monokloanal antikor, antijen, DNA) stabilite sağlamaktadır [5]. Kültür koleksiyonlarında ve endüstri alanında kültür kurutma işlemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunların dışında uzun süre depolanması için, sperm, eritrosit, plazma, ve serumun yanı sıra organ naklinde kullanılmak üzere bazı dokuların liyofilizasyon yöntemiyle saklanabildiği aktarılmıştır [11].

Liyofilizasyonun diğer bir yaygın kullanımı veteriner hekimlik ürünleridir. Bu ürünler bireysel evcil hayvanlar için yapılan aşılardan ruminant veya kanatlı aşıları gibi büyük ölçekli uygulamalara kadar çeşitlilik gösterir [28]. Gıdalar söz konusu olduğunda ise en yaygın olarak bilinen dondurarak kurutulmuş gıda ürünü kahvedir [13]. Ayrıca proses, astronot gıdası olan dondurarak kurutulmuş dondurma formu ile de popülerleşmiştir [10]. Çay, meyve ve sebzeler, et ürünleri, hazır yiyecekler ve bazı aromatik otlar dondurularak kurutma işleminin uygulandığı gıda ürünleri olarak karşımıza çıkmaktadır [5,6,24,25].

Çok çeşitli alanda liyofilizasyon işlemi başarılı bir şekilde uygulanabilir olmasına rağmen liyofilize edildikten sonra rekonstitüye edilen canlı organizmaların tekrar büyüme ve çoğalma kabiliyetini sürdürebilmeleri gerekmektedir. Bu nedenle hücre gibi bir canlı sistemin uzun vadeli korunması için başarılı bir uygulama sağlanması zaruriyeti bu alanda çalışan bilim insanları için en büyük zorluklardan biridir [7].

Liyofilizasyon Basamakları

Dondurma

Geleneksel bir liyofilizasyon siklusu 3 aşamadan oluşur: dondurma, birincil kurutma ve ikincil kurutma [22,23]. Bir formulasyonun başarılı şekilde liyofilize edilebilmesi için birincil kurutmaya başlamadan öncesi dondurulması gerekliliği söz konusudur [13]. Zira dondurarak kurutma, katı fazdan gaz faza doğru bir hal değişimi olduğu için, liyofilize edilecek olan materyalin önce dondurulması gerekir [10]. Dondurma, kavram olarak basit gibi görünse de, liyofilizasyon prosesinde büyük olasılıkla en kompleks ve ayrıca en önemli basamaktır [13,16]. Bununla birlikte ürün kalitesi ve prosesi optimize etmek adına dondurma basamağının kontrolü son derece önemlidir [16]. Zira dondurma aşamasında şekillen mikroyapılar final ürün kalitesini, birincil ve ikincil kurutma hızını ve oranını belirlemektedir [7].

Kurutma işlemi sıklıkla günlere ihtiyaç duyarken, dondurma işlemi genellikle birkaç saat içinde sonlanır [8,31]. Dondurma prosesinin temel prensibi, solut (çözünen) kısımdan solventin (çözücü) ayrılmasıdır. Aköz sistemler için, bu durum suyun buz kristalleri oluşturması ve çözünen maddenin söz konusu buz kristalleri arasındaki intersitisyel bölgede sınırlandırılması şeklindedir [13]. Dondurma aşaması boyunca, likit formulasyon, buz gelişiminin takip ettiği buz nükleasyonu başlayana kadar soğutulur. Bu durum, suyun büyük kısmının, camsı ve/veya kristalin yapıdaki çözünen matriksinden buz kristalleri içinde seperasyonu ile sonuçlanır [8]. Ayrıca, buz nükleasyon kinetiği ve buz kristali gelişimi, donmuş ürün kekinin morfolojisini ve fiziksel şartını, akabinde sonuç olarak kurumuş ürünün nihai özelliklerini belirlemektedir. Buz morfolojisi de, birinci ve ikinci kurutmadaki sublimasyonu oranı ile direkt olarak ilişkilidir [9].

Dondurmadaki amaç, formulasyonun sıcaklığını düşürerek, solut ve solventin ayrıldığı bir matriks elde etmektir. Bu sayede, matriksin intersitisyel bölgesindeki su mobilitesini sınırlandırmak ve sıfıra yaklaştırmak amaçlanarak kurutma prosesi boyunca su buhar akışına minimal direnç gösterecek bir matriks yapısının elde edilmesi hedeflenmektedir [13]. Ayrıca solventin çözünen kısımdan ayrılması ile

üründe termal degradasyon minimize edilebilmekte ve vakum uygulandığında ürünün köpürmesi engellenebilmektedir [7,31].

Dondurma aşamasının kendisi aslında liyofilizasyondaki temel dehidrasyon basamağını oluşturur [16]. Solvent vazifesindeki su, likit formulasyondan, saf katı buz formunda uzaklaşır. Bu uzaklaşma, solut maddenin konsantrasyonunda çarpıcı değişikliklere öncülük eder [3,9]. Söz konusu buz kristallerinin oluşumu ile solut bileşenlerinin konsantrasyonu, gelişen buz kristalleri arasında artar ki bu durum kriyo-konsantrasyon olarak bahsedilir [8,16]. Söz konusu konsantre materyalleri içeren alanlar, suya göre daha düşük donma noktasına sahiptirler. Zira bir ürün, buz varlığı nedeniyle donmuş gibi gözükmesine rağmen, suspansiyondaki tüm solut donmadan aslında tamamen donmuş değildir [3,10].

Ürünün elektriksel direnci, sıvı fazdan katı faza geçtiğinden dramatik seviyede hemen hemen her zaman yükselir. Bunun nedeni iyon ve elektron mobilitesinin azalmasıdır. Bu durum, aynı noktada elektriksel direnç ve ürün sıcaklığı ölçülürse donma noktasının tespit edilebileceğini göstermektedir. Çünkü genellikle dirençte ani bir yükseliş söz konusu olur ki direnç ve sıcaklık eğrilerinin kesişme noktası yüksek doğrulukla donma noktası olarak kabul edilebilir [17].

Solusyonun donma denge noktasının altında sıvı fazda tutulması derin soğutma (supercooling) olarak belirtilir. Genel olarak dondurma, derin soğutulmuş sudan buz kristalizasyonunu tanımlamaktadır [16]. Derin soğutma her zaman donma esnasında ve sıklıkla donma sıcaklığının 10-15 Cº altında veya daha fazla bir aralıkta meydana gelir. [30]. Ciddi nükleasyon hacmine ulaşıldığında, buz kristalizasyonu bütün sistemde birden gerçekleşir [2,16]. Kristalizasyon başladığında, ürün sıcaklığı hızlıca denge donma noktasına yükselir [16,30]. Söz konusu Nükleasyon homojen ve heterojen olarak şekillenebilir [9,13,16].Tüm farmasötik solusyonlarda ve steril filtre edilmiş enjenksiyonluk suda, nükleasyon heterojen nükleasyon olarak gözlemlenir [9,16].

Özetle, soğutma ile sıcaklığı donma noktasına düşürülen formulasyon, derin soğutma ile daha düşük sıcaklıklarda katı forma geçmeden soğutulmaya devam edilir, başlayan buz nükleasyonunu, buz kristallerinin gelişimi ve ürünün tamamına yayılması takip eder. Kristallerin gelişimi ile donma noktasının 10-15 derece altındaki formulasyon ısınarak tekrar donma noktasına yaklaşabilir.

Oluşan buz çekirdekcik sayısı, buz gelişiminin oranı ve buz kristallerinin büyüklüğü derin soğutma derecesine bağlıdır [13,21,29]. Daha yüksek derin soğutma derecesi, daha yüksek nükleasyon oranı ve daha hızlı dondurma etki oranını oluşturmaktadır. Bu durum çok sayıda küçük buz kristal oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Buna karşın, daha düşük derin soğutma derecesi, daha az sayıda fakat büyük buz kristal oluşumuna neden olmaktadır [3,16,29]. Derin soğutmayı düşürerek oluşturulan büyük buz kristalleri ile yüzey alanını minimize etmek istenilen bir diğer strateji olarak belirtilmiştir. [14,31].

Biyolojik standartların kurutulmasında, dondurma prosesi ayrıca önemlidir. Önceden soğutulmuş raflara ürünlerin konulması ile yapılan snap-ani dondurma, heterojenik kristal formasyonu ve final ürün görünümü ile sonuçlanabilmektedir [18,31]. Bununla birlikte eğer biyolojik bir üründe dondurma nedenli bir hasara meyil var ise bu durumda -50 derecede önceden soğutulmuş raflara ürünlerin yüklenmesi şeklinde olan hızlı dondurmaya alternatif yoktur. Tarihsel olarak sıvı nitrojen içinde ani dondurma mevcut üretim hacimlerinde ne güvenli ne de pratiktir ki sıklıkla yüksek oranda ampullerin kırılması ve kristalizasyon problemleri ile sonuçlanmaktadır. Adjuvant süspansiyonlar veya hücresel komponent içeren materyaller de ayrıca donmuş fazı tamamlamak için geçen zamanı ve sedimentasyon olasılığını minimize etmek için önceden soğutulmuş raflara yüklenirler. Hücresel ve viral yapıların hızlı dondurulması, daha küçük kristal oluşumu ile muhtemel kayıpların asgariye indirebilmektedir [18].

Küçük buz kristal oluşumu, özelikle canlı aşıların kurutulmasında tercih edilebilir bir yol olarak düşünülebilir. Hızlı soğutma ile küçük buz kristalleri elde edilebilir fakat büyük buz kristallerin şekillendiği yavaş kurutmaya kıyasla daha uzun kurutma süresi ihtiyacı doğar [3,7,29]. Çünkü hızlı soğutmanın aksine yavaş soğutma ile kurutma prosesi boyunca ürün matriksi içinde buhar çıkışını daha az kısıtlayan kanallar oluşur. [10]. Lakin büyük buz kristallerin, aşı ürünü içeriğindeki canlı organizmalara vereceği zarar, liyofilizasyon kaybını yükselterek ürün kalitesini ve stabilitesini olumsuz

yönde etkileyebilecektir. Bu nedenle hızlı soğutma ile mikroskobik yapıların korunması açısından sağlanan fayda unutulmamalıdır [17,10]. Ayrıca dondurma, dolum hacmi ile de ilişkilidir. Zira, daha büyük dolum hacmini barındıran viallerin donması için daha uzun süre gerekir [29,31].

Biyolojik canlı ürünlerin liyofilizasyonunda, buz kristallerinin küçük olduğu, ani dondurma olarak anılan hızlı dondurma yönteminin tercih edilmesi prosesin daha başarılı sonuçlanmasına destek verebilecektir. Genel olarak 0.5 Cº/dk bir sıcaklık düşüşü yavaş dondurmayı, 1 Cº/dk'lık oran ise orta hızda dondurmayı tanımlamaktadır [7,31]. Dondurma prosesinin, reçeteye dökülmesinde ürüne ait kritik sıcaklıkları temsil eden Teu (ötektik sıcaklık), Tc (kollaps sıcaklığı) ve Tg (cam geçiş sıcaklığı)'nin göz önünde bulundurulması çok önemlidir [7,31]. Dondurma aşaması, uygun soğutma hızı, uygun derin soğutma sıcaklığı ve yeterli donma süresi gibi anahtar parametreler takip edilirse başarılı sonuçlar sağlayabilir.

Birincil Kurutma

Birincil kurutma basamağı, prosesi oluşturan 3 basamak arasında en uzun süren basamaktır [10,22]. Bu basamakta, cihaz haznesi içindeki basınç düşürülür ve dondurma basamağında oluşan buz kristallerinin sublimasyonunu başlatmak adına ısı uygulanır [7,22]. Cihaz haznesi içindeki basınç vakum pompası aracılığıyla düşürülür [17,10]. Vakum uygulaması, donmuş kütleden su buharının serbest göçüne izin verir. Sublimasyon devam ederken, donmuş kütle, kek tipi bir yapıya dönüşür [7]. Söz konusu sublimasyon, donmuş sıvının, sıvı faza dönüşmeden direkt olarak gaz aşamasına geçişi olarak açıklanabilir [3,10,17]. Birincil kurutma sonrası ikincil kurutmada sıcaklığın yükseltilmesiyle, eğer donmuş kısım üründen uzaklaştırılmamışsa bu durum erime ile sonuçlanabilir. Bu yüzden birincil kurutmanın sona ereceği noktanın belirlenmesi çok önemlidir [10,17].

Birincil kurutmanın temel ideolojilerinden biri, ilk olarak optimum ürün hedef sıcaklığı belirlemek (Tp), akabinde ürünü hızlıca Tp değerine getirmek ve nihayetinde bu sıcaklık değerinde ürünü birincil kurutma boyunca bekletmektir [7,31]. Bu nedenle birincil kurutma boyunca sıcaklığın kritik proses sıcaklık değerlerinin altında olmak kaydıyla olabildiğince yüksek tutulması gereği tavsiye edilmektedir. Söz konusu kritik proses sıcaklıkları amorf ürünler için Tc veya Tg ve kristalin yapılar için Teu erime noktasıdır [10,17]. Birincil kurutma boyunca ürün sıcaklıkları genel olarak -35 ile -20 Cº arasında bulunabilmektedir. Ürün matriksi içindeki bağlı su, birincil kurutmadaki basınç değerleri kullanılarak fakat sıcaklık daha da fazla yükseltilerek uzaklaştırılır [19].

Tüm formulasyonların, proses defektlerini önlemek adına, komple bir solidifikasyon için daha düşük sıcaklıkta soğutulduğu ve birincil kurutma boyunca aynı düşük sıcaklığın sürdürüldüğü bir kritik sıcaklığı bulunmaktadır. Tc sıcaklığı, materyalin yumuşayarak yapısını destekleyemediği noktadaki sıcaklık değeridir. Teu, solüt materyalin eridiği ve solvent uzaklaştıktan sonra herhangi bir yapının oluşmasının engellendiği sıcaklık değeridir. Tg ise donmuş materyalin kırılgan yapıdan esnek bir yapıya dönüştüğü sıcaklık değeridir [27].

Kabul edilir görünümde kurumuş ürün elde etmek için ürün sıcaklığı her zaman, Tc' den birkaç derece düşük olmalıdır. Ürün sıcaklığı ile kollaps sıcaklığı arasındaki fark, sıcaklığın güvenlik marjini olarak tanımlanır. Daha yüksek ürün sıcaklığı daha hızlı bir proses sağlayabilir zira ürün sıcaklığındaki her 1 Cº artış birincil kurutma süresinde yaklaşık %13' lük süre düşüşü sağladığı belirtilmiştir [10,12,31]. Bu açıdan çok düşük ürün sıcaklıkları ve bununla ilişkili düşük buz buharı basınç değerleri çok uzun süren birincil kurutmalar ile sonuçlanır [10]. Ürün sıcaklığı Tc değerine çok yakın olursa kollaps riski de yüksek olur [7,31]. Zira ürün sıcaklığındaki, kritik formulasyon sıcaklığının üzerinde bir artış çoğunlukla ürün kek yapısının kaybı ile sonuçlanır [10]. Bu açıdan, kristalize edice ajanların veya yüksek Tg değerine sahip desktran veya siklodekstrin gibi amorf yapıda katkıların ilavesi ile söz konusu kritik sıcaklıkların yükseltilmesi mümkün olabilir [4,10,17,].

Birincil kurutma boyunca kontrol edilebilir sadece iki tane proses parametresi bulunmaktadır: çember basıncı ve raf sıcaklığı [3,7,22,25]. Çember basıncı, ürün sıcaklığındaki buzun buhar basıncından aşağıda olmalıdır. Bu sayede sublimasyon ile buz, üründen kondensere transfer olur ve kondenser plakalarında kristalize olabilir [7,10]. Liyofilizasyon haznesinde çok yüksek basınç olması, subli-

masyon ara yüzeyi ile hazne arasındaki basınç gradiyentini düşürerek ve buna bağlı sublimasyonun devamı sağlayan itici gücü azaltarak sublimasyon oranını azaltabilir. Eğer hazne basıncı, sublimasyon ara yüzeyindeki buzun buhar basıncını geçerse, kütle transferi gerçekleşemez [10,17,]. En düşük çember basıncı değeri en hızlı buz sublimasyonunu sağlayabilir fakat çok düşük çember basıncı değerleri ürünün, tıpanın uçucu komponentleri ve vakum pompası yağı ile kontaminasyonuna neden olabilir. Ayrıca, bu durum, vialler arasında ısı transferi bakımından daha büyük heterojeniteler oluşturabilir. Pratikteki çoğu uygulamada, çember basıncı 50-200 mTorr arasında değişmektedir [31].

Birincil kurutma basamağı için diğer önemli proses parametresi raf sıcaklığıdır. Kurutma boyunca hedef ürün sıcaklığını koruyacak uygun raf sıcaklığını seçimi çok önemlidir. Birincil kurutma boyunca raf sıcaklığı sublimasyona izin verecek optimumda olmalıdır. Eğer çok düşük olursa, Tp değerindeki buzun buhar basıncı ile çember basıncı arasındaki minimum fark dolayısıyla yeterli sublimasyonu oluşmayacaktır. Fakat çok yüksek olursa da kondenser sublime su buharını idare edemeyecektir [7,31]. Üründen suyun sublimasyonu için bir enerji gerekmektedir ki bu durum üründe soğumaya öncülük eder. Sublimasyonun devamı için ihtiyaç duyulan enerjinin, rafların belirlenmiş yüksek bir sıcaklığa ısıtılmasıyla sağlanması gerekmektedir [10,17].

İkincil Kurutma

Çok bileşenli aköz bir çözelti, buz sublimasyon sınırına kadar dondurularak kurutulduğunda, donmamış rezidüel suyun geride kalan katı çözeltiden difuzyon, dezorpsiyon ve evoparosyon ile uzaklaştırdığı proses ikinci kurutma olarak tanımlanmaktadır [9]. İkincil kurutma, solut fazdan donmamış suyun büyük kısmını dezorpsiyon ile uzaklaştırılması için yükseltilmiş sıcaklıklarda gerçekleştirilir [10,23]. Birincil kurutmanın temel amacı, çözücünün, matristen süblimasyon yoluyla uzaklaştırılması olmakla birlikte, ikincil kurutmanın temel amacı, ürünün nem içeriğini biyolojik aktivitelerin veya kimyasal reaksiyonların gerçekleşemeyeceği seviyelere düşürmektir. Liyofilizasyon işleminin bu aşaması aktif bileşenin kinetik saatini yavaşlatmak için bir araç olarak işlev görür. Kinetik saatin yavaşlaması, liyofilize edilmiş bir ürünün uzun süreli stabilitesini oluşturur. Böylece 4-8 C° ‘de kısa süre saklanabilen bir aşı, aynı ortam sıcaklığında aylarca veya yıllarca etkinliğini koruyarak muhafaza edilebilir [13]. Birincil kurutma tamamlandıktan sonra kek içeriğinde bulunan su molekülü miktarı, hedeflenen ürün stabilitesinin sağlanması için genellikle çok yüksek değerde olmaktadır [31]. Bu nedenle, nem içeriğinin kabul edilebilir değerlere düşürülmesi, ikincil kurutma işleminin başlıca işlevidir [13]. Tüm donmuş su molekülleri süblimleştikten sonra ortamda yalnızca bağlı su kalır. Bağlı su katı matriksin içine hapsolmuştur ve uzaklaştırılması uzun sürebilir [20]. Bağlı su üründen absorbe edildiğinden bu işlem “İzotermal Desorpsiyon” olarak adlandırılır. Düşük raf sıcaklığı ve orta seviyede vakumun kullanıldığı birincil kurutma işleminin aksine, ikincil kurutma raf sıcaklığı yükseltilerek ve hazne basıncı minimuma indirilerek gerçekleştirilir. Fakat raf sıcaklığının yükseltilmesi adım adım yapılmalıdır, çünkü ikincil kuruma sırasında yüksek proses sıcaklığının kullanılması protein polimerizasyonu veya biyodegradasyona neden olabilir [10]. Ayrıca kollapsa uğramış ürün daha düşük bir yüzey alanına sahiptir ve buna bağlı olarak daha yavaş bir ikincil kurutma oluşur ki bu durum yüksek rezidüel su ve rekonstitusyon zamanında artış ile sonuçlanır [23].

İkincil kurutma esnasında numunenin çökmesi genellikle birincil kurutmada çökme olasılığından daha az olmasına rağmen, numunenin o fazdaki Tg noktasının üstündeki sıcaklığa maruz bırakılmasıyla kurutulan matriste kollapslar olabilir [15]. Bu yüzden, İkincil kurutma için raf sıcaklığı yavaşça artırılmalıdır, çünkü hızlı bir sıcaklık artışı, ikincil kurutma sırasında amorf yapıdaki üründeki yüksek rezidüel nem içeriğinden dolayı kollaps oluşmasına neden olabilir bu nedenle düşük Tg ikincil kurutma esnasında üründe kollaps oluşturma potansiyeline sahiptir [30]. Kristal ürünler, ikincil kurutma sırasında çökme potansiyeli göstermediğinden, bu ürünler için hızlı bir sıcaklık artışı önerilebilir [31]. Desorpsiyon hızı hazne basınç değeri 200 m Torr’dan (100-150 mTorr) düşük olana kadar bağlı değildir, ancak desorpsiyon hızı ürün sıcaklığına (Tp) karşı çok hassastır [7]. Ürünler, suyun emilimine izin vermek için belirli bir süre daha yüksek sıcaklıkta tutulmalıdır. Daha uzun bir süre daha düşük sıcaklıkta bir döngü yerine, daha yüksek bir raf

sıcaklığı döngüsünü daha kısa bir zaman periyodu için çalıştırmak daha iyi bir seçenek olarak sunulmaktadır [31]. Belirli bir sıcaklıkta desorpsiyon hızı zamanla azaldığından, belli bir süre sonra nem içeriği seviyesinde az miktarda değişikliklere neden olur [21]. Amorf ürünlerin kurutulması, kristal halinde olan ürünlerden daha zor olduğundan dolayı bağlı suyun uzaklaştırılması için daha yüksek sıcaklıklara ve daha uzun zamanlara ihtiyaç duyulmaktadır [7].

İkincil kuruma koşulları ayrıca çözünen maddenin konsantrasyonuna bağlıdır. Çözünen maddenin konsantrasyonu yüksek olduğunda, kurutulmuş ürünün daha küçük spesifik alana sahip olması ve emilen suyun çıkarılması daha zor hale geldiğinden, ikincil kurutma daha uzun zamanda veya daha yüksek sıcaklıkta gerçekleşir [7,31]. Kurutmanın durumunu ortaya koymak için, birincil kurutmanın sonunda ve ikincil kurutmanın başında kurutucu hazneden numune alıcı bir sistem ile örnekler alınarak rezidüel nem yüzdesi gravimetrik olarak veya Karl Fischer analizi yapılmaktadır [23].

Donmuş ürünün kurutulmasını birçok faktör etkilemektedir. Bu faktörler bağımsız olarak değerlendirilebileceği gibi birbirleri ile etkileşim içinde oldukları dinamik bir sistemi oluşturdukları unutulmamalıdır. Bu nedenle ancak faktörler arasında hassas bir denge kurulmuş kurutma reçeteleri ile uygun ürün elde edilebilir [3]. Başarılı liyofilizasyon prosesleri, üründeki kaybı azaltarak ve stabiliteyi arttırarak aşı üretim faaliyetlerinin verimliğini yükseltebilir. Liyofilizasyon prosesinde hedeflenen başarıya ulaşmak için, birbirleri ile etkileşim içinde olan basamaklar arasında geçişin uyum içinde olması gerekmektedir. Söz konusu gerekliliklerin yerine getirilmesi ancak prosesin anlaşılması ve doğru biçimde uygulanması ile mümkündür.

Kaynakça

1. Adams GDJ, Cook I, Ward KR, (2015). *The Principles of Freeze-Drying*. Wolkers WF, Oldenhof H. eds. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Springer, New York. p. 121-143.
2. Akyurt M, Zaki G, Habeebullah B, (2002). *Freezing phenomena in ice–water systems*. Energy Convers. Manag. 43, 1773–1789.
3. Anonim, (2017). *A guide to freze drying for the laboratory*. An industry service publication. Labconco, Erişim adresi: http://www.thermofishersci.in/lit/Labconco%20-%20A%20laboratory%20guide%20to%20freeze%20drying.pdf. Erişim tarihi: 15.04.2018.
4. Carpenter JF, Pikal MJ,. Chang BS,. Randolph TW, (1997). Rational Desgin of Stable Lyophilized Protein formulatinos: Some Practical Advice. Pharm. Res. 14(8), 969-975.
5. Ciurzyńska A, Lenart A, (2011). *Freeze-Drying – Application in Food Processing and Biotechnology – A Review*. Pol. J. Food Nutr. Sci. 61(3), 165-171.
6. Cook I, (2018). *Why, What and How? Understanding the freeze drying process* Biopharma Technology Ltd. Erişim adresi: http://www.biopharma.co.uk/wp-content/uploads/2010/07/Why_What_How.pdf. Erişim tarihi: 15.04.2018.
7. Deepak B, Iqbal Z, (2015). *Lyophilization - Process and Opitimization for Pharmaceuticals*. IJDRA, 3(1), 30-40.
8. Franks F, (1998). *Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 45, 221–229.
9. Franks F, (2007). Freeze-drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals, Cambridge: RSC Publishing, The Royal Society of Chemistry.
10. Gaidhani KA, Harwalkar M, Bhambere D, Nirgude PS, (2015). Lyophilization / Freeze Drying – A Review. WJPR. 4(8), 516-543.
11. Halkman A, Doğan, HB, (2000). *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*. Genişletilmiş 2. Baskı, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını. Sim Matbaası, Ankara.
12. Horn J, Friess W, (2018). *Detection of Collapse and Crystallization of Saccharide, Protein, and Mannitol Formulations by Optical Fibers in Lyophilization.* Front Chem. doi: 10.3389/fchem.2018.00004.
13. Jennigs TA, (2008). *Lyophilization, introduction and basic principles*. New York: Informa Healthcare.
14. Jiang S, Nail SL, (1998). *Effect of process conditions on recovery of protein activity after freezing and freeze-drying*. Eur J Pharm Biopharm. 45, 249–257.
15. John G. Day, Glyn N. Stacey eds., (2007) *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, Second Edition, New Jersey, Humana Press Inc.
16. 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.
17. Khairnar S, Kini R, Harwalkar M, Salunkhe K, Chaudhari SR, (2013). *A review on freeze drying process of pharmaceuticals*, IJRPS. 4(1), 76 – 94.
18. Matejschuk P, Stanley M, Jefferson P, (2010). *Freeze-Drying of biological standards*. Rey L, May JC. eds. Freze Drying/Lyophilisation of Pharmaceutical and Biological Products. Third edition. Informa Healthcare, London. p.317-353.
19. Meister E, Gieseler H, (2008). *A significant comparison between collapse and glass transition temperatures.* European Pharmaceutical Review. 5. Erişim adresi: https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/1479/a-

significant-comparison-between-collapse-and-glass-transition-temperatures/ . Erişim tarihi: 15.04.2018.

20. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G, (2006). *Preservation of micro-organisms by drying; A review.* J Microbiol Methods. 66(2), 183–193.
21. Oetjen GW, (1999). *Freeze drying*. Germany: Wiley VCH.
22. Patapoff TW, Overcashier DE, (2002). *The importance of freezing on lyophilization cycle development*. Biopharm. 16-21.
23. 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), DOI: 10.1208/s12249-009-9362-7
24. Przic DS, Ruzic NLJ, Petrovic, SD, (2004). *Lyophilization-the process and industrial use*. Chem. Ind. 58(12), 552-562.
25. Ratti C, (2012*). Freeze - drying Process Design*. Jasim A, Mohammad Shafiur R. eds. Handbook of Food Process Design, First Edition. Blackwell Publishing Ltd. New Jersey. p. 621-647.
26. Rey L, (2010). *Glimpses into the realm of freeze-drying classical issues and new ventures*. Rey L, May JC. eds. Freze Drying/Lyophilisation of Pharmaceutical and Biological Products. Third edition, Informa Healthcare, London. p.1-28.
27. Ross C, Gaster T, Ward K, (2008). Biopharma Technology Limited. The importance of critical temperatures in the freeze drying of pharmaceautical products. Erişim adresi:http://www.biopharma.co.uk/wp-content/uploads/2010/07/importance_critical_temps.pdf. Erişim tarihi: 15.04.2018.
28. Roy I, Gupta MN, (2004). *Freeze-drying of proteins: some emerging concerns*. Biotechnol Appl Biochem. 39(2), 165-77.
29. Searless JA, Carpenter JF, Randolph TW, (2001). *The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf.* J. Pharm. Sci, 90(7), 860-871.
30. Searless JA, (2010). *Freezing and anneling phenomena in lyophilization*, Rey L, May JC. eds. Freze Drying/Lyophilisation of Pharmaceutical and Biological Products. Third edition, Informa Healthcare, London p.52-81.
31. Tang XC, Pikal MJ, (2004). *Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: Practical advice.* Pharm. Res. 21(2), 191-200.
32. Tsinontides SC, Rajniak P, Pham D, Hunke WA, Placek J, Reynolds SD, (2008). *Freeze drying—principles and practice for successful scale-up to manufacturing.* Int J Pharm. 280, 1–16.

Etlik Vet Mikrobiyol Derg, 2018; **29 (1):** 71-75 **Derleme** / Review Article

Avcı Bakteriler

Mustafa Önol, Hakan Yardımcı

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 21.02.2018, **Kabul Tarihi** / Accepted: 30.05.2018

Özet: Avcılık canlılığın her ölçeğinde görülebilen bir etkileşim biçimidir. Bakteriyofajların da dahil edilmesi durumunda; mikronlar ile ölçülen canlılardan metreler ile ölçülen hayvanlara kadar uzanan bir avcı skalası oluşur. Ökaryot ve prokaryot canlıların gösterdiği avcılık modelleri arasında yatan temel fark, prokaryot hücrelerin avlarını yutamamasından kaynaklanır. Avcı bakteriler ilk kez 1962 yılında Heinz Stolp tarafından; küçük, yüksek motiliteye sahip, zorunlu avcı, Gram negatif bakteriler olarak tanımlanmıştır. Bu bakteriler, hücreye tutunma ve hücreyi lize etme yeteneğine sahiptir. Doğada yaygın olarak bulunan avcı bakterilerin etki mekanizmaları tam olarak keşfedilememiş ve bu bakterilerin tamamı filogenetik olarak sınıflandırılamamıştır. İn-*vivo* ve *in-vitro* ortamlarda yapılan çalışmalarda avcı bakterilerin geniş bir bakteri skalasına etki gösterdiği bulunmuştur. Bu derlemede avcı bakterilerin filogenetik olarak sınıflandırılması, temel özellikleri ve etki mekanizmaları ile avcı bakteriler kullanılarak yapılan bazı çalışmalar anlatılmıştır.

Anahtar kelimeler: Avcı bakteriler, *Bdellovibrio* ve benzeri organizmalar

Predator Bacteria

Abstract: Predatory is a form of interaction that can be seen at every scale of life. When viruses are considered, there are predators creatures on every scale. The main difference between eukaryotic and prokaryote predators is that prokaryotes are not capable of swallowing. Predator bacteria were first discovered by Heinz Stolp in 1962; small, high motility, obligatory predator, Gram negative bacteria. The very small, very fast mobility of bacteria identified by Heinz Stolp has the ability to attach to cells and lyse cells. The mechanisms of action of the predominantly hunting bacteria in the land have not been fully explored, and not all of these bacteria have been classified phylogenetically. Studies done *in-vivo* and *in-vitro* have shown that predator bacteria act on a large group of bacteria. In this review phylogenetic classification of predator bacteria, basic features, mechanism of action and current studies using predator bacteria are explained.

Key words: Predator bacteria, Bdellovibrio and like organisms

Giriş

Avcı bakteriler ilk kez 1962 yılında Heinz Stolp tarafından; küçük, yüksek motiliteye sahip (yaklaşık olarak saniyede 100 vücut boyu), zorunlu avcı, Gram negatif bakteriler olarak tanımlanmıştır. Bu bakteriler, hücreye tutunma ve hücreyi lize etme yeteneğine sahiptir. Bu özellikleri nedeniyle bu bakteriler morfolojilerine ve yaşam şekillerine uygun olarak *Bdellovibrio bacteriovorus* olarak tanımlanmıştır. "Bdella" kelimesi Yunanca kan emici anlamına gelmektedir. Bu terim ilk kez taksonomist Profesör Robert E. Buchanan tarafından kullanılmıştır. *Bdellovibrio* ve benzeri organizmalar (BALO's) olarak tarif edilen zorunlu avcıların farklı aileler oluşturduğu yakın zamana kadar bilinmediği için BALO'lar δ-proteobakteriler içerisinde tanımlanmakta idi. Yapılan son çalışmalar ise zorunlu avcıların farklı proteobakteriyel sınıflarda bulunabileceğini göstermiştir. Ancak bazı bakteriler farklı ailelerden gelseler bile eylem şekilleri, morfolojileri ve davranış biçimleri olarak BALO'lar ile benzer oldukları için BALO terimi tüm avcı bakterileri kapsayan bir terim halini almıştır (Örneğin *Micavibrio* spp. α–proteobakteriler sınıfına aittir) [7]. Avcı bakteriler taksonomik olarak farklı gruplarda bulunmalarına karşın çok az sayıda avcı bakteri türü bilinmektedir. Bir bakterinin avcı olup olmadığını anlamamızı sağlayacak herhangi bir genetik imza taşımaması, avcı bakterilerin bulunmasını zorlaştırmaktadır [10].

Avcı Bakterilere Genel Bakış

Avcılık canlılığın her ölçeğinde görülebilen bir etkileşim biçimidir. Bakteriyofajların da dahil edilmesi durumunda; mikronlar ile ölçülen canlılardan metreler ile ölçülen hayvanlara kadar uzanan bir avcı

Yazışma adresi / Correspondence: *Mustafa Önol, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara*
E-posta: mustafaonol@yahoo.com

skalası oluşur. Bu ölçeğin en düşük basamağı olan virüsler ve bakteriler düşünüldüğünde genellikle avcılar avlarından daha küçük boyutlara sahiptir. Ancak ölçeğin üst basamaklarında bu durumun tam tersi görülmektedir. Av ve avcı arasındaki boyut değişiminin tersine döndüğü nokta olarak prokaryot ve ökaryot hücrelerin birbirinden ayrılması kabul edilebilir. Çünkü protozoonlar genellikle avlarından (bakterilerden) daha büyüktür. Ökaryot ve prokaryot canlıların gösterdiği avcılık modelleri arasında yatan temel fark, prokaryot hücrelerin avlarını yutamamasından kaynaklanır. Ancak fagositoz özelliği olmayan bir hücre kendisinden daha büyük bir hücreyi avlayamaz demek doğru değildir. Küçük boyutlara sahip zorunlu avcı bir hücrenin kendisinden daha büyük bir hücreyi avlaması farklı avantajlar sağlayabilir. Bu avantajlara; büyümesi ve çoğalması için gerekli olan tüm maddeleri tek seferde elde edebilmesi örnek gösterilebilir [4]. Daha büyük bir av, başarılı bir avcıya bol miktarda besin ve enerji kaynağı sağlar. Ayrıca daha küçük bir avcı ava çok daha kolay yerleşebilir [7].

Avcı Bakterilerin Filogenetik Olarak Sınıflandırılması ve Etki Mekanizmaları

Proteobacteria

Ensifer adhaerens

Bakteri ilk kez *Ensifer adhaerens* ismi ile 1982 yılında litaretüre girmiş, 1988 yılında ismi *Sinorhizobium adhaerens* olarak değiştirilmiş ve yapılan çalışmalar sonucunda 1990 yılında tekrar eski ismini almıştır [7]. Toprakta bulunan *Ensifer adhaerens*'in Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerden oluşan geniş bir av spekturumu bulunmaktadır. Ancak *Ensifer adhaerens* zorunlu avcı bir bakteri değildir [3]. *Ensifer adhaerens* avı ile arasında sitoplazmik bir köprü kurarak avına bağlanır. Bu bağlanma "çit" benzeri bir bağlanmadır. Bir hücreye aynı anda birçok avcı hücre bağlanabilir. Bağlanma sonucunda av lize edilir [7]. Ayrıca bakteriden elde edilen allisinase enzimi ile elde edilen allisinin fungisit etkisi gösterilmiştir [17].

Micavibrio spp.

Micavibrio'lar Gram negatif çomak şeklinde bakterilerdir. Zorunlu avcı yaşam döngüsüne sahiptirler. Bu yaşam döngüsünün hareketli bakterinin ava ihtiyaç duyduğu saldırı dönemi ve avına geri dönüşümsüz olarak bağlandığı bağlanma döneminden oluştuğu düşünülmektedir. Bu bakteriler avlarına yüksek derecede spesifiktir [7]. *M. admirantus* ve *M. aeruginosavorus* olmak üzere iki türü tanımlanmıştır. *Stenotrophomonas maltophila*'yı av olarak kullanılarak *M. admirantus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* ve *Klebsiella pneumoniae* kullanılarak ise *M. aeruginosavorus* izole edilmiştir [8]. *Micavibrio* türlerini üretebilmek için av olarak 55 farklı tür denenmiş ancak başarılı olunamamıştır. Ayrıca ne kadar zengin besi yeri kullanılsa da konak bağımsız *Micavibrio*'lar üretilememiştir [7]. *Micavibrio*'lar epibiotik avcılardır ve avlarının periplasmik membranına nüfuz etmezler. Avlarının hücre duvarına yapışarak kendilerini beslerler. Bu süreçte çoğalır ve avladıkları hücrenin ölümüne neden olurlar. Bu durum parazitik bir yaşam döngüsüne sahip olmaları anlamı taşır [15].

Cupriavidus necator

Gram negatif, kısa, çomak şekilli bakterilerdir. Zorunlu avcı olmayan bu bakteriler topraktan izole edilmiştir. Zorunlu avcı olmamalarına rağmen *Agromyces ramosus*, *Arthrobacter globiformis*, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thurigiensis*, *Ensifer adhaerens*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* ve *Streptomyces* spp. gibi geniş bir Gram negatif bakteri grubunu avladığı gözlemlenmiştir [7].

Aristabacter necator

Gram negatif bir bakteridir. Avına gruplar halinde saldıran ve çit benzeri tutunma gösteren *Aristabacter necator* zorunlu bir avcı değildir. *Aristabacter necator*'un bu yüksek inhibisyon gücü ürettiği güçlü kimyasal maddelerle ve bu kimyasalların sinerjistik çalışmaları ile ilişkilidir. İn-*situ* incelemelerde bakterinin topraktaki yarışmacı ortamda hayatta kalma becerisinin çok yüksek olduğu ve diğer mikroorganizmaları ortadan kaldırdığı gözlenmiştir. *Aristabacter necator* gibi avcı bakteriler, farklı biyokimyasal maddelerin potansiyel bir kaynağı olabilirler.

Stenotrophomonas maltophilia

Stenotrophomonas maltophilia Gram negatif, hareketli, oldukça küçük boyutlara sahip (0.7–1.8 × 0.4–0.7 μm), aerobik, katalaz ve oksidaz pozitif, nonfer-

mantatif bir bakteridir [6]. Bakterinin av ile direkt teması henüz gözlemlenmemiş olsa da etkenin bulunduğu ortamlarda hayalet hücrelerin görülmesi ve etkenin hasarlı hücrelerden yayılan sinyalleri takip etmesi onun zorunlu olmayan bir avcı sayılması için yeterli görülmüştür [7]. *Stentrophomonas*'ın günümüzde bilinen 8 türü genel olarak toprakta ve bitkilerle yakın ilişkili olarak yaşamaktadır. Doğal ve yapay kirleticileri parçalama ve değerli biyomoleküller üretme özelliklerine sahip olmaları nedeniyle bitkilerin gelişimi açısından oldukça değerlidirler. Ancak özellikle *Stenotrophomonas maltophilia* insanlarda patojenik etki gösterdiği ve yüksek antibiyotik dirençliliğine sahip olduğu için dezavantajları göz ardı edilmemelidir [18].

Lysobacter spp.

Gram negatif olan bu bakteriler çok uzun hücreler ve flamentler şeklindedir (yaklaşık 70µ kadar). *Lysobacter*'ler çok miktarda salgı üretir. Bu sayede katı ortamlarda kolonileri kayma hareketi gerçekleştirebilir. *Lysobacter* türlerini, besi yerinde üretebilmek için besi yerine bakteri eklenmesi (örneğin; *Arthrobacter*) gerekmektedir [12]. *Lysobacter*'ler, kurt sürüsü taktiği kullanarak avlarına saldırmaktadır. Bu taktiği kullanmalarının nedeni olarak avın hücre duvarına bıraktıkları lize edici enzimlerin yoğunluğunu korumak istemeleri gösterilebilir [5]. *Lysobacter*'ler enzimlerini bıraktıktan sonra enzimlerden etkilenecek ilk yapı olan peptidoglikan tabakasında hızlı bir lizis başlamaktadır [12]. Bu enzimler pozitif yüklüdür ve birçok Gram pozitif bakterinin peptidoglikan tabakasına etki gösterirken sadece birkaç Gram negatif bakteriyi etkileyebilmektedir.

Myxobacteria spp.

Myxobacteria'ların en karakteristik özelliği sürüler oluşturmaları ve çok hücreli yaşam tarzına sahip olmalarıdır. Örneğin, vejatatif *Myxobacteria* hücreleri kordine bir şekilde hareket ederek sürüler halinde avlanırlar, bir başka deyişle sosyal bakterilerdir [9]. Oldukça kuvvetli şekilde kayma hareketi yapabilen *Myxobacteria*'lar bu özellikleri sayesinde özellikle toprakta etkili bir şekilde avlanabilmektedir. Avlanma, ortamda bulunan tüm av hücreleri lize edilene kadar devam etmektedir [11]. Ayrıca ortamda bulunan besin miktarı azaldığında *Myxobacteria* hücreleri henüz mekanizması bilinmeyen ancak kemotaksis yolu ile olduğu düşünülen bir yöntemle haberleşerek sporokarp meydana getirmektedir. Bu sporokarplar *Myxobacteria* türlerine göre renk ve boyut olarak farklılıklar göstermektedir.

Bdellovibrio ve benzeri organizmalar

Delta proteobacteria sınıfında bulunan *Bdellovibrio* spp., *Bacteriovorax* spp., ve *Peridibacter* spp. *Bdellovibrio* ve benzeri organizmalar adı altında kümelenmiştir (d-BALO's). *Bdellovibrio* ve benzeri organizmalar ilk olarak 1962 yılında Heinz Stolp tarafından toprakta yaşayan bakteriyofajların izolasyonu sırasında bulunmuştur ve bulunduğu günden itibaren hakkında en çok çalışma yapılan avcı bakteri grubu olmuştur [7]. d-BALO'lar Gram negatif, küçük (0.25–0.5×0.75–2 µm), çomak şeklinde, yüksek motiliteye sahip bakterilerdir. Tek kılıflı, polar bir flagelluma sahiptirler. Flagellum klasik bir dalga hareketi gösterir. d-BALO'lar diğer Gram negatif bakterilerin zorunlu avcılarıdır, diğer bir deyişle çoğalmak için tamamen diğer bakterilere bağımlıdırlar. Bu bakterilerin yaşam döngüleri; periplasmik yaşam evresi, av arama evresi, bağlanma veya tutunma, invazyon evresi, bdelloblast evresi, büyüme evresi, çoğalma ve konakçıyı parçalama evresi şeklindedir. Tutunma evresinde bakteri hücresi seçici değildir, bu nedenle Gram pozitif bakterilere veya ortamda bulunan başka büyük moleküllere tutunma gerçekleşebilir. Ancak bu tutunma kalıcı değildir. Ortam sıcaklığı ve pH'ın tutunma üzerine etkisi bulunmaktadır. Bu faktörler rastgele tutunma oranını düşürmektedir. Avcı hücre uygun bir hücreyle temas sağladıktan sonra geri dönüşü olmayan kalıcı tutunma gerçekleşir. Bu dönemde av olan hücrenin hücre duvarı yapısının önemli olduğu düşünülmektedir. Avcı hücre tutunma gerçekleştiğinde fimbria benzeri avcı uzantılar ile hücre duvarını deler. Hücre içine nüfuz eden bakteri flagellasını dış ortamda bırakır. Bu durumdaki hücreye bdelloblast ismi verilmektedir [7]. Avcı hücre periplasmik membranda iken hidrolitik enzimler salgılamaya devam eder ve konakçıya ait makro molekülleri parçalar. İntra periplazmik membrana yerleşen BALO filamentöz bir yapı oluşturur ve DNA replikasyonunu başlatır. Konak hücrenin tüm kaynakları tüketildiğinde büyük filamentöz hücre 2 ila 9 yavru hücreye bölünür [4]. Bölünme gerçekleştikten sonra yavru hücreler flagellarını oluşturur ve konak hücreyi parçalayarak lize ederler [7].

Chloroflexi

Chloroflexi genusu içerisinde bulunan *Herpetosiphon* türleri, Gram negatif olan, ancak tipik bir Gram negatif hücre duvarına sahip olmayan aerobik, kemo-organotrofik, filamentöz bakterilerdir [12]. Ölü hücreleri olduğu kadar canlı hücreleri lize etme yeteneğine sahip bu bakterilerin Gram negatif bakteriler ve sporsuz Gram pozitif bakterileri avlayabildikleri tespit edilmiştir. Laboratuvar ortamında yapılan çalışmalarda avlayacakları bakteri kolonilerine filamentleri yardımıyla fiziksel basınç uyguladıkları, koloniyle temas ettikleri noktadan koloni merkezine kadar bakteri hücrelerini lize ederek devam ettikleri gözlemlenmiştir. Bu strateji de kurt sürüsü taktiğine benzetilmiştir [7].

Actinobacteria

Streptoverticillium

Streptoverticillium Gram pozitif, flamentli, fakültatif avcı bakteridir. *Ensifer adhaerens* ile birlikte topraktan izole edilmiştir. *Micrococcus luteus* kolonilerini iyi bir şekilde lize ederek avladığı gözlemlenmiştir [3].

Agromyces ramosus

Actinobacteria takımında bulunan bu bakteri topraktan izole edilmiştir. Fakültatif bir avcıdır. *Azotobacter vinelandii*, *Rhizobium leguminosarum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens* gibi Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin yanı sıra maya hücrelerini kemotaksis içeren bir yol ile avladığı gözlemlenmiştir. Avını öldürebilmek için av hücresine çok yakın olması veya temas etmesi gerekmektedir. *Agromyces ramosus* toprakta bulunan bakterileri avladığı gibi kendisi de *Cupriavidus necatora* av olabilmektedir [7].

Filogenetik Olarak Sınıflandırılamayan Avcı Bakteriler

Vampirococcus* ve *Daptobacter

Bu bakterilerden birisi olan *Vampirococcus*, oval veya nispeten çomak şeklinde bakterilerdir. Küçük boyutlara sahip (0.3×0.6 µm) bu bakterilerin hareket etme yetenekleri yoktur. Bu nedenle kemotaksis yapamazlar. Zorunlu avcı olan *Vampirococcus*'lar epibiotik avcılardır ve av hücrelerinin duvarlarına bağlanırlar [7]. *Daptobacter*'ler Gram negatif, çomak şeklinde, 0.5 x 1.5 µm boyutlarında, hareketli ve fakültatif anaerob bakterilerdir. İn *vitro* koşullarda zengin besi yerlerinde çoğalması sağlanan *Daptobacter*'ler fakültatif avcılardır. Bu bakteriler avlarına elektron opak yapılarla bağlandıktan sonra hücre membranını parçalayarak sitoplazmasını tüketir, avladıkları hücrelerin içinde çoğalabilmektedirler. Bu avlanma yöntemine, doğrudan istila stratejisi adı verilmiştir [7].

Avcı Bakteriler ile Yapılan Bazı Çalışmalar

Bdellovibrio bacteriovorus başta olmak üzere avcı bakteriler, zoonotik patojenler olan *Escherichia coli* ve *Salmonella*'nın da dahil olduğu veteriner hekimliğinde önem taşıyan Gram negatif bakteriler ile avlanan bir bakteridir. *Bdellovibrio*'lar biyolojik kontrol ajanı olarak iyi bir potansiyele sahiptirler ancak canlı hayvanlar üzerinde çok az sayıda deneme yapılmıştır [1].

Önemli bir insan patojeni olan *Shigella* ile infekte olan zebra balığı yavruları (*Danio rerio*) üzerine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; *Bdellovibrio bacteriovorus* balıklara injekte edilmiş ve *in-vivo* ortamda *Shigella* karşısında etki göstermiştir [16].

Tavuklar üzerinde yapılan bir çalışmada avcı bakterilerin tavuk vücut sıcaklığında zorlanmalarına karşın yaşayabildikleri gösterilmiştir. Buna ek olarak aynı çalışmada sağlıklı S. Enteritidis ile infekte hayvanlar üzerinde *Bdellovibrio bacteriovorus* oral çözeltiler yolu ile kullanılarak test edilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre infekte hayvanların gastrointestinal sisteminde olumlu bir iyileşme tespit edilmiş ve avcı bakterilerin, tavukların sağlığına herhangi bir olumsuz etki göstermedikleri belirlenmiştir [1].

Bu bakterilerin toksik etkileri araştırıldığında; *Bdellovibrio bacteriovorus* ve *Micavibrio aeruginosavourus*'un insan korneası için toksik olmadığı bulunmuştur. Bakteriler insanlarda, IL-8 üretimini uyarmış ancak IL-1β düzeyinde herhangi bir değişime neden olmamıştır. Benzer deney tavşanlar üzerinde uygulanmıştır. Beş gruba ayrılan tavşanların gözlerine günde 5 doz olmak üzere 5 gün boyunca fizyolojik tuzlu su, vancomycin, *Micavibrio aeruginosavorus*, *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 ve *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J solüsyonları damlatılarak gözlenmiştir. Çalışma sonuçlarında bu

bakteri suşları tavşanların oküler dokusunda bir infilamasyona neden olmadığı gibi herhangi bir toksik etki yaratmamıştır [13].

İnfeksiyoz sığır keratokonjunktiviti dünya genelinde ciddi ekonomik ayıplara neden olan, sığırların ciddi ve bulaşıcı bir göz hastalığı olduğu bilinmektedir. *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J suşunun sığır keratokonjunktivitinin etkeni olan *Moraxella bovis* üzerine olan etkisi araştırılmış; yapılan in-vivo çalışmalarda *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J suşunun memeli hücreleri üzerine herhangi bir toksik etkisi olmadığı gibi *Moraxella bovis* infeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilecek potansiyel bir ajan olduğu belirtilmiştir [2].

Bdellovibrio bacteriovorus 109J suşunun *Bdellovibrio bacteriovorus* ve *Micavibrio aeruginosavorus* kullanılarak yapılan fare deneylerinde hem sağlıklı hem de *Klebsiella pneumoniae* ile infekte edilen fareler kullanılmıştır. Nazal yol ile avcı bakterilere maruz bırakılan sağlıklı farelerin 48 saat boyunca immunoglobulin değerleri ELISA yöntemi kullanılarak ölçülmüş ve önemli bir artışa rastlanmamıştır. Sağlıklı farelerde herhangi bir akciğer problemi oluşmadığı gibi deneyin 10. gününde avcı bakteriler vücuttan tamamen temizlenmiştir. İnfekte edilen hayvanlara aynı şekilde nazal yol ile avcı bakteriler verilmiş, sonuç olarak patojen yükünün kayda değer bir ölçüde azaldığı tespit edilmiştir [14].

Kaynakça

1. Atterbury RJ, Hobley L, Till R, Lambert C, Capeness MJ, Lerner TR, Sockett RE, (2011). *Effects of orally administered Bdellovibrio bacteriovorus on the well-being and Salmonella colonization of young chicks*. Appl Environ Microbiol. 77(16), 5794–5803.
2. Boileau, M. J., Clinkenbeard, K. D., & Iandolo, J. J. (2011). *Assessment of Bdellovibrio bacteriovorus 109J killing of Moraxella bovis in an in vitro model of infectious bovine keratoconjunctivitis.* Canadian Journal of Veterinary Research. 75(4), 285–291.
3. Casida LE Jr (1980). *Bacterial predators of Micrococcus luteus in soil*. Appl Environ Microbiol. 39, 1035–1041.
4. Chanyi R.M (2014). *Cell Biology of the Entry of Bdellovibrio and Like Organisms*. Graduate Program in Microbiology and Immunology, The University of Western Ontario, PhD Thesis, Canada.
5. Dworkin M (1999). *Fibrils as extracellular appendages of bacteria: Their role in contactmediated cell-cell interactions in Myxococcus xanthus.* Bioessays. 21, 590–595.
6. Gilligan PH, Lum G, VanDamme PAR, Whittier S (2003). *Burkholderia, Stenotrophomonas, Ralstonia, Brevundimonas, Comamonas, Delftia, Pandoraea, and Acidivorax*. eds. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al. In: Manual of Clinical Microbiology Eighth edition. ASM Press, Washington, DC. p.729–748
7. Jurkevitch E (2007). *A brief history of short bacteria: A chronicle of Bdellovibrio (and like organisms) research.* eds. Jurkevitch, E. In Predatory Prokaryotes-Biology, Ecology and Evolution. Springer, Verlag Heidelberg, Germany p.20-40
8. Lambina VA, Afinogenova AV, Romai Penabad S, Konovalona SM, Pushkareva AP (1982). *Micavibrio admirandus gen. et sp. nov.* Mikrobiologiya. 51, 114–117.
9. Muñoz-Dorado J, Marcos-Torres FJ, García-Bravo E, Moraleda-Muñoz A, Pérez J (2016). *Myxobacteria: Moving, killing, feeding, and surviving together.* Frontiers in Microbiology. 7, 781.
10. Pasternak Z, Ben Sasson T, Cohen Y, Segev E, Jurkevitch E (2015). *A new comparative-genomics approach for defining phenotype-specific indicators reveals specific genetic markers in predatory bacteria.* PLoS ONE. 10(11), e0142933.
11. Reichenbach H, Gerth K, Irschik H, Kunze B, Hofle G (1988). *Myxobacteria: A source of new antibiotics.* Trends Biotechnol. 6, 115–121.
12. Reichenbach H (2001). The genus *Lysobacter*. Eds: Dworkin M et al, In: *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community.* Springer, Berlin Heidelberg, Germany.
13. Romanowski EG, Stella NA, Brothers KM, Yates KA, Funderburgh ML, Funderburgh JL, … Shanks RMQ (2016). *Predatory bacteria are nontoxic to the rabbit ocular surface.* Scientific Reports. 6, 30987.
14. Shatzkes K, Singleton E, Tang C, Zuena M, Shukla S, Gupta S, Kadouri DE (2016). *Predatory bacteria attenuate Klebsiella pneumoniae burden in rat lungs. mBio*. 7(6), e01847–16.
15. Wang Z, Kadouri DE, Wu M (2011). *Genomic insights into an obligate epibiotic bacterial predator: Micavibrio aeruginosavorus ARL 13.* BMC Genomics. 12, 453.
16. Willis, A. R., Moore, C., Mazon-Moya, M., Krokowski, S., Lambert, C., Till, R., … Sockett, R. E. (2016). *Injections of Predatory Bacteria Work Alongside Host Immune Cells to Treat Shigella Infection in Zebrafish Larvae.* Current Biology. 26(24), 3343–3351.
17. Yutani M, Taniguchi H, Borjihan H, Ogita A, Fujita K, Tanaka T (2011). *Alliinase from Ensifer adhaerens and its use for generation of fungicidal activity.* AMB Express. 1, 2.
18. Zer Y, Karaoğlan İ, Çevik S, Erdem M (2009). *Stenotrophomonas maltophilia suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının irdelenmesi.* Gaziantep Üniversitesi Klinik Dergisi. 22, 21-24.

Felide Herpesvirus – 1 Enfeksiyonu

Ali Küçük, Yakup Yıldırım

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

Geliş Tarihi / Received: 24.11.2017, **Kabul Tarihi** / Accepted: 23.02.2018

Özet: Canine herpesvirus-1 ve phocine herpesvirus-1 ile yakın antijenik ilişkisi olan felide herpesvirus-1 (FeHV-1), kedigiller familyasında akut ve kronik üst solunum yolu ve oküler hastalık tablolarının oluşmasına neden olur. Hastalığı atlatan hayvanlarda virusun latent kalma olasılığından dolayı reenfeksiyonlar görülür. Yapılan bu derlemede kedigiller için enfeksiyözitesi ve kontagiyözitesi oldukça yüksek olan FeHV-1 enfeksiyonu ile ilgili bilgiler verilmiştir.

Anahtar kelimeler: Felide herpesvirus-1 (FeHV-1)

Felide Herpesvirus – 1 (FeHV-1) Infection

Abstract: Felide herpesvirus-1 (FeHV-1), with a close antigenic relationship with canine herpesvirus-1 and phocine herpesvirus-1, causes formations of acute and chronic upper respiratory tract and ocular disease cases in felidae family. Reinfections are seen in animals that pull through the illness due to the possibility for the virus to remain latent. In this review, information has been stated about FeHV-1 infection, whose infectiousness and contagiousness is quite high for felidae.

Key words: Felide herpesvirus-1 (FeHV-1)

Giriş

Herpesviridae familyasının bir üyesi olan felide herpesvirus-1'in (FeHV-1) doğal konakçısı kedigillerdir. Bulaş yolu çoğunlukla direkt temas olan viral ajan, konjuktiva ve korneada oluşturduğu yoğun enfeksiyonun yanı sıra üst solunum yolu problemlerine de yol açmaktadır. Etken, primer enfeksiyonu atlatan hayvanların genellikle trigeminal ganglionlarında latent enfekte hale geçmektedir. İyileşen hayvanların pek çoğu yaşamları boyunca etkeni taşır ve saçarlar [7,20,50,53].

Ekonomik boyutu aşarak insanların yaşamlarında önemli yer edinen bu hayvanları enfeksiyonlardan korumak ve hastalıklarını tedavi edebilmek için, bilim insanları yoğun bir çaba göstermektedirler. Bu araştırmalar sonucu enfeksiyonlara karşı koruma sağlamak için aşılar üretilmiş veya hastalıkların sağaltımı için antiviral ajanlar geliştirilmiştir.

Bu derlemede kedigiller için enfeksiyözitesi ve kontagiyözitesi oldukça yüksek olan FeHV-1 enfeksiyonu ile ilgili bilgiler verilmiştir.

Etiyoloji

FeHV-1, *Herpesviridae* familyasının, *alphaherpesvirinae* altfamilyasının *varicellovirus* genusu içerisinde yer almaktadır [14,15,29,34,45]. Etken, ilk olarak 1958 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde üst solunum yolu enfeksiyonu semptomları gösteren yavru bir kediden izole edilmiştir. İzole edilen bu orijinal suş FeHV-1'in öncül suşu olarak belirlenmiş ve C-27 olarak isimlendirilmiştir [15].

2016 yılında yapılmış bir araştırmaya göre, 1968-2013 yılları arasında, çeşitli barınaklarda ve kedi populasyonunun yoğun olduğu bölgelerde 26 farklı FeHV-1 izolatına rastlanılmıştır [54]. Elde edilen tüm FeHV-1 izolatları bir örnektir ve antijenik olarak fark göstermezler yani etkenin farklı serotipleri yoktur bununla birlikte ajan canine herpesvirus-1 (CHV-1) ve Phocine herpesvirus-1 (PhHV-1) ile genetik ve antijenik olarak yakınlık gösterir [7,17].

FeHV-1, felid kökenli primer ve sekonder hücre kültürlerinde ve böbrek, timus, dil, akciğer, T- lenfosit, nörofibrosarkomadan köken alan hücre hatlarında kolaylıkla replike olabilir. İnsan embriyonik akciğer hücrelerine tutunur fakat penetre olamaz. Bu hücrelerde virusa karşı doğal bir direnç bulunur [12,47,48].

FeHV-1'in yalnızca kedi eritrositlerini aglutine etme özelliği vardır. Herpesvirusların konakçı seçi-

Yazışma adresi / Correspondence: *Ali Küçük, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Burdur, Türkiye. E-posta: alikucuk13@gmail.com*

minde virus ile kırmızı kan hücreleri arasındaki ilişkinin etkili olduğu düşünülmektedir [19,35].

Çift sarmallı DNA nükleoik asidi taşıyan virionun boyutları 120–180 nm arasındadır. Tüm herpesviruslar, 12 pentavalent 150 hexavalent kapsomerden oluşan 20 yüze sahip ikosahedral bir kapsid yapısı gösterirler. Bu kapsid, nükleotidi kapsamaktadır ve kapsid tabakasının üzerinde tegument adı verilen protein yapılı bir matrix yer almaktadır. Bu yapının üzerinde de lipit yapıda zar tabakası bulunur [2,7,28,29,41]. Toplamda 74 farklı protein tespit edilmiştir [28,29]. Genom; inverter segmenti (IR) aracılığıyla Unique Long (UL) ve Unique short (US) olmak üzere iki ayrı bölgeye ayrılmıştır [12,40].

Etkenin yapısında başlangıçta 8 glikoprotein identifiye edilmiş ve bunlar gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI ve gL olarak isimlendirilmiştir. gC, etken ile hücre yüzeyinde bulunan heparan sülfat arasındaki viral bağlantının kurulmasında büyük rol oynamaktadır, gD' nin ise feline-spesifik reseptör bağlantısı olduğu tahmin edilmektedir [29].

FeHV-1, son derece yüksek tür spesifitesine sahiptir, etkenin kedigiller dışında bir rezervuarı veya alternatif konakçısı yoktur. Bununla birlikte, dış etkenlere karşı da son derece labildir ve genel dezenfektanlara yüksek derecede duyarlılık gösterir. Virus, nemli ortamlarda 18 saat canlı kalabilirken bu süre kuru ortamlarda daha düşüktür [4,7,20].

Epidemiyoloji

FeHV-1 oküler, nasal ve oral sekretlerle saçılmaktadır. Virusun indirekt bulaşması da kontamine alet, personel, mama ve su kapları vb. malzemeler yoluyla gerçekleşir [9,30]. Enfeksiyon büyük oranda enfekte kediler ile direkt temas sonucu oluşur. Aerosol bulaşma FeHV-1 için önemli bir yayılma şekli olarak kabul edilmemektedir çünkü kediler normal respirasyonları sırasında enfekte bir aerosol meydana getirmezler fakat enfeksiyona bağlı hapşırık sırasında meydana gelen damlacıklar virusu 1-3 metre öteye taşıyabilir [7,30,38]. Akut enfekte hayvanlar enfeksiyonun yayılmasında en büyük kaynak olarak gösterilebilir. Bunun yanı sıra latent persiste enfekte hayvanlar da etkenin saçılmasında büyük rol oynamaktadırlar [7].

Kedilerin, özellikle konjuktivaları ve ascendensindeki duyu nöronlarının aksonları ile epitelyum hücrelerinde hızla çoğalan etken genellikle trigeminal ganglionlarında ömür boyu latent persiste olarak kalır, nadiren de olsa trigeminal ganglion nöronlarında meydana getirdiği akut enfeksiyon, nöronları savunmasız kılar ve ölümle sonuçlanan vakalara sebep olabilir [7,9,17,18,30,37,46,49].

Viral reaktivasyon çoğunlukla stres durumlarından sonra meydana gelir, latent enfekte kedilerde spontan saçılım üzerine yapılan deneysel çalışmalara göre, %1'lik kortikosteroid tedavisi uygulanan kedilerin %70'i, yuvaları değiştirilen kedilerin %18'i ve laktasyondaki kedilerin ise % 40'ı etkeni saçmışlardır [5,9].

Stres dönemini izleyen süreçte virusun saptanması mümkün olamamaktadır, bunun sebebi, 1-13 gün arasında saçılma sürecinden önce 4-11 günlük bir lag fazı mevcuttur. Basit bir söylemle, strese maruz kalan bir kedi virusu saçmaya, bu olaydan yaklaşık 3 hafta sonra başlar [7]. Bu açıdan kedinin farklı bir ortama taşınması, virusun yeni konaklara saçılmasında büyük bir risk oluşturmaktadır [7,9].

Viral replikasyon ile indüklenen DNA hasarı sonucu mitokondrial apoptosis oluşur. Herpesviruslar, LAT (latency associated transcript) gibi çeşitli antiapoptatik genler kullanarak oluşan apoptazisi önlemeye ve replikasyon yetilerini artırmayı hedeflerler [13,23].

Latensilerin oluşumunda önemli rol oynayan bir diğer etken ise VP16 tegumentidir. Virionun hücre içerisine penetre olduğu fazda yüzeydeki mukozal hücrelerde VP16'ya rastlanılmıştır. VP16'nın aksagonal taşınımı yavaş ve etkisiz olduğu için latent enfeksiyonlara sebep olmaktadır [51].

Patogenez-Klinik Bulgular

Optimum replikasyon sıcaklığı <37°C olan etkenin inkubasyon süresi 2 ile 6 gün arasındadır. Virus, konjuktiva ve üst solunum yolu epitelyum hücrelerinde replike olduktan sonra lokal nöronları enfekte eder.

Yaş, cinsiyet veya tür ayırt etmeksizin tüm kediler için tehdit unsuru olan FeHV-1'in sebep olduğu solunum yolu enfeksiyonu başlangıçta yüksek ateş, depresyon, iştahsızlık ve hapşırmayla karakterizedir. Nasal akıntılar 5-7 gün içerisinde mukop-

rulent bir hal alır, klasik rhinotracheitis, rhinitis ve kronik sinüsitise rastlanır. Çok ciddi olgularda pnömoni gelişir [6]. Virusun oral replikasyonu aşırı salivasyona sebep olurken bu durumda öksürük ve dispne de gelişebilir [17,20,29,45]. Kedilerdeki üst solunum yolu hastalıklarının %50-75' inin sebebinin FeHV-1 olduğu ileri sürülmektedir [53].

FeHV-1'in kedilerin pulmoner savunma mekanizmasında bozukluklara yol açması sonucu hayvanlar, feline calicivirus, *Bordetella bronchiseptica, Chlamydophila felis, Mycoplasma felis* gibi bakteriyel ve viral sekonder etkenler ile koenfekte hale gelir. Enfeksiyon sırasında intranükleer inkluzyon cisimciklerine çok nadir rastlanılır çünkü bu cisimcikler hastalığın 2-7. günlerinde oluşur ve semptomların gözlenmeye başladığı evrelerde yok olurlar [20,25,57].

Kedilerde, konjuktivitisin en büyük sebeplerinden biri olan FeHV-1 ayrıca korneal ülser, stomal keratitis, keratokonjuktivitis siccaya neden olmaktadır [21,22]. Korneada epitel ülserasyon ve keratitis ile birlikte seyreden konjuktivitis en yaygın okuler semptomdur. Sequestra ve eosinofilik keratitis de FeHV-1 ile ilişkili olarak şekillenebilir [50].

Deneysel veya doğal yolla enfekte olmuş 6 yaştan küçük kedilerde, yeni kemik oluşumu veya fibroblast dönemde meydana gelen bozukluklar, oportunist patojenlerin sebep olabileceği kronik nazal enfeksiyonlara yol açabilir [20].

Duyarlı kedi populasyonlarında yüksek seyreden morbiditenin aksine mortalite oranı düşüktür. Genellikle 10-14 gün içerisinde oluşan güçlü bir immun yanıt ile hastalık iyileşir fakat virus %80 oranında trigeminal ganglionlarda latent kalır [20,36,56]

Teşhis

Primer enfeksiyon geçiren kedilerde viral ajanların saptanması için yeterli miktarda virus saçılımı olmasına rağmen bu saçılım sırasındaki klinik bulguların son derece kısıtlı olması kesin teşhisi zorlaştırmaktadır [30]. Bu bakımdan organizmanın immunolojik cevabını ortaya koyan ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ve immunfloresan antikor testi benzeri testler ile virus izolasyonu ve moleküler yöntemler enfeksiyonun teşhisinde güvenle kullanılabilir. [11,29,30]. Virusun izolasyonu, günümüzde altın standart olarak kabul edilmektedir.

Konjuktival, korneal veya nazal yüzeylerden dakron veya pamuk swablarla alınan örnekler kontrol laboratuarlarına soğuk zincire uygun biçimde, hızlı bir şekilde ve transport vasatları içerisinde getirilmelidir [11,30,43].

Etkene enfeksiyonu takip eden 24 saatten daha kısa bir sürede oropharangeal ve nasal bölgelerden alınan swablarda rastlanabilinir [7,30]. Deneysel olarak erişkin bir farenin korneasına skarifiye olarak inokule edilen etkene immunohistokimyasal yöntem kullanılarak inokulasyonun 6. gününde korneada, konjuktivada, iriste, koroidde, retinada, siliar gangliada (CG), trigeminal gangliada (TG), pterygopalatin gangliada (PTPG), süperior servical gangliada, beyin sapında, olfaktorik bulbada ve hipotalamusta rastlanılmıştır [33,53].

Kedilerde söz konusu enfeksiyonun teşhisine yönelik örnekleme yapılmadan önce, etken maddesi proparakain olan topikal anesteziklerin kullanımı oldukça yaygındır ancak bu ilaçların kullanıldığı bölgelerdeki FeHV-1 etkenini inaktif hale getirebilme riski bulunduğu göz ardı edilmemelidir [43].

Enfeksiyonun direkt teşhisinde virus izolasyonu önemli bir tanı metotudur ancak etkenin hücre kültüründe üretilmesinin uzun zaman alması bu metodun dezavantajı olarak kabul edilir [11].

FeHV-1 enfeksiyonlarının tanısında serolojik testlere başvurmak çok güvenilir değildir. Bunun en büyük sebeplerinden biri, kedinin aşı uygulamalarına verdiği immun yanıt ile sokak virusuna karşı verdiği immun yanıtın ayırt edilememesidir. Bir diğer sebep, FeHV-1'in serum nötralizan antikor titresi primer enfeksiyonlardan sonra düşük seyrederken, primer enfeksiyona göre daha nadir görülen reenfeksiyon durumlarında bu titrenin yüksek seyretmesidir. Yapılan araştırmalara göre, FeHV-1 seropozivitesi veya nötralizan antikor yoğunluğu ile virus tespiti veya enfeksiyonun varlığının tespitiyle ilgili bir bağlantı kurulamamıştır. Bundan dolayı günümüzde serolojik testler daha çok kedilerin immun durumunun araştırılmasında kullanılmaktadırlar [26,30,32].

Diğer bir teşhis metodu da immun floresan antikor testidir. Bu yöntemi uygulamak için toplanan örnekler, korneal kazıntı veya biyopsi ile elde edilir.

Elde edilen bu örnekler, hücre yüzeyindeki FeHV-1 epitoplarına özgü olan floresan boyalarla boyanmış bir konjugat ile reaksiyona sokulur ve sonuçlar floresan mikroskoplarında incelenir. [1,30,32].

FeHV-1'in tanısı amacıyla farklı pek çok PZR test protokolü geliştirilmiştir ve çoğu viral timidin kinaz genini baz alır. Ticari laboratuarlarda, konvensiyonel PZR, real-time PZR ve nested-PZR gibi farklı PZR protokolleri ile FeHV-1'in moleküler tanısı sağlanmaktadır. Pek çok laboratuarda FeHV-1'in moleküler tanısında standart olarak konvensiyonal PZR ve RT-PZR kullanılmaktadır. Nested-PZR hassasiyetinin sebep olduğu yüksek kontaminasyon riski sebebiyle kullanım alanı dardır. Ayrıca moleküler teşhis amacıyla örnekler alınırken kullanılan topikal anesteziklerin RT-PZR hassasiyetini azalttığı bildirilmiştir [10,16,42,55].

Tedavi

FeHV-1 enfeksiyonunun antibiyotikler ile tedavisi mümkün olmamaktadır. Ancak, semptomatik tedavi uygulanabilir. Anoreksi gösteren hayvanlara, besin ve sıvı desteği sağlanmalıdır. Dehidre olan hayvanlara damar içi veya deri altı serum (% 0,9'luk izotonik NaCL solusyonu, %5'lik dekstroz solusyonu) uygulaması yapılmalıdır. Ayrıca, sekonder bakteriyel enfeksiyon riskine karşı amoksisilin, enrofloksasin ve tetrasiklin gibi etken maddeleri içeren antibiyotik grupları kombine edilerek kullanılabilir. Keratitis, keratokonjuktivitis ve konjuktivitis gibi klinik semptomların görülmesi oftalmik antibiyotikler uygulanabilir [6,52].

Sistemik olarak kullanılacak olan kortikosteroidler kronik enfekte hayvanlarda reenfeksiyon riskini ortaya çıkardığı için kontraendikedir. Bununla birlikte oftalmik kortikosteroidler de ülseratif keratitise yol açabilirler. Yapılan araştırmalara göre [6,52] % 0.25' lik oxymetazoline HCl nazal dekonjestan damlanın enfekte kedilerde nazal akıntıyı azalttığına ortaya konulmuştur.

İnvitro ortamlarda FeHV-1 enfeksiyonunun tedavisi amacıyla geliştirilmiş pek çok antiviral ajan bulunmaktadır. Bu ajanların başlıcaları arasında, nükleosit veya nükleotid analoğu olarak idoxuridin, viderabin, trifluridin, sidofovir; Purin analoğu olarak asiklovir, gansiklovir, valgansiklovir, pensiklovir, famsiklovir sayılabilir [30].

Herpetik enfeksiyonların tedavisinde antiviral ilaçların yanı sıra lizin, interferon, lambda-carrageenan, leflunomid ve laktoferrin gibi sınıflandırılmamış ajanlar da kullanılabilir.

Üzerinde yoğun bir şekilde çalışılan ve bir arginin antagonisti olan lizin FeHV-1'e karşı en etkili antiviral ajan olarak kabul edilmektedir. [31]. İnterferonlar da enfekte hücrelerden komşu hücrelere virusun yayılmasını baskılayarak etkenin üreme döngüsünü deprese eder [50].

Koruma ve Kontrol

Enfeksiyonun önlenmesi ve kontrol altına alınabilmesi için aşı uygulamaları ve hastalıkla mücadele yönetimi bir arada düşünülüp, hastalığa o perspektiften yaklaşmak önemlidir. FeHV-1 prevalansı yüksek, kolay bulaşabilen ve kimi zaman ciddi veya ölümcül vakalara sebep olan bir enfeksiyon olduğu için aşılama en temel koruma yöntemidir [8].

FeHV-1 enfeksiyonu ile mücadelede modifiye canlı aşılar ve inaktif aşılar kullanılmaktadır. Bunlar Feline Corona virus (FCV), Feline Calicivirus ve Feline Panleukopenivirus ile kombine şekilde hazırlanabilmektedir [44]. Bazen FeHV-1 ve FCV aşılarının aynı anda uygulanması sonucu aşıya bağlı olarak oluşan klinik belirtiler görülebilir [8]. Aynı şekilde, attenüe FeHV-1 aşılarında reenfeksiyon riski bulunmaktadır özellikle deri altı yolla uygulandıklarında hastalığı indükleyebilirler, bu yüzden aşılama sonrası kedilerin enjeksiyon bölgesini yalamadıklarından emin olunmalıdır [24].

İntranazal modifiye canlı aşı uygulaması da iyi bir koruma sağlamakla birlikte nadir de olsa geçici klinik semptomların oluşmasına yol açabilmektedir ancak uygulanmasından itibaren hızlı bir koruma sağlayan aşı 2 günde kısmi olarak koruma sağlarken 4-6 gün içinde kayda değer bir immunite oluşturur [7,27]. Bundan dolayı intranazal aşıların, barınaklar gibi kedi popülasyonunun ve hayvan sirkülasyonunun yoğun olduğu yerlerde kullanılmaları tercih edilmektedir [3,7].

İnaktif aşı uygulamalarından sonra reenfeksiyon ve virus saçılımı gibi risk faktörleri bulunmadığı için oldukça güvenlidir. Hatta gebe kedilerde uygulanmak üzere bazı inaktif aşılar üretilmiştir. Gebelik sırasında uygulanan bu aşılar yavruların da korunmasında rol oynamaktadır [7].

Avrupa Birliği ülkelerinde Fehv-1'e karşı aşı uygulamaları yılda 1 kez yapılmaktadır fakat ABD'deki kimi bilimsel otoriteler, aşılamaya bağlı sarkoma vb. pek çok yan etkiyi de göz önünde bulundurarak ilk aşıdan sonra 3 yılda bir rapelinin yapılmasını önermişlerdir [39].

Ev kedileri, FeHV-1'e karşı mutlaka düzenli olarak aşılanmalıdır. Kediler belli bir süre hayvan pansiyonu gibi risk faktörü yüksek bir yerde barındırılacaksa aşının her yıl yapılan rapel uygulaması aksatılmamalıdır. Hijyen, bakım ve besleme şartlarının iyi olması da oldukça önemlidir.

Kaynaklar

1. Bestmann-Smith J, Boivin G, (2002). *Herpes simplex virus isolates with reduced adefovir susceptibility selected in vivo by foscarnet therapy*. J Med Virol. 67, 88-91.
2. Davidson AJ, (2010). *Herpesvirus Systematics*. Vet Microbiol. 143, 52-69.
3. Dawson S, Willoughby K, Gaskell RM, Wood G, Chalmers WSK, (2001). *A Field Trial to Assess the Effect of Vaccination against Feline Herpesvirus, Feline Calicivirus and Feline Panleucopenia Virus in 6-Week-Old Kittens*. J Feline Med Surg. 3, 17-22.
4. Donaldson AI, Ferris NP, (1976). *The survival of some airborne animal viruses in relation to relative humidity*. Vet Microbiol. 1, 413-420.
5. Ellis TM, (1981). *Feline Respiratory Virus Carriers in Clinically Healthy Cats*. Aust Vet J. 57, 115-118.
6. Ettinger SJ, Feldman EC, (2010). *Textbook of Veterinary İnternal Medicine Disease of the dog and the cat*. Seventh edition. St. Louis Missouri: Saunders Elsevier, p. 946.
7. Gaskell R, Dawson S, Radford A, Thiry E, (2007). *Feline Herpesvirus*. Vet Res. 38, 337-354.
8. Gaskell RM, Gettiny G, Graham SJ, Skilton D, (2002). *Veterinary Products Committee working group report on feline and canine vaccination*. Vet Res. 150, 126-134.
9. Gaskell RM, Povey RC, (1982). *Transmission of Feline Viral Rhinotrecheitis*. Vet Rec. 111, 359-362.
10. Goldschmidt P, Rostane H, Saint-jean C, Batellier L, Alouch C, Zito E, Bourcier T, Laroche L, Chaumeil C, (2006). *Effects of topikal anaestheics and flurorescein on the real time-PCR used for the diagnosis of Herpesviruses and Acanthameoba keratitis*. Br J Ophthalmol. 90, 1354-1356.
11. Gould D, (2011). *Feline Herpesvirus-1: Oculer Manifestations, Diagnosis and Treatment Options*. J Feline Med Surg. 13, 333-346.
12. Grail A, Harbour DA, Chia W, (1991). *Restriction endonuclease mapping of the genome of feline herpesvirus type 1*. Arch Virol.116, 209-220.
13. Gupta A, Gartner JJ, Sethupathy P, Hatzigeorgiou AG, Fraser NW, (2006). *Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript*. Nature. 442, 82-85.
14. Hamano M, Maeda K, Mizukoshi K, Une Y, Mochizuki M, Tohya Y, Akashi H, Kai K, (2003). *Experimental İnfection of Recent Field İsolates of Feline Herpes Virus Type-1*. Journal Vet Med Sci. 65, 939-943
15. Hamano M, Maeda K, Mizukoshi K, Une Y, Mochizuki M, Tohya Y, Akashi H, Kai K (2004). *Genetic Rearrangements in the gC Gene of the Feline Herpesvirus Type1*. Virus Genes. 28, 55-60.
16. Helps C, Reeves N, Egan K, Howard P, Harbour D, (2003). *Detection of Chlamydophila felis and Feline Herpesvirus by Multiplex Real-Time PCR Analysis*. J Clin Microbiol. 41, 2734-2736.
17. Henzel1 A, Brum MCS, Lautert C, Martins M, Lovato LT, Weiblen R (2012). *Isolation an Identification of Feline Calicivirus ande Feline Herpesvirus in Southern Brazil*. Braz J Microbiol. 43, 560-568.
18. Hickman M, Reubel GH, Hoffman DE, Morris JG, Rogers QR, Pedersen NC, (1994). *An epizootic of feline herpesvirus, type 1 in alarge specific pathogen-free cat colony and attempts to eradicate the infection by identification and culling of carriers.* Lab Anim. 28, 320-329.
19. Horimoto T, Kasaoka T, Tuchiya K, Takahashi E, (1989). *İdentification of Feline Herpesvirus Type-1 Hemagglutinin*. Jpn J Vet Sci. 51, 607-612.
20. Jubb, Kennedy, Palmar, (2016). *Pathology of Domestic Animals vol 2*, sixth edition, St. Louis Missouri: Elsevier, p. 588.
21. Kang TK, Park HM, (2008). *Prevalence of feline herpesvirus 1, feline calicivirus and Chlamydophila felis in clinically normal cats at a Korean animal shelter*. J Vet Sci. 9, 207-209.
22. Karapınar Z, Dinçer E, Ataseven SV, Karaca M, (2014). *Felid Herpesvirus-1 İnfection in Van Cats with Conjucktivitis*. Van Vet J. 25, 15-17.
23. Kent J R, Kang W, Miller C G, Fraser NW, (2003). *Herpes simplex virus latency-associated transcript gene function*. J Neurovirol. 9, 285-290.
24. Kruger JM, Sussman DM, Maes RK, (1996). *Glycoproteins gI and gE of Feline Herpesvirus-1 Are Virulence Genes: Safety and Efficacy of agI–gE0 Deletion Mutant in the Natural Host*. Virol. 220, 299-308.
25. Küçük A, Sağ N, Çakır C, Acar G, Yıldırım Y, Ataseven SV, (2017). *Sağlıklı Görünüşlü ve Solunum Sistemi Problemli Barınak Kedilerinde Feline Herpesvirus Tip 1 (FeHV-1) Enfeksiyonu*. Erciyes Üni Vet Fak Derg. 14, 25-30.
26. Lappin MR, Andrews J, Simpson D, Jensen WA, (2002). *Use of serologic tests to predict resistance to feline herpesvirus 1, feline calicivirus, and feline parvovirus infection in cats*. J Am Vet Med Assoc. 220, 38-42.
27. Lappin MR, Sebring RW, Porter M, Radecki SJ, Weir J, (2006). *Effects of a single dose of an intranasal feline herpesvirus 1, calicivirus, and panleukopenia vaccine on clinical signs and virus shedding after challenge with virulent feline herpesvirus 1.* J Feline Med Surg. 8, 158-163.

28. Maeda K, Horimoto T, Mikami T, (1998). *Properties and Functions of Feline Herpesvirus Type-1 Glycoproteins*. Jpn J Vet Sci. 60, 881-888.

29. Maes R, (2012). *Felid Herpesvirus Type 1 Infection in Cats: A Natural HostModel for Alphaherpesvirus Pathogenesis*. ISRN Vet Sci. 1-14, doi:10.5402/2012/495830.

30. Maggs DJ, (2005). *Update on Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Feline Herpesvirus Type 1*. Clin Tech Small Anim Pract. 20, 94-101.

31. Maggs DJ, Collins BK, Thorne JG, Naisse PM, (2000). *Effects of L-lysine and L-arginine on in vitro replication of feline herpesvirus type-1*. Am J Vet Res. 61, 1474-1478.

32. Maggs DJ, Lappin MR, Reif JS, Collins JK, Carman J, Dawson DA, Bruns C, (1999). *Evaluation of serologic and viral detection methods for diagnosing feline herpesvirus-1 infection in cats with acute respiratory tract or chronic ocular disease*. J Am Vet Med Assoc. 214, 502-507.

33. Martin JR, Jenkins FJ, Henken DB, (1991). *Targets of herpes simplex virus type 1 infection in a mouse corneal model*. Acta Neuropathol. 82, 353-363.

34. Najafi H, Madadgar O, Jamshidi S, Langeroudi1 AG, Lemraski1 MD, (2014). *Molecular and clinical study on prevalence of feline herpesvirus type 1 and calicivirus in correlation with feline leukemia and immunodeficiency viruses.* Vet Res Forum. 5, 255-261.

35. Nemato K, Horimoto T, Xuan X, Kusanagi K, Takumi A, Tohya Y, Azetaka M, Takahashi E, Mikami T (1990). *Demonstration of Canine Herpesvirus-spesific Hemagglutination*. Jpn J Vet Sci. 52, 395-398.

36. Ohmura Y, Ono E, Matsuura T, Kida H, Shimizu Y (1993). *Detection of feline herpesvirus 1 transcripts in trigeminal ganglia of latently infected cats*. Arch Virol. 129, 341-347.

37. Pesavento PA, Murphy BG, (2014). *Common and Emerging Infectious Diseases in the Animal Shelter*. Vet Pathol. 51, 478-491.

38. Povey RC, Johnson RH, (1970). *Observations on the epidemiology and control of viral respiratory disease in cats*. J Small Anim Pract. 11, 485-494.

39. Richards JR, Elston TH, Ford RB, Gaskell RM, Hartmann K, Hurley KF, Lappin MR, Levy JK, Rodan I, Scherk M, Schultz RD, Sparkes AH, (2006). *The 2006 American Association of Feline Practitioners Feline Vaccine Advisory Panel Report*. J Am Vet Med Assoc. 229, 1405-1441.

40. Rota P, Maes R, Ruyechan WT, (1986). *Physical characterization of the genome of feline herpesvirus-1*. Virol. 154, 168-179.

41. Sandmeyer LS, Waldner CL, Bauer BS, Wen X, Bienzle D, (2010). *Comparison of polymerase chain reaction test for diagnosis of feline herpesvirus, Chlamydophila felis and Mycoplasma spp. infections in cats with oculer disease in Canada*. Can Vet J. 51, 629-633.

42. Stiles J, Mcdermott M, Willis M, Roberts W, Greene C, (1997). *Comparison of nested polymerase chain reaction, virus isolation and fluorescent antibody testing for identifying feline herpesvirus in cats with conjunctivitis*. Am J Vet Res. 58, 804-807.

43. Storey E, Gerding P, Scherba G, Schaeffer DJ, (2002). *Survival of equine herpesvirus-4, feline herpesvirus-1, and feline calicivirus in multidose ophthalmic solutions*. Vet Ophthalmol. 5, 263-267.

44. Summers SC, Ruch-Gallie R, Hawley JR, Lappin MR, (2016*). Effect of modified live or inactivated feline herpesvirus-1 parenteral vaccines clinical and laborator findings following viral challenge*. J Feline Med Surg. 19(8), 1-7.

45. Sun H, Li Y, Jiao W, Liu C, Liu X, Wang H, Hua F, Dong J, Fan S, Yu Z, Gao Y, Xia X, (2014). *Isolation and Identification of Feline Herpesvirus Type 1 from a South China Tiger in China*. Viruses. 6, 1004-1014.

46. Sussman MD, Maes RK, Kruger JM, (1997). *Vaccination of Cats for Feline Rhinotracheitis Results in a Quantitative Reduction of Virulent Feline Herpesvirus-1 Latency Load after Challenge*. Virol. 228, 379-382.

47. Tegtmeyer P, Enders JF, (1969). Feline *Herpesvirus Infection in Fused Cultures of Naturally Resistant Human Cells*. J Virol. 3, 469-476.

49. Tham KM, Studdert MJ, (1986). *Variable sensitivity of a feline embryo cell line and of three kitten kidney cell cultures to feline herpes- and caliciviruses*. Vet Microbiol. 11, 173-176.

49. Thiry E, Addia D, Belak S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Jones T, Hartmann K, Hoise MJ, Llorent A, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Truyen U, Hornizek MC, (2009). *ABCD Guidelines of prevention and management*, J Feline Med Surg. 11, 547-555.

50. 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.

51. Thompson RL, Preston CM, Sawtell NM, (2009). *De Novo Synthesis of VP16 Coordinates the Exit from HSV Latency In Vivo*. PLoS Pathog. 5, 1-14.

52. Tilley P, Smith FWK, (2008). *The 5- Minute Veterinery Consult canine and Feline*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, p. 646-647.

53. Townsend W, Jacobi S, Tai S, Kiupel M, Wise AG, (2013). *Ocular and Neural Distribution of Feline Herpesvirus-1 During Active and Latent Experimental Infection in Cats*. BMC Vet Res. 9, 185.

54. Vaz PK, Job N, Horsington J, Ficorilli N, Studdert MJ, Carol HA Gilkerson JR, Browning FG, Devlin JM, (2016). *Low Genetic Diversity Among Historical and Contemporary Clinical İsolates of Feline Herpesvirus-1*. BMC Genom. 17, 704.

55. Volopich S, Benetka V, Schwendenwein I, Möstl K, Sommerfeld-Stur İ, Nell B, (2005). *Cytologic findings, and feline herpesvirus DNA and Chlamydophila felis antigen detection rates in normal cats and cats with conjunctival and corneal lesions.* Vet Ophthalmol. 8, 25-32.

56. Vögtlin A, Fraefel C, Albini S, Leutenegger CM, Schraner E, Spiess B, Lutz H, Ackermann M, (2002). *Quantification of Feline Herpesvirus 1 DNA in Ocular Fluid Samples of Clinically Diseased Cats by Real-Time TaqMan PCR*. J Clin Microbiol. 40, 519-523.

57. Zachary J, (2016). *Pathology Basis of Veterinary Disease*, sixht edition, St. Louis Missouri Elsevier, s. 493

Etlik Vet Mikrobiyol Derg, 2018; **29 (1):** 82-86 **Derleme** / Review Article

Kuduz Enfeksiyonunun Moleküler Evrimi, Çeşitliliği ve Coğrafik Dağılımı

Yeşim Tatan[1], Tuba Çiğdem Oğuzoğlu[2]

[1] Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Kuduz Teşhis Laboratuvarı, Etlik, Ankara
[2] Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Dışkapı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 20.03.2018, **Kabul Tarihi** / Accepted: 22.05.2018

Özet: Kuduz, insan ve hayvan sağlığını etkileyen, önemli ve ölümcül enfeksiyöz hastalıklardan birisidir. Bu derlemede; Kuduz enfeksiyonunun moleküler orijini, tarihçesi, Kuduza sebep olan Lyssavirusların çeşitliliği, coğrafik dağılımları ile ülkemizdeki Kuduz enfeksiyonunun durumu hakkında bilgiler sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: Kuduz, orijin, evrim, filogenetik

Molecular Evolution, Diversity and Geographic Distribution of Rabies Infection

Abstract: Rabies is one of the most important and deadly infectious diseases affecting human and animal health. In this compilation; The molecular origin of rabies infection, its history, the diversity of Lyssavirus causing the disease, its geographical distribution and the situation of the infectious disease in our country are presented.

Key words: Rabies, origin, evolution, phylogenetic

Giriş

Kuduz enfeksiyonu; tarihçesi çok eski yıllara dayanan, dünyada Antartika kıtası dışında tüm kıtalarda tespit edilmiş, her yıl enfekte karnivor kökenli ısırma vakaları sonrası insan ölümlerinin yaşandığı önemli bir viral zoonoz hastalıktır. Dünya genelinde yılda yaklaşık 60.000 kişinin Kuduz enfeksiyonundan öldüğü tahmin edilmektedir [16].

Bu derlemede, zoonotik öneme sahip Kuduz enfeksiyonunun etiyolojik özellikleri, moleküler orijini ve evrimi, virusların filocoğrafik dağılımı ve ülkemizdeki virus suşlarının durumu hakkında bilgiler bulunmaktadır.

Virusun Özellikleri

Kuduz enfeksiyonu, *Mononegavirales* sınıfının *Rhabdoviridae* ailesinde yer alan Lyssaviruslar tarafından meydana getirilmektedir [10, 34]. Glikoprotein peplomerlere sahip lipid zar, helikal olarak sarılmış nükleokapsiti çevrelemektedir. Virion bu yapısıyla morfolojik olarak mermi veya koniye benzemektedir. Virus negatif polaritede, tek iplikçikli (single-stranded-ssRNA), 11-12 kb uzunluğunda ve parçalı olmayan tek molekül halinde bir genoma sahiptir. Lyssavirus virionları 5 majör protein içermektedir: nükleoprotein (N), fosfoprotein (P), matriks proteini (M), glikoprotein (G), ve RNA bağımlı RNA polimeraz (L) proteinleridir [44].

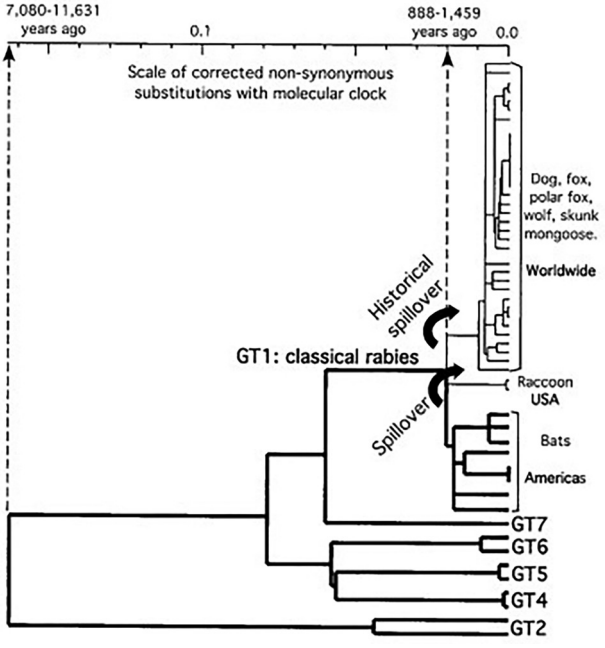
Lyssavirusların Orijini

Lyssaviruslar'ın konakçı değişimine kanıt olarak, genotip 1'e ait eski iki virusun filojenisine bakıldığında ilk bulaşmanın, rakun RABV lineajı (Doğu Amerika) ve Kuzey Amerika'da yakın ilişkili olduğu kokarca lineajının (Merkez Amerika) arasında meydana geldiği tahmin edilmekteydi. Ancak bilinmeyen bir bölgede kaynağı belli olmayan bir vektörden ikinci bir bulaşma nedeniyle carnivorların bir türünde RABV'nin var olduğu ve tüm dünyaya yayıldığı tespit edilmiştir [3].

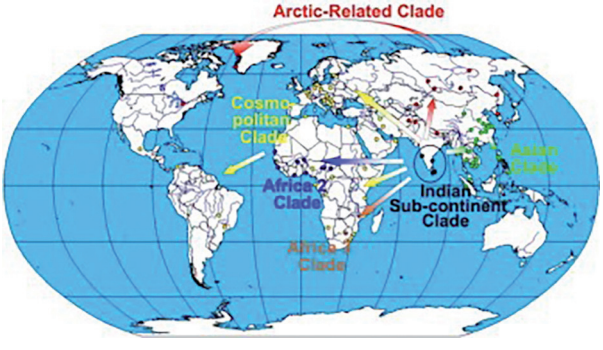
Dünyadaki Rabies olgularına bakıldığında insan vakalarının %99'dan fazlasını köpek (*Canislupus familiaris*) orijinli memeli RABV (Rabies virus) meydana getirmektedir [27]. Önemli bir patojen olan Kuduz virusunun küresel filocoğrafik durumunu keşfetmek ve köpeklerde RABV evrim periyodunu anlamak için, Bayesian coalescent metoduyla N ve G genleri incelenmiş; *Canid* RABV lineajlarının Hindistan yarımadasından muhtemelen 1500 yıl önce ortak bir atadan köken aldığı düşünülmüştür (şekil 2) [5]. RABV lineajları; Afrika 2, Afrika 3, Kutup ilişkili, Asya, Cosmopolitan ve Hindistan yarımadası dalı olarak tanımlanan farklı filogenetik

Yazışma adresi / Correspondence: *Yeşim Tatan (ORCID: 0000-0003-4066-6352), Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Kuduz Teşhis Laboratuvarı, Etlik, Ankara E-posta: vet.yesim@hotmail.com*

gruplardan oluşmaktadır [4, 8, 24, 28]. On beşinci yy. boyunca okyanuslar arası yolculuğun gelişmesi sonrasında ‘‘Cosmopolitan’’ yani çok uluslu olarak anılan köpek RABV lineajı küresel yayılım göstermiş ve tüm kıtalara Kuduz’un yayılmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmüştür [3, 24]. Önceleri Afrika 1 olarak adlandırılan Cosmopolitan dalı Afrika’nın kuzey, güney ve merkezine dağılım göstermiştir [24]. Bu dalın Avrasya’dan büyük olasılıkla ikinci göçleri temsil ettiği düşünülmektedir [5]. Dünya çapında yayılım göstermesinin yanı sıra yaygın olarak Afrika, Asya ve Latin Amerika gibi bölgelerde köpeklerde görülürken, aynı zamanda Kuzey Amerika’da (kokarca, gri tilki ve çakal) vahşi yaşamdaki vektörlere ait viruslarla da uyumlu olduğu belirlenmiştir [3, 35, 39].



Şekil-1. Moleküler zamanlamada Lyssavirus filogenetik ağacı [23]



Şekil-2. Köpek kuduz virusunun orjin ve evrimi [1]

Afrika 2 ve Afrika 3 dallarının yalnızca bulundukları bölgeye spesifik olduğu görülmüştür [20]. Kutupla ilişkili dal, Grönland ve Kuzey Amerika’nın yanı sıra Asya’nın merkezinden doğusuna kadar yayılmış, tüm kuzey yarım kürede büyük bir alanı işgal eden bir dizi lineajlar olarak dolaşmaktadır [18, 24, 29, 31, 38]. Bu dal aynı zamanda İran ve Pakistan’da da dolaşmaktadır [36]. RABV’nin Hindistan yarımadası dalı yalnızca Güney Hindistan ve Sri Lanka içinde dağılmıştır [2, 37]. Yayılım için bu grubun ilk olduğu düşünüldüğünden uçamayan memelilerde RABV filojeni bazal bir pozisyon işgal ettiği için çok önemlidir [5].

Karasal memeli RABV’nin evcil köpekler aracılığıyla Hindistan yarımadasının güneyinden bir atadan köken aldığı düşüncesi var olmasına rağmen, bu hipotezi desteklemek için daha geniş bir coğrafi bölgeyi temsil eden sekans örneklerinin test edilmesi gerekmektedir. Ortak ata zamanlarını tahmin etmek için kullanılan kaynaştırma temelli (Coalescent based) yöntemlerle evrimsel farklılaşmanın büyük olasılıkla son 1500 yıl içinde gerçekleştiği ön görülmektedir. 2000 yıldan daha uzun süredir Orta Doğu’da var olan en eski canid RABV lineajlarını yeni çalışmalarda kullanabilmek; ya sonradan nesli tükenen yarasalardan bağımsız bir yayılmaya sebep olduklarından ya da farklı bir Lyssavirus genotipi olmaları sebebiyle mümkün olamamaktadır [5, 40, 41].

Uzun dönem filocoğrafik örnekler için; lineajlar arasındaki uygun farklılıkların; bazılarının diğerlerinden daha üstün olmasına olanak vermesi sayesinde, lineajların seçici olarak ortadan kalkmasına neden olabilmektedir. Bu bazı ara lineajlar, stokastik işlemler/süreçler nedeniyle ortadan kalkabilmektedir. RABV’nin yeni konakçılara uyum sağlamasına imkan veren mutasyon faydalarının tespiti mümkün olmasına rağmen, RABV evrimi boyunca gözlenen dN/dS değeri çok düşük olduğu için güncel metodlarla belirlenememiştir. Bu nedenle RABV’deki uzun filocoğrafik örnekler üzerinde çok daha derin etkiye sahip olan rastgele süreçler (stokastik süreç) öngörülür. Özellikle uzun periyodlar boyunca kısa dönem demografik açılımların görüldüğü bu soyların çoğunun genetik kayma ile tesadüfi şekilde kaybolması bölgesel olarak ayrı filocoğrafik dallarda ayrılmaya sebep olmuştur [5].

Lyssavirusların Evrimi

RNA virus grubundaki Lyssaviruslar, başlıca *Carnivora* ve *Chiroptera* türlerine ait canlıları, vektör olarak kullanırlar. Bu virusların ekolojik olarak iki farklı memeli türüne adapte olabilmesi, başarılı konakçı değişiminin olası bir sonucu olarak yorumlanmaktadır [3]. İki farklı tür arasındaki tüm protein sekansları; sinonim (dS) ve sinonim olmayan (dN) yer değiştirmelerin oranı ile evrimsel süreçteki seçilimlerin etkisi değerlendirilebilmektedir (dN/dS oranı; 1'den büyük ise pozitif seçim, 1'den küçük ise negatif seçim ve 1'e eşit ise nötr seçim) [46].

Virus-konakçı ilişkilerinde önemli bir rolü olan ve konakçı adaptasyon proteini olarak kabul edilen G proteininin sekans analizleriyle Lyssavirus'un evrimi konusunda araştırmalar yapılmış olup, ilk olarak nokta mutasyonlar ve rekombinasyon gibi evrimsel güçlerin, evrim oranı ve modelindeki önemi ortaya konulmuştur [3, 7, 33].

Filogenetik analiz sonuçları; *Chiroptera*'dan *Carnivor*'lara Lyssavirus'un başarılı konakçı değişimi olasılığını, G geni tümündeki dN/dS oranı analizleri sonucunda; Lyssavirus evriminde nokta mutasyonun ve negatif seçimin önemli rol oynadığı ve bu süreçte rekombinasyon olmadığı fikrini öne çıkarmaktadır. Bu bağlamda, *Chiropteran* Lyssavirus'ların *Carnivor* RABV'den çok daha önce var olduğu ortaya konulmuştur (Şekil 1) [3, 7, 33].

dN/dS oranları kullanılarak Lyssavirus'un evrim oranı yaklaşık olarak $3{,}1\times10^{-4}$ ile $5{,}5\times10^{-4}$dS/yer/yıl olarak bildirilmektedir. Bu oran, 284 ile 504 yıl önce *Cosmopolitan* varyantın ayrılma tarihini ortaya koyar ki, bu zaman aralığı da son 5 yüzyıldaki yoğun insan hareketleriyle uyum göstermektedir. En eski farklılıkları değerlendirmek için kullanılan non-sinonim düzeltilmiş mesafelerle elde edilen bir filogenetik ağaç; *Chiroptera*'lardan C*arnivor'*lara Rabies Virus (RABV) konakçı değişimi zamanını 888 ile 1459 yıl öncesine dayandığını göstermektedir [3]. Bu tahminin *Carnivor* Kuduzu'nun günümüzden yaklaşık 4000 yıl önce tanımlandığı konusu ile çelişkili olduğu görülmektedir [41]. Ancak Mezopotamya Kuduzu'ndan sorumlu Lyssavirus tipi bilinmediğinden, bu RABV lineajının; tarihsel ve/veya çevresel olaylar ya da hastalık sebepli şekillenen ölümler sonucunda nesli tükenmiş olabileceği kabul edilmiştir. 4000 yıl önce *Carnivor* Kuduzu'nun ortaya çıkışı Lyssavirus evriminin oldukça yavaş bir şekilde gerçekleştiğini yansıtmaktadır [3]. Evrimin nötral modeli, polimorfizm kaybı ya da neslinin tükenmesine neden olabilen rastgele bir genetik sürüklenme anlamına geldiği için Mezopotamya Lyssavirusu'nun neslinin tükenmesi en olası hipotezdir [26].

Lyssaviruslar; rezervuarı dışındaki konakçılara yayılabilen zoonotik enfeksiyöz ajanlar olmuşlardır. Ancak hedefindeki herhangi son konakçının ölümüne neden olduklarından dolayı, ileriye yayılım söz konusu olamamaktadır. Bu nedenle yeni konakçı türlerinde RABV'nin başarıyla yayılımı büyük bir adaptif meydan okumayı göstermektedir [5, 28]. Bu durum, kısmen RABV üzerinde etkili olan güçlü seçici kısıtlamaların bir yansımasıdır. Potansiyel olarak direnci arttıran nedenler arasında, yüksek oranda zararlı mutasyonların ve dolayısıyla non-sinonim aminoasit değişikliği (dN) oranının düşüklüğü yer almaktadır [5, 17, 25].

Lyssavirus Genomik Çeşitliliği

Kuduz virusunun yedi genotipi için (GT1-Rabies Virus, GT2-Lagos bat virus, GT3-Mokola virus, GT4-Duvenhage virus, GT5-European bat lyssavirus type 1, GT6-European bat lyssavirus type 2, GT7-Australian bat lyssavirus) full genom sekansı kullanılarak Lyssavirus'un genomik çeşitliliği hakkında çalışmalar raporlanmıştır [9]. Uzunlukları 11918 nt.(GT7) ile 12016 nt.(GT2) arasında çeşitlilik göstermesine rağmen tüm genomların aynı yapısal organizasyona sahip olduğu ortaya konmuştur (Tablo1). Kodlama bölgelerinin tahmini boyutu genotipler arasında benzerdir ve M proteini tüm genotiplerde aynı uzunluğa sahipken P proteini çok değişkenlik göstermiştir [30, 32, 45]. Tüm genomlar çevrilmeyen bölgelerle kaplanmış (UTR- untranslated region) polisitokronik genom organizasyonuna sahiptir [32, 42]. Benzerlik oranını yansıtan genetik çeşitliliğin boyutu proteinler arasında ve içinde değişkenlik göstermekte ve sırasıyla N>L>M>G>P (95.2, 94.2, 92.3, 85.8, 81.5 %) amino asit benzerliğine sahip olduğu ortaya konulmuştur [9]. Bölge başına d_N/d_S oranı (nonsynonymous substituons/synonymous substituons) ölçüldüğünde elde edilen sayısal verilere bakıldığında, Kuduz virusunun mutasyonlara yatkınlığının oldukça düşük olduğu bildirilmiştir [9, 15].

Günümüzde Lyssavirus Uluslararası Virus Taksonomisi Komitesi'ne (İnternational Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) göre, anti nükleokapsid monoklonal antikor panelleri ile reaksiyonda olan antijenik örnekler ve genetik mesafeler gibi sınırlandırma kriterlerine dayalı olarak, Lyssaviruslar 16 farklı virus türüne ayrılmıştır [47]. Lyssavirus türleri iki filo grubu ayrılır. Virusun antijenik ve genetik profili, filogruplar içinde de ayrılmaya imkan verir [10, 11, 16]. Filogrup 1, Rabies lyssavirus, Duvenhage lyssavirus, Avrupa bat Lyssaviruses tip 1 ve 2, Bokeloh bat Lyssavirus ve Avustralya bat Lyssavirus'u kapsamaktadır. Ayrıca, Aravan Lyssavirus, Khujand Lyssavirus ve Irkut Lyssavirus'da filogrup 1'in üyeleri arasındadır. Filogrup 2, Lagos bat Lyssavirus, Mokola lyssavirus ve Shimoni bat Lyssavirus'u içermektedir. Filogruplarda önemli bir serolojik nötralizasyon vardır, ancak filogruplar arasında çok sınırlı kros-nötralizasyon tespit edilmiştir. Bir filogruptan inaktive edilmiş virus fareye verildiğinde oluşan antikorların aynı filogruptaki virusları nötralize ettiği ancak diğer filogruptaki viruslara etki etmediği deneysel olarak ortaya konmuştur [10, 11, 16]. Batı Kafkasya yarasa Lyssavirus, Ikoma Lyssavirus ve Lleida bat Lyssavirus bağımsız filogruplar oluşturabilir [47]. Ancak bu viruslara ait sınırlı izolasyon raporlanması, bu filogrupların tam olarak resmi adlandırılmasına engeldir [6, 30].

Glikoproteinin yapısında bulunan ektodomain'in antijenik bölge III bölümü viral patojeniteyi önemli ölçüde etkilemektedir. Bu antijenik bölgedeki iki pozitif yüklü bölge olan R333 ve K330 viral patojenitede önemli etkilere sahiptir. Glikoproteindeki bir R333 (ya da K330)'ün varlığı Kuduz virusunun Challenge Virus Standart (CVS) ya da Evelyn Rokitnicki Abelseth (ERA) suşunun virulensini belirlemektedir [3, 43]. R333'ün doğal olarak eksikliği lyssavirus'un patojenitesi üzerinde negatif etki yaratmaktadır [3]. Virulens için gerekli glykoprotein R333 bölümü filogroup 2'deki viruslarda D333 ile doğal bir şekilde yer değiştirmiştir, bu değişimin büyük olasılıkla filogrubun patojenitesinde azalmaya sebep olduğu düşünülmektedir. Afrika'daki yayılımı ve bugüne kadar az sayıda insan ve hayvan vakası raporlandığı için filogrup 2 Lyssaviruslar (genotip 2 ve 3) toplum ve veteriner sağlığı için daha az tehlikeli olarak görülebilmektedir [12, 13]. Ayrıca çok az sayıda izolatlara rağmen filogrup 2 içindeki büyük genetik çeşitlilik, doğada daha büyük çeşitlilikte olabileceği konusunda fikir uyandırmalıdır. Filogrup 2 içindeki büyük hetorojenite moleküler bir fleksibilite sağlayabilir. Diğer bir yandan klasik aşı (genotip 1) ile aşılanmış birkaç hayvanın Lagos yarasa virusla mücadeleden niçin korunmadığını açıklayabilir [3, 14].

Türkiye'de Kuduzun Epidemiyolojisi ve İzolatların Filogenetik Durumu

Orta Doğu ve Doğu Avrupa arasında bir köprü gibi konumunda bulunan Ülkemiz coğrafyası dikkate alındığında, Kuduz virusunun da durumu bu bağlantıyla benzerlik göstermektedir [21]. Sekans analizleri neticesinde coğrafik orijinleri ile ilişkili olarak üç farklı dala ait Kuduz virusu'nun Türkiye'de gözlendiği sonucuna varılmıştır [21]. Batı dalı olarak adlandırılan dal Türkiye'nin batısındaki illerde yaygın, ikinci bir dal ise doğu illerinden elde edilen farklı izolatları içerisinde barındırdığından Doğu dalı olarak adlandırılmıştır [19]. Batı dalının daha önce bulunmadığı bölgelere doğru, güney ve doğu yönleri istikametinde yayılım gösterdiği belirtilmektedir [20]. Doğu dalı üzerinde yapılan genetik analizler ise; bu grubun İran, Irak ve İsrail gibi Orta Doğu ülkelerinden diğer RABV sekanslarıyla ilişkili olduğunu göstermiştir [19, 22]. Doğu grubu içerisinde yer alan Ardahan ilinden örnekler incelendiğinde bu izolatlardan bazılarının Türkiye'nin kuzey-doğu sınır komşusu olan Gürcistan'dan elde edilenler ile çok yakın ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu dal Kuzey-doğu/ Kafkas dalı olarak adlandırılmıştır. Bu benzerlikler; yeni virus suşlarının ülkemize girmiş olabileceği konusunda dikkat çekici veriler olarak yorumlanmaktadır. Konakçı tipinin kombinasyonu, ülkenin topografisi ve sınırları boyunca hayvan hareketleri Türkiye'deki kuduzun mevcut epidemiyolojisinin şekillenmesine katkıda bulunmaktadır [19, 22].

Kaynaklar

1. Assenberg R, Delmas O, Morin B, Graham C, De Lamballerie X, et al (2010) Genomics and structure/function studies of Rhabdoviridae proteins involved in replication and transcription. Antiviral Research, Elsevier Masson, 87 (2), 149-61
2. Arai YT, Takahashi H, Kameoka Y, Shiino T, Wimalaratne O & Lodmell DL (2001). Characterization of Sri Lanka rabies virus isolates using nucleotide sequence analysis of nucleoprotein gene. Acta Virol 45, 327-333

3. Badrane H & Tordo N (2001). Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to Carnivora orders. J Virol 75, 8096-8104
4. Bourhy H, KissÍ B, Audry L, Smreczak M, Sadkowska-Todys M, Kulonen K, Tordo N, Zmudzinski J.F.& Holmes E.C (1999). Ecology and evolution of rabies virus in Europe. J Gen Virol 80, 2545-2557
5. Bourhy H, Reynes JM, Dunham EJ, Dacheux L, Larrous F, Huong VT, Xu G, Yan J, Miranda ME, Holmes EC (2008). The origin and phylogeography of dog rabies virus. J. Gen. Virol. 89,2673-81
6. Calisher CH, Ellison JA (2012). The other rabies viruses: The emergence and importance of lyssaviruses from bats and other vertebrates. Travel Med Infect Dis.10 (2): 69-79
7. Crawford-Miksza LK, Wadford DA, Schnurr DP (1999). Molecular epidemiology of enzootic rabies in California. J. Clin. Virol. 14: 207-219
8. David D, Hughes GJ, Yakobson BA, Davidson I, Un H, Aylan O, Kuzmin IV & Ruppercht CE (2007). Identification of novel canine rabies virus clades in the Middle East and North Africa. J Gen Virol 88,967-980
9. Delmas O, Holmes EC, Talbi C, Larrous F, Dacheux L, Bouchier C, Bourhy H (2008). Genomic Diversity and Evolution of the Lyssaviruses. PLoS ONE 3(4):e2057
10. Dietzgen, RG, Calisher CH, Kurath G, Kuzmin IV, Rodriguez LL, Stone DM (2012). Family rhabdoviridae. In: King, A.M.Q., ADAMS MJ, CARSTENS EB, LEFKOWİTZ EJ (Eds.), Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Diego, USA, pp. 686–714
11. Evans JS, Horton DL, Easton AJ, Fooks AR, Banyard AC (2012) Rabies virus vaccines: is there a need for a pan-lyssavirus vaccine? Vaccine, 30: 7447–54
12. Familusi JB, Moore DL (1972). Isolation of a rabies related virus from the cerebrospinal fluid of a child with 'aseptic meningitis'. Afr. J. Med. Sci. 3: 93-96
13. Familusi JB, Osunkoya BO, Moore DL, Kemp GE, Fabiyi A (1972). A fatal human infection with Mokola virus. Am. J. Trop. Med. Hyg. 21: 959-963
14. Fekadu M, Shaddock JH, Sanderlin DW, Smith JS (1988). Efficacy of rabies vaccines against Duvenhage virus isolated from European house bats (Eptsicus serotinus), classic rabies and rabies-related viruses. Vaccine 6: 533-539
15. Finke S, Conzelmann KK (1999). Virus protomers determine interference by defective RNAs: selective amplification of mini-RNA vectors and rescue from cDNA by a 3' copy-back ambisense rabies virus. J Virol 73: 3818-3825
16. Fooks AR, Banyard AC, Horton DL, Johnson N, Mcelhinney L, Jackson AC (2014). Current status of rabies and prospects for elimination. *Lancet.* 384 (9951), 1389-1399
17. Holmes EC, Woelk CH, Kassis R & Bourhy H (2002). Genetic constraints and adaptive evolution of rabies virus in nature. *Virology* 292, 247-257
18. Hyun BH, Lee KK, Kim IJ, Lee KW, Park HJ, Lee OS, An SH & Lee JB (2005). Molecular epidemiology of rabies virus isolates from South Korea. Virus Res 114, 113-125
19. Johnson N, Black C, Smith J, Un H, Mcelhinney LM, Aylan O, Fooks AR (2003). Rabies emergence among foxes in Turkey. *Journal of Wildlife Diseases*, 9: 1623-1625
20. Johnson N, Un H, Vos A, Aylan O Fooks AR (2006). Wildlife rabies in western Turkey:The spread of rabies through the western provinces of Turkey. Epidemiology and Infection, 134:369-375
21. Johnson N, Un H, Fooks AR, Freuling C, Müller T, Aylan O, Vos A (2010). Rabies epidemiology and control in Turkey: Pat and Present. Epidemiology and Infection. 138, 305-312
22. Johnson N, Fooks AR, Freuling C, Müller T, Kliemt A, Un H, Aylan O, Unal N, Eskiizmirliler S, Akkoca N, Vos A (2013). The Role of Phylogeography in the Control of Wildlife Rabies in Turkey *" In Introduction to Sequence and Genome Analysis III, iConcept Press Ltd..,ISBN:* 978-1-922227-09-6" p:279
23. Jukes TH, Cantor CR (1969). Evolution of protein molecules, In I. H. N. Munro (ed.), Mammalian protein metabolism. Academic Press, New York, N.Y. p. 21–132.
24. Kissi B, Tordo N & Bourhy H (1995). Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. Virology 209, 526-537
25. Kissi B, Badrene H, Audry L, Lavenu A, Tordo N, Brahimi M & Bourhy H (1999). Dynamics of rabies virus quasispecies during serial passage in heterologous hosts. *J Gen Virol* 80, 2041-2050.
26. Kimura M (1983). The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Cambridge, Mass
27. Knobel DL, Cleaveland S, Coleman PG, Fevre EM, Meltzer MI, Miranda MEG, Shaw A, Zinsstag J, Meslin FX (2005). Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. Bull. World Health Organ, 83, 360–368
28. Kuiken T, Holmes EC, Mccauley J, Rimmelzwaan GF, Williams CS & Grenfell BT (2006). Host species barriers to influenza virus infections. *Science* 312, 394-397.
29. Kuzmin IV, Botvinkin AD, Mcelhinney LM, Smith JS, Orciari LA, Hughes GJ, Fooks AR & Rupprecht CE (2004). Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union. J Wildl Dis 40, 617-631
30. Kuzmin IV, Hughes GJ, Botvinkin AD, Orciari LA, Rupprecht CE (2005). Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the Lyssavirus genus and suggested quantative criteria based on the N gene sequence for Lyssavirus genotype definition.Virus Res 111:28-43
31. Mansfield KL, Racloz V, Mcelhinney LM, Marston DA, Johnson N, Ronsholt L, Christensen LS, Neuvonen E, Botvinkin AD. & other authors (2006). Molecular epidemiological study of Arctic rabies virus isolates from Greenland and comparison with isolates from throughout the Arctic and Baltic regions. Virus Res 116, 1-10
32. Marston D.A, Mcelhinney L.M, Johnson N, MulleR T, Conzelmann KK, et al (2007). Comparative analysis of the full genome sequence of European bat lyssavirus type 1 and type 2 with other lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadenylation motif in the G-L 3' non-translated region. J Gen Virol 88:1302-1314
33. Mebatsion T, Cox JH, Frost W (1992). Isolation and characterization of 115 street rabies virus izolates from Ethiopia by using monoclonal antibodies: identification of 2 isolates as Mokola and Lagos bat viruses. J.Infect. Dis. 166: 972-977
34.Müller T, Freuling, CM, Wysocki P, Roumiantzeff M, Freney J, Mettenleiter TC & Vos A (2015). Terrestrial rabies control in the European Union: Historical achievements and challenges ahead. The Veterinary Journal, 203(1), 10-17
35. Nadin-Davis SA, Huang W, Armstrong J, Casey A, Bahloul C, Tordo N and Wandeler AI (2001). Antigenic and genetic divergence of rabies from bat species indigenous to Canada. Virus Res.74: 139-156
36. Nadin-Davis SA, Simani S, Armstrong J, Fayaz A & Wandeler AI (2003). Molecular and antigenic characterization of rabies viruses from Iran identifies variants with distinct epidemiological origins. *Epidemiol Infect.* 131, 777-790
37. Nanayakkara S, Smith JS & Rupprecth CE (2003). Rabies in Sri Lanka: splendid isolation. Emerg Infect Dis 9, 368-371
38. Park YJ, Shin MK & Kwon HM (2005). Genetic characterization of rabies virus isolates in Korea. Virus Genes 30, 341-347
39. Smith JS (1996). New aspects of rabies with emphasis on epidemiology,diagnosis and prevention of the disease in the United States. Clin. Micrbiol. Rev. 9: 166-176
40. Steele JH, Fernandez PJ (1991). History of rabies and global aspects. In G.M. Baer, Ed., The Natural History of Rabies, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, pp.1-26
41. Thedorides J (1986). Histoire de la rage. Masson, Paris, France
42. Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G, Rougeon F (1986). Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? Proc Natl Acad Sci U S A 83: 3914-3918
43. Tuffereau C, Leblois H, Benejean J, Coulon P, Lafay F, Flamand A (1989). Arjinine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice. Virology 172:206-212
44. White DO & Fenner F (1994). Medical virology. Gulf Professional Publishing. 4th. Ed. Chapter 29, Rhabdoviridae, 475-488
45. Wu X, Franka R, Velasco-Villa A, Rupprecht CE (2007). Are all lyssavirus genes equal for phylogenetic analyses? Virus Res 129: 91-103
46. Yang Z, Nielsen R (2000). Estimating Synonymous and Nonsynonymous Substitution Rates Under Realistic Evolutionary Models. Molecular Biology and Evolution, 17 (1), 32-43.
47. http://www.who-rabies-bulletin.org/site-page/classification 30/10/2017